

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Mateja VERBANČIČ

**Molekularno dokazovanje  
klamidioze**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2008

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Mateja VERBANČIČ

**Molekularno dokazovanje klamidioze**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**Molecular detection of chlamydiosis**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2008

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

Po sklepu Študijske komisije univerzitetnega študija mikrobiologije, z dne 20. 3. 2007 ter na osnovi Pravilnika o diplomskem delu, je bila za mentorico diplomskega dela imenovana doc. dr. Eva Ružić - Sabljić, za somentorico doc. dr. Darja Keše in za recenzentko prof. dr. Manica Mueller - Premru.

Mentorica: doc. dr. Eva Ružić - Sabljić

Somentorica: doc. dr. Darja Keše

Recenzentka: prof. dr. Manica Mueller - Premru

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Darja ŽGUR BERTOK

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: doc. dr. Eva RUŽIĆ - SABLJIĆ

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Članica: doc. dr. Darja KEŠE

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Članica: prof. dr. Manica MUELLER - PREMRU

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Mateja Verbančič

**KJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA**

ŠD Dd  
DK UDK 579.62:591.2:598.265 (043)=163.6  
KG *Chlamydia psittaci*/klamidioze/ornitozе/diagnostika/molekularne tehnike/nested PCR  
AV VERBANIČIČ, Mateja  
SA RUŽIĆ - SABLJIĆ, Eva (mentorica)/KEŠE, Darja (somentorica)/MUELLER - PREMRU, Manica (recenzentka)  
KZ SI-1000 Ljubljana,  
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije  
LI 2008  
IN MOLEKULARNO DOKAZOVANJE KLAMIDIOZE  
TD diplomsko delo (univerzitetni študij)  
OP X, 70 str., 3 pregl., 12 sl., 133 vir.  
IJ sl  
JI sl/en  
AI Namen naloge je bila uvedba molekularne metode verižne reakcije s polimerazo - PCR (angl. polymerase chain reaction) v diagnostiko okužb z bakterijo *Chlamydia psittaci* (*C. psittaci*), ki povzroča klamidiozo ali ornitozo pri pticah, lahko pa se prenaša tudi na ljudi. Uporabili smo "nested" PCR za povečanje specifičnosti in občutljivosti analize. Iz Inštituta za zdravstveno varstvo perutnine, Veterinarske fakultete Ljubljana, smo 2007 pridobili brise kloake 86 mestnih golobov iz mesta Ljubljana. Brise smo do testiranja hrаниli v transportnem gojišču za klamidije pri -70 °C. S kompletom reagentov QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN GmbH, Nemčija) smo po navodilih proizvajalca iz vzorcev izolirali DNA. DNA smo pomnoževali z "nested" PCR, ki uporablja rodovno in vrstno specifične začetne ologonukleotide. Za pomnoževanje smo uporabili komplet reagentov nemškega proizvajalca Genekam Biotechnology, AG. Pomnožene fragmente DNA, specifične za *C. psittaci*, v velikosti 389–404 bp, smo dokazovali z elektroforezo v agaroznem gelu. Izmed 86 vzorcev mestnih golobov, smo DNA *C. psittaci* potrdili pri 7 vzorcih. Ugotovili smo, da z metodo "nested" PCR lahko dokazujemo okužbo s *C. psittaci* pri mestnih golobih. Metoda se je izkazala za občutljivo in hitro.

**KEY WORDS DOCUMENTATION**

DN Dd  
DC UDC 579.62:591.2:598.265 (043)=163.6  
CX *Chlamydia psittaci*/ chlamydiosis/ ornithosis/ diagnostics/ molecular methods/ nested PCR  
AU VERBANČIČ, Mateja  
AA RUŽIĆ - SABLJIĆ, Eva (supervisor)/KEŠE, Darja (co-advisor)/MUELLER - PREMRU, Manica (reviewer)  
PP SI-1000 Ljubljana,  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology  
PY 2008  
TI MOLECULAR DETECTION OF CHLAMYDIOSIS  
DT Graduation Thesis (University studies)  
NO X, 70 p., 3 tab., 12 fig., 133 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB The aim of this study was to introduce molecular method polymerase chain reaction (PCR) for diagnosis of *Chlamydia psittaci* (*C. psittaci*) that causes chlamydiosis or ornithosis in birds and can transfer to humans. We used a nested PCR to increase the specificity and sensitivity of the assay. In 2007 we acquired 86 cloacal swabs of free-living pigeons from the city Ljubljana from the Institut for health care of poultry, Veterinary faculty in Ljubljana. The swabs were placed into chlamydia transport medium and frozen at -70 °C. DNA was extracted from samples and purified by using QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN GmbH, Germany), following the manufacturer's protocol. Amplification of the DNA was performed by using nested PCR that uses genus and species specific primers. For amplification we used commercial kit produced by Genekam Biotechnology, AG. Amplified products of 389–404 base pairs specific for *C. psittaci* were visualized by agarose gel electrophoresis. DNA of *C. psittaci* was confirmed in 7 of 86 examined wild pigeons samples. We established that with the method nested PCR we can detect *C. psittaci* in wild pigeons. The method was demonstrated to be sensitive and fast.

## KAZALO VSEBINE

<b>KJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA-----</b>	<b>IV</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION -----</b>	<b>V</b>
<b>KAZALO VSEBINE -----</b>	<b>VI</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC-----</b>	<b>VIII</b>
<b>KAZALO SLIK -----</b>	<b>IX</b>
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI-----</b>	<b>X</b>
<b>1 UVOD -----</b>	<b>1</b>
1. 1 NAMEN NALOGE -----	2
1. 2 DELOVNE HIPOTEZE -----	2
<b>2 PREGLED OBJAV -----</b>	<b>3</b>
2. 1 BIOLOŠKE LASTNOSTI KLAMIDIJ-----	3
2. 2 TAKSONOMIJA KLAMIDIJ -----	5
2. 3 <i>Chlamydia psittaci</i> -----	7
2. 4 MORFOLOGIJA BAKTERIJE <i>C. psittaci</i> -----	8
<b>2. 4. 1 Celična stena bakterije <i>C. psittaci</i>-----</b>	<b>8</b>
2. 4. 1. 1 Antigeni <i>C. psittaci</i> -----	11
<b>2. 4. 2 Razvojni krog bakterije <i>C. psittaci</i>-----</b>	<b>13</b>
<b>2. 4. 3 Metabolizem-----</b>	<b>16</b>
2. 5 GENETIKA BAKTERIJE <i>C. psittaci</i> -----	17
2. 6 EPIDEMIOLOGIJA BAKTERIJE <i>C. psittaci</i> -----	20
<b>2. 6. 1 Ptice-----</b>	<b>21</b>
<b>2. 6. 2 Človek -----</b>	<b>22</b>
2. 7 PATOGENEZA BAKTERIJE <i>C. psittaci</i> -----	23
<b>2. 7. 1 Okužba s <i>C. psittaci</i> pri pticah-----</b>	<b>23</b>
2. 7. 1. 1 Prostoživeči golobi-----	24
<b>2. 7. 2 Okužba s <i>C. psittaci</i> pri sesalcih-----</b>	<b>27</b>
<b>2. 7. 3 Okužba s <i>C. psittaci</i> pri človeku -----</b>	<b>28</b>
2. 8 DIAGNOSTIKA-----	30
<b>2. 8. 1 Odvzem vzorca -----</b>	<b>30</b>
<b>2. 8. 2 Izolacija -----</b>	<b>31</b>
<b>2. 8. 3 Serologija -----</b>	<b>31</b>
<b>2. 8. 4 Detekcija klamidijskih antigenov -----</b>	<b>32</b>
<b>2. 8. 5 Molekularno dokazovanje nukleinske kisline <i>C. psittaci</i> -----</b>	<b>33</b>

2. 8. 5. 1	Verižna reakcija pomnoževanja s polimerazo – PCR (angl. polymerase chain reaction)-----	33
2. 8. 5. 1. 1	“Nested” PCR -----	35
2. 8. 5. 1. 2	Multiplex PCR-----	36
2. 8. 5. 1. 3	Touchdown PCR -----	37
2. 8. 5. 1. 4	PCR v realnem času -----	37
2. 8. 5. 2	DNA mikročipi -----	38
<b>3</b>	<b>MATERIAL IN METODE-----</b>	<b>39</b>
3. 1	ZBIRANJE IN SHRANJEVANJE KUŽNINE -----	39
3. 2	IZOLACIJA BAKTERIJSKE DNA -----	39
3. 3	VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO-----	41
3. 3. 1	Sestava reakcijske mešanice in pogoji PCR-----	41
3. 4	DOKAZOVANJE PRIDELKOV PCR REAKCIJE -----	44
3. 4. 1	Priprava agaroznega gela in elektroforeza-----	44
3. 4. 2	Priprava vzorcev in nanos na gel-----	44
3. 4. 3	Pogoji elektroforeze in fotografiranje gela -----	45
3. 5	POTRJEVANJE POZITIVNIH REZULTATOV -----	45
3. 6	CLEARVIEW-----	45
<b>4</b>	<b>REZULTATI-----</b>	<b>47</b>
4. 1	DOKAZOVANJE DNA BAKTERIJE <i>C. psittaci</i> -----	47
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA IN SKLEPI-----</b>	<b>49</b>
5. 1	RAZPRAVA -----	49
5. 2	SKLEPI -----	55
<b>6</b>	<b>POVZETEK-----</b>	<b>56</b>
<b>7</b>	<b>VIRI-----</b>	<b>58</b>

**KAZALO PREGLEDNIC**

Preglednica 1:	Prijavljeni primeri psitakoze v Ameriki od 1995 do 2005 (CDC, 2007).....	29
Preglednica 2:	Število pozitivnih vzorcev na <i>C. psittaci</i> po prvem in drugem testiranju z metodo “nested” PCR.....	46
Preglednica 3:	Delež pozitivnih rezultatov na <i>C. psittaci</i> z metodo CLEARVIEW in “nested” PCR.....	47

**KAZALO SLIK**

Slika 1:	Posnetek elektronske mikroskopije vključka <i>Chlamydia psittaci</i> v okuženih L929 celicah (Andersen in Vanrompay, 2003).....	4
Slika 2:	Genetska struktura reda <i>Chlamydiales</i> (Bush in Everett, 2001).....	6
Slika 3:	Model celične stene elementarnega telesca (ET) <i>Chlamydia psittaci</i> 6BC (Everett in Hatch, 1995).....	9
Slika 4:	Shema poglavitne beljakovine zunanje ovojnice – MOMP v klamidijski celični steni (Vanropay in sod., 1995). ....	12
Slika 5:	Razvojni krog klamidij (Everett, 2000).....	14
Slika 6:	Primerjava računalniške analize odprtih bralnih okvirjev – ORF in organizacija genoma klamidiofagov Chp1 in Chp2 (Liu in sod, 2000)....	18
Slika 7:	Mestni golobi na različnih lokacijah po Ljubljani. a) Mestni golob ( <i>Columba livia domestica</i> ), b) Kongresni trg v Ljubljani, c) Streha hiše v Centru Ljubljane, d, e) Mestna tržnica Ljubljana.....	25
Slika 8:	Princip verižne reakcije pomnoževanja s polimerazo – PCR (Principle of the..., 1999) .....	34
Slika 9:	Potek "nested" PCR reakcije (Nested PCR..., 2006). .....	36
Slika 10:	Reakcijska mešanica prvega koraka PCR reakcije (Genekam Biotechnology AG, 2007).....	42
Slika 11:	Reakcijska mešanica drugega koraka PCR reakcije (Genekam Biotechnology AG, 2007).....	43
Slika 12:	Gelska elektroforeza pridelkov verižne reakcije pomnoževanja s polimerazo (PCR) <i>Chlamydia psittaci</i> . .....	47

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ATP	adenozin trifosfat
ADP	adenozin difosfat
bp	bazni par
CDC	Center za nadzor bolezni (angl. Center for Disease Control and Prevention)
<i>C. psittaci</i>	<i>Chlamydia psittaci</i>
<i>C. pneumoniae</i>	<i>Chlamydia pneumoniae</i>
<i>C. pecorum</i>	<i>Chlamydia pecorum</i>
GPIC	sev <i>C. psittaci</i> ( <i>Chlamydophila caviae</i> ), ki povzroča vnetje očesne veznice pri morskih prašičkih (angl. guinea pig inclusion conjunctivitis)
DNA	deoksiribonukleinska kislina (angl. deoxyribonucleic acid)
ELISA	encimsko imunski test (angl. enzyme-linked immunosorbent assay)
ET	elementarno telesce (angl. elementar body)
GTP	gvanozin trifosfat
IT	intermediarno (vmesno) telesce
KDO	trisaharid 3-deoksi-D-mano-2-oktulosonska kislino
LPS	lipopolisaharid
MOMP	poglavitna beljakovina zunanje membrane (angl. major outer membrane protein)
NASPHV	(angl. National Association of State Public Health Veterinarians)
ORF	odprt bralni okvir (angl. open reading frame)
PAGE	poliakrilamidna elektroforeza (angl. polyacrylamide gel electrophoresis)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. polymerase chain reaction)
POMP (Pmp)	polimorfna beljakovina zunanje membrane (angl. polymorphic outer membrane protein)
RFLP	dolžinski polimorfizem restrikcijskih fragmentov (angl. restriction fragment length polymorphisms)
RNA	ribonukleinska kislina (angl. ribonucleic acid)
rRNA	ribosomska ribonukleinska kislina (angl. ribosomal ribonucleic acid)
RT	retikularno ali mrežasto telesce
RVK	reakcija vezave komplementa
™	(angl. trade mark)
VD	variabilna domena

## 1 UVOD

Klamidiye so majhne, kokoidne po Gramu negativne bakterije, ki jih uvrščamo v red *Chlamydiales*, družino *Chlamydaceae* in povzročajo širok spekter bolezni pri ljudeh in živalih (Keše, 2002).

Zanimive so s stališča mikrobiologije, saj izstopajo s posebnim načinom razmnoževanja in edinstvenim odnosom z gostiteljem, v katerem parazitirajo (Naglić in sod., 2005).

Klamidioza (ornitoza) je bolezen ptic, ki jo povzroča bakterija *Chlamydia (C.) psittaci* (Andersen in Vanrompay, 2003). Človek se okuži z vdihovanjem aerosolnih delcev posušenih izločkov ptic ali pri obdelavi okuženega mesa (Keše, 2002). Pomemben vir okužbe za ljudi so mestni golobi, ki živijo v tesnem stiku z ljudmi (Dovč in sod., 2000).

Do razvoja molekularnih diagnostičnih testov je bil "zlati standard" med neposrednimi metodami za dokaz okužbe s klamidijami osamitev bakterije (Everett, 2000). Najpogosteje pa se pri pticah za dokazovanje klamidioze izvaja serološko testiranje (Geens in sod., 2005b, Kaleta in Taday, 2003). Razvoj molekularnih metod je omogočil hitrejšo laboratorijsko diagnostiko okužb s *C. psittaci*. Verižna reakcija s polimerazo (angl. polymerase chain reaction, PCR) je visoko občutljiva in specifična metoda za dokazovanje tarčne DNA (Messmer in sod., 1997).

## 1. 1 NAMEN NALOGE

V naši nalogi smo uvedli molekularno metodo “nested” PCR za dokaz okužbe z bakterijo *C. psittaci* pri mestnih golobih. Namen naloge je bil ugotoviti prevalenco okužb s *C. psittaci* pri mestnih golobih. V ta namen smo z Inštituta za zdravstveno varstvo perutnine (doc. dr. Alenka Dovč, dr. vet. med.) Veterinarske fakultete Ljubljana, pridobili brise kloake mestnih golobov iz Ljubljane.

## 1. 2 DELOVNE HIPOTEZE

Predpostavljam:

- da je bris kloake primerna kužnina za izolacijo DNA *Chlamydia psittaci*
- da z našo metodo lahko dokažemo DNA *Chlamydia psittaci*
- da je vsaj 5 % mestnih golobov okuženih s *Chlamydia psittaci*

## 2 PREGLED OBJAV

### 2. 1 BIOLOŠKE LASTNOSTI KLAMIDIJ

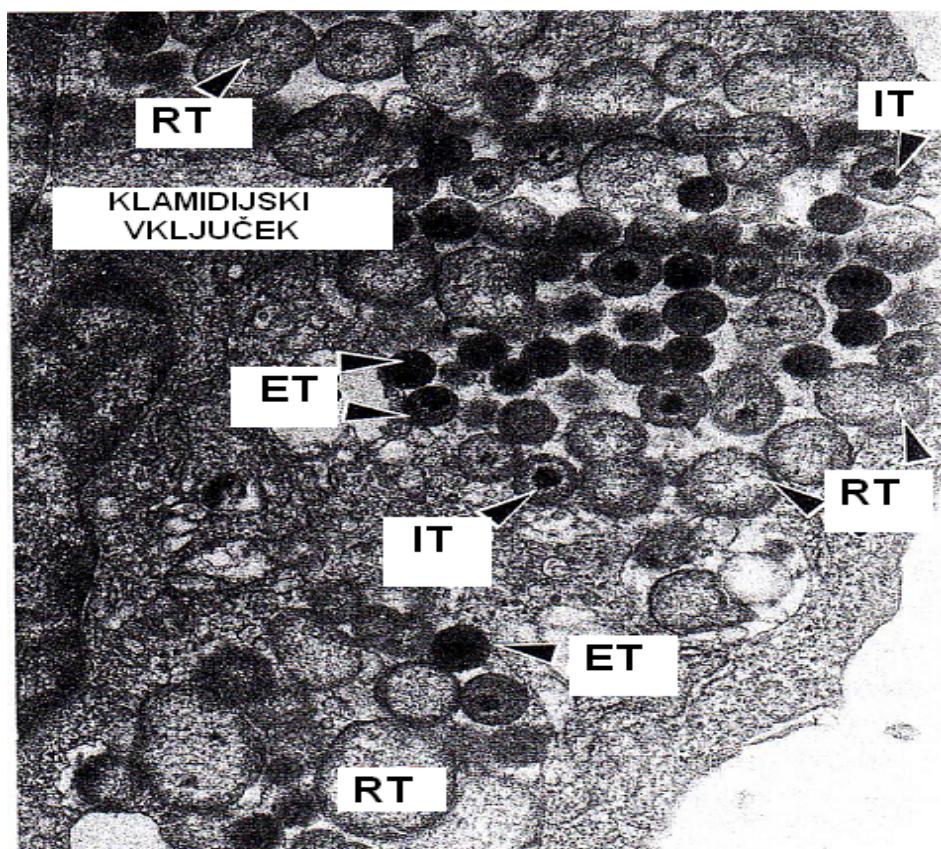
Dolgo časa so klamidije uvrščali med viruse, ker so obvezni znotrajcelični organizmi. Od večine bakterij se razlikujejo po tem, da njihova celična stena ne vsebuje peptidoglikana in niso sposobne sintetizirati visokoenergijskih molekul adenosintrifosfata (ATP) in gvanozintrifosfata (GTP). Te molekule dobijo od gostiteljske celice, zato jih imenujemo "energijski" paraziti (Keše, 2002).

Celični tropizem klamidij se kaže za različne celične vrste, predvsem za celice kubičnega epitelija in mukozne celice (Keše, 2002). Ker klamidije rastejo počasi znotraj gostiteljskih celic, se dejanski bolezenski znaki pokažejo dosti kasneje v poteku okužbe (Raulston in Wyrick, 2000).

Klamidije so pleomorfne, negibljive bakterije, velike od 0,2 do 1,5 µm. Imajo edinstven življenjski krog z dimorfnimi oblikami, ki se funkcionalno in morfološko razlikujejo. Velikost in oblika mikrobov je odvisna od razvojne stopnje, v kateri se nahajajo (Naglić in sod., 2005).

V gostiteljsko celico vstopajo klamidije v obliki tako imenovanega elementarnega telesca (ET), ki ga fagocitira gostiteljska celica. ET se ob fagocitozi obda s plaščem celične membrane gostiteljske celice (gr. *chlamis* – plašč). Iz tega tudi izhaja ime klamidija – obdana s plaščem (Mehle in Bole - Hribovšek, 2000). Nastane klamidijski vključek ali inkluzija v citoplazmi gostiteljske celice (Moulder, 1991). Po fagocitozi se ET preoblikuje v večjo razmnoževalno obliko, ki se imenuje retikularno telesce (RT) in se podvojuje z delitvijo na dvoje (Peeling in Brunham, 1996). RT se pretvorijo v ET in klamidije se sprostijo iz gostiteljske celice preko celične lize ali preko zlitja vključka in membrane (Moulder, 1991). Med prehodom ET v RT in med kondenzacijo RT nazaj v

ET pred sprostivijo novih potomk ET v okolico, so opažene različne vmesne oblike – IT (intermediarna telesca) (Raulston in Wyrick, 2000). Med razmnoževanjem je pod elektronskim mikroskopom vidna heterogenost ET in RT (Slika 1).



Slika 1: Posnetek elektronske mikroskopije vključka *Chlamydia psittaci* v okuženih L929 celicah. Prisotne so različne morfološke oblike: elementarno telesce (ET), retikularno telesce (RT) in intermediarno – vmesno telesce (IT). Povečava x15 000 (Andersen in Vanrompay, 2003).

Klamidijska ovojnica je sestavljena iz citoplazmatske in zunanje membrane, ki vsebuje lipopolisaharid, kar kaže, da so klamidije po Gramu negativne bakterije (Raulston in Wyrick, 2000). Vendar klamidije ne vsebujejo muraminske kisline, kar kaže, da klamidijska celična stena ne vsebuje značilne količine peptidoglikana (Everett in sod., 1999).

## 2. 2 TAKSONOMIJA KLAMIDIJ

Skozi čas se je zaradi naraščajočega znanja morfoloških, bioloških in molekularnih podatkov spremjal taksonomski status klamidij (Kaleta in Taday, 2003).

Sprva so klamidiye uvrščali med viruse, ker so znotrajcelični paraziti. Kasneje so ugotovili, da so to bakterije, ker imajo sledeče lastnosti:

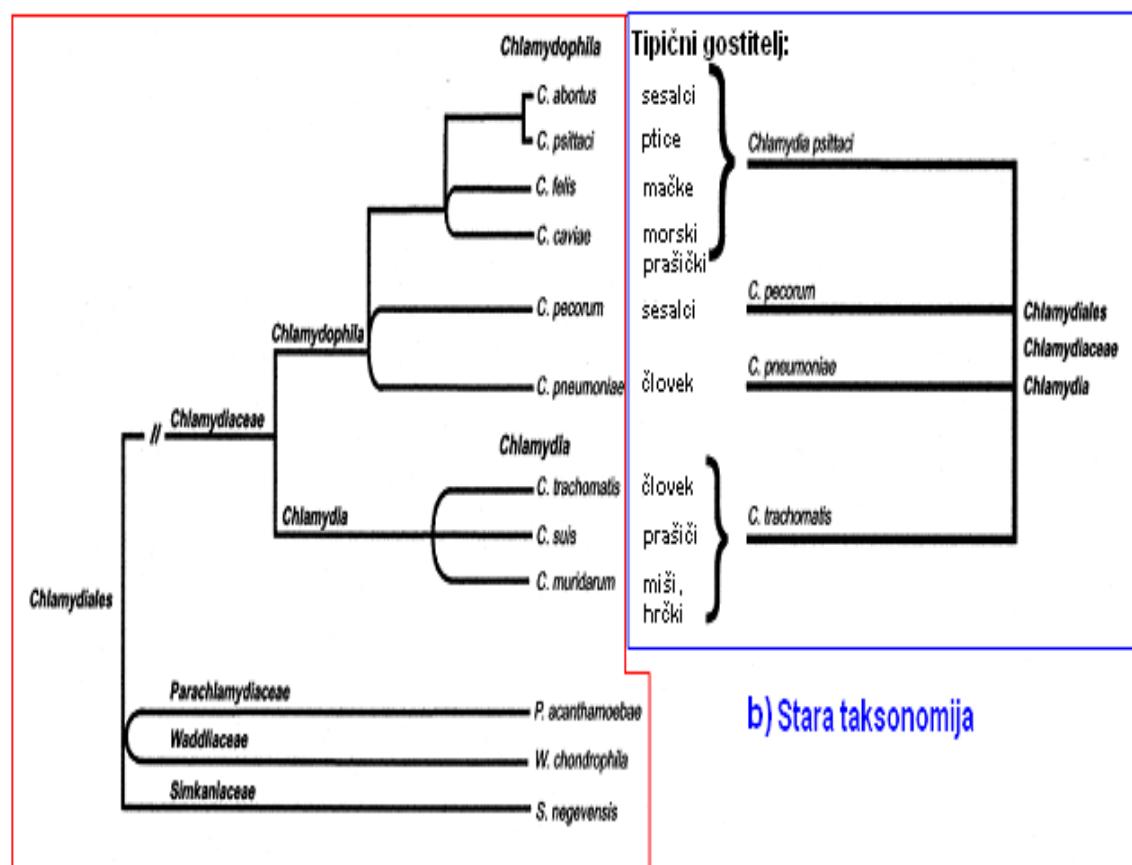
- razmnožujejo se z delitvijo na dvoje
- celična stena je po strukturi primerljiva s celično steno po Gramu negativnih bakterij
- imajo DNA in RNA
- imajo ribosome (Moulder, 1966 cit. po Vanrompay in sod., 1995; Wyrick in Richmond, 1989).

V času, ko ni bilo podatkov in metod iz molekularne biologije, so poznali samo dve vrsti klamidij: *C. psittaci* in *C. trachomatis* (Everett, 2000). Bakterije, ki so jih uvrščali med *C. psittaci*, niso kopičile glikogena v vključkih in so bile odporne na sulfadiazin. Vključki *C. trachomatis* pa vsebujejo glikogen in bakterije so občutljive na sulfadiazin. Uveljavitev te razvrstitev je predstavljala mejnik v klamidijski taksonomiji (Everett in sod., 1999).

V letih 1988 in 1989 so uvedli DNA-DNA hibridizacijo in ugotovili veliko raznolikost pri *C. psittaci*. Po tem kriteriju je *C. psittaci* vsebovala najmanj šest različnih tipov (Everett, 2000). Med njimi sta tudi kasneje imenovani novi vrsti *C. pneumoniae* (Grayston in sod., 1986) in *C. pecorum* (Fukushi in Hirai, 1992). Glede na analize 16S in 23S rRNA, družina *Chlamydiaceae* vsebuje dva roduv, *Chlamydia* in *Chlamydophila* ter devet vrst.

V rod *Chlamydophila* uvrščamo vrste *Chlamydophila abortus*, *Chlamydophila psittaci*, *Chlamydophila caviae*, *Chlamydophila felis*, *Chlamydophila pecorum* in

*Chlamydophila pneumoniae*. V rod *Chlamydia* pa *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia suis* in *Chlamydia muridarum* (Everett, 2000).



Slika 2: Genetska struktura reda *Chlamydiales*. a) nova taksonomska razdelitev *Chlamydiales* po reklasifikaciji (Everett in sod., 1999). Spisek gostiteljev prikazuje ekološko heterogenost družine *Chlamydiaceae*. b) taksonomska razdelitev pred reklasifikacijo (Bush in Everett, 2001).

Vrsta *Chlamydophila psittaci* vključuje samo ptičje seve, medtem ko so seve *Chlamydia psittaci*, povezane s splavom pri prežvekovalcih, z boleznimi pri mačkah in morskih prašičkih, uvrstili v nove vrste: *Chlamydophila abortus*, *Chlamydophila felis* in *Chlamydophila caviae*. Seve *Chlamydia trachomatis*, ki povzročajo okužbe pri miših in hrčkih ter seve, ki okužujejo prašiče, so uvrstili v novi vrsti: *Chlamydia muridarum* in *Chlamydia suis* (Everett in sod., 1999).

Uporaba molekularno bioloških pristopov v zadnjem desetletju je razkrila tudi prisotnost klamidijam sorodnih bakterij v različnih okoljih in s tem upravičila potrebo po novi taksonomski ureditvi reda (Horn in Wagner, 2001; Kostanjšek in sod., 2004; Corsaro in Venditti, 2004; Corsaro in sod., 2002; Ossewaarde in Meijer, 1999). Dodatno so bile ustvarjene tri nove družine. Red *Chlamydiales* tako trenutno sestavlja 4 družine: *Chlamydiaceae*, *Parachlamydiaceae*, *Simkaniaceae* in *Waddliaceae* (Everett, 2000).

### 2. 3 *Chlamydia psittaci*

*Chlamydia psittaci* je najbolj raznolika klamidijska vrsta, saj je razširjena med pticami in sesalci. Trenutno *Chlamydia psittaci* po Everettu in sodelavcih (1999) uvrščamo v red *Chlamydiales*, družino *Chlamydiaceae*, rod *Chlamydophila* in vrsto *Chlamydophila psittaci*. Velja omeniti, da vsi mikrobiologi ne sprejemajo razdelitve klamidij na rod *Chlamydia* in *Chlamydophila*. Tako bom v nadaljnem besedilu uporabljala naziv *Chlamydia (C.) psittaci*.

*C. psittaci* je patogen ptic, ki se prenaša z inhalacijo okuženega prahu, aerosolov ali z neposrednim stikom (Trávniček in sod., 2002; NASPHV, 2008). Pri večini vrst ptic je okužba asimptomatska. Vendar stresni dejavniki (trgovanje in neustrezno ravnanje z živalmi), lahko povzročijo začetek kliničnih znakov, katerih posledica je hitro poslabšanje in smrt (Everett, 2000; Greco in sod., 2005). Prihaja do okužbe številnih organov, kot so očesna veznica, respiratorni sistem in gastrointestinalni trakt (Everett, 2000).

## 2. 4 MORFOLOGIJA BAKTERIJE *C. psittaci*

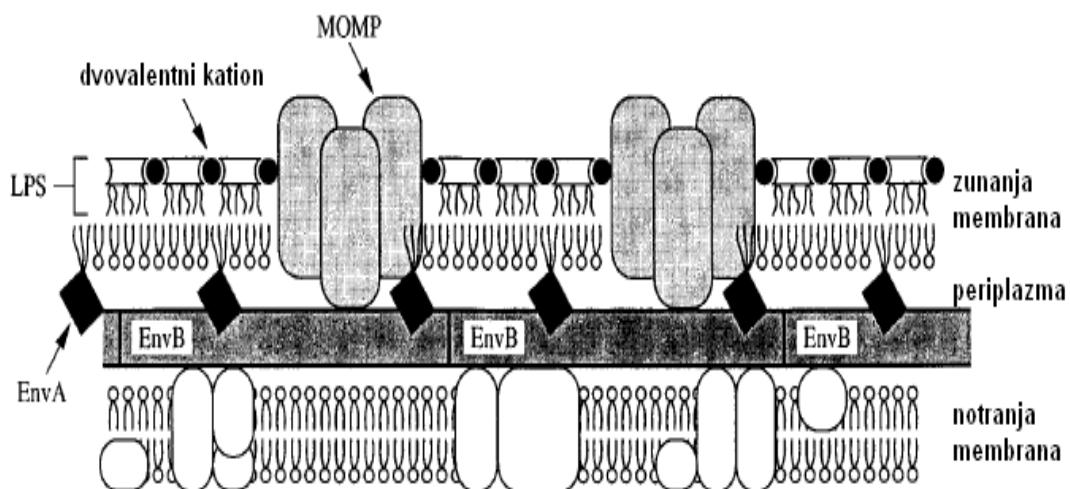
*C. psittaci* ima tako kot ostale klamidije značilen dvostopenjski razvojni krog, ki vključuje dve obliki. Zunajcelično infektivno obliko ET in znotrajcelično razmnoževalno obliko RT. ET je majhno, elektronsko gosto in sferično telo, veliko 0,2 do 0,3  $\mu\text{m}$  v premeru. RT je znotrajcelična metabolno aktivna oblika. Je prav tako sferične oblike, vendar večja kot ET. Meri 0,5 do 1,3  $\mu\text{m}$  v premeru (Slika 1) (Escalante - Ochoa in sod., 1998; Vanrompay in sod., 1995).

Zunajcelična infektivna oblika je obdana s troslojno ovojnico, ki omogoča odpornost na neugodne pogoje zunaj gostiteljske celice (Naglić in sod., 2005). Zaradi osmotske stabilnosti in metabolne neaktivnosti je to telo sposobno preživeti v zunajceličnem okolju, dokler ni na voljo dovezeta gostiteljska celica (Raulston in Wyrick, 2000).

### 2. 4. 1 Celična stena bakterije *C. psittaci*

Klamidije so obdane s citoplazmatsko membrano in zunanjo membrano (Vanrompay in sod., 1995). Zunanja membrana je sestavljena iz fosfolipidov, lipidov, lipopolisaharidov in proteinov. Za razliko od ostalih po Gramu negativnih bakterij pa klamidije v celični steni nimajo muraminske kisline (Barbour in sod., 1982), ki je sestavni del peptidoglikana.

Slika 3 prikazuje model celične stene ET *C. psittaci*.



Slika 3: Model celične stene elementarnega telesca (ET) *Chlamydia psittaci* sev 6BC (Everett in Hatch, 1995).

Zunajcelično osmotsko stabilnost ET klamidij omogoča kompleks beljakovin, ki so med sabo prečno povezane z disulfidnimi vezmi:

- poglavitne beljakovine zunanje ovojnice MOMP (angl. major outer membrane protein) z molekulsko maso 40 kDa
- s cisteinom bogati 60 kDa proteini (EnvA), ki so zasidrani v zunanji membrani s svojim lipidnim deležem, s hidrofilnim peptidnim delom pa segajo v periplazmo
- s cisteinom bogati bakterijski lipoproteini (EnvB) z nizko molekulsko maso, ki se nahajajo v periplazmi (Everett in sod., 1999; Everett in Hatch, 1995).

Bavoil in sodelavci so dokazali, da MOMP deluje tudi kot porin (Bavoil in sod., 1984). Z analizo sekundarne strukture so namreč razkrili, da je beljakovina MOMP sestavljena predvsem iz  $\beta$ -lističev (62 %), kar je značilnost bakterijskih porinov (Wyllie in sod., 1998). Prav tako ima MOMP antigenske determinante, ki so specifične za rod, vrsto in serotip (Vanrompay in sod., 1995).

Disulfidne vezi imajo v beljakovinah zunanje membrane pomembno vlogo pri ohranjanju celostne strukturne ET. Hkrati disulfidne vezi vplivajo na aktivnost tvorbe por (Bavoil in sod., 1984). Po okužbi z ET pride do kemiskske redukcije disulfidnih povezav znotraj proteinov in med proteini ovojnice. To privede do preoblikovanja ET v RT in povečane prepustnosti RT (Everett in sod., 1999; Wyllie in sod., 1998).

Beljakovina MOMP je prisotna tudi v zunanji membrani RT, vendar ne tvori prečnih povezav (Everett in Hatch, 1995). Pri RT je pomembna vloga beljakovine MOMP sprejem gostiteljevega ATP in drugih hranil (Wyllie in sod., 1998).

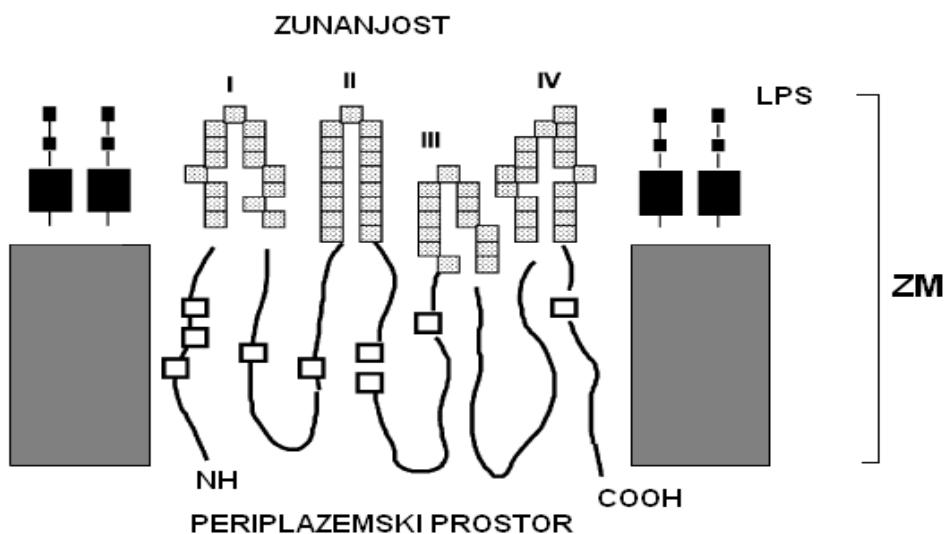
Pri po Gramu negativnih bakterijah pomemben del celične stene predstavlja peptidoglikan, ki je netopen v ionskih detergentih, kot je sarkosil. Ta del klamidijske celične stene je prav tako netopen v sarkosilu, čeprav ni prisotnega peptidoglikana. Peptidoglikan bakterijske celične stene je kovalentno zaprt polimer, kjer so glikanske verige iz kislinskih ostankov N-acetilglukozamina in N-acetilmuraminske kisline navzkrižno povezane s peptidi. V nasprotju z večino eubakterij pri klamidijah ne dokažemo tega esencialnega polimera. Vendar so klamidije dovezetne za D-cikloserin, bacitracin in penicilin, ki so inhibitorji peptidoglikana v celični steni. Sintetizirajo tudi tri penicilin vezavne proteine – PBP (angl. penicillin binding protein), ki so molekularne tarče penicilinskega delovanja (Ghuysen in Goffin, 1999). PBP imenujemo tudi transpeptidaze. To so encimi, ki sodelujejo v transpeptidazni reakciji, ki omogoča navzkrižno povezovanje dveh peptidnih verig v sintezi celične stene. PBP vežejo penicilin ali druge antibiotike z  $\beta$ -laktamskim obročem, kar ovira transpeptidazno aktivnost (Madigan in sod., 2003). Izpostavljanje penicilinu vodi do povečanih RT znotraj vključkov, ki se ne podvajajo z delitvijo na dvoje, temveč obstajajo v stanju perzistence (sposobnost za življenje je ohranjena, vendar RT ne zorijo v ET dokler penicilina ne odstranimo iz kulture) (Raulston in Wyrick, 2000). Ghuysen in Goffin sta na osnovi raziskav s *C. trachomatis* ugotovili, da klamidije ne sintetizirajo peptidoglikana, ker jim manjka glikoziltransferaza za podaljšanje glikanske verige iz lipida II (Ghuysen in Goffin, 1999).

V membrani klamidijskega vključka se nahajajo proteini imenovani Inc (angl. inclusion membrane protein). Pri *C. psittaci* so opisali tri proteine: IncA, IncB in IncC (Rockey in sod., 1995; Bannantine in sod., 1998). IncA *C. psittaci* GPIC (angl. guinea pig inclusion conjunctivitis) sega proti citoplazemski strani vključka, kjer kinaze gostiteljske celice fosforilirajo serinske in treoninske ostanke IncA (Rockey in sod., 1997). IncA *C. trachomatis* sodeluje pri združevanju klamidijskih vključkov, medtem ko pri vključkih *C. psittaci* GPIC nastanejo samo skupki klamidijskih vključkov, ne pride pa do združevanja (Rockey in sod., 2002). Domnevajo, da je funkcija večih vključkov povečanje površine membrane vključka za povečano pridobivanje energije in metabolitov (Wyrick, 2000).

*Chlamydia spp.* kodira družino polimorfnih proteinov zunanje membrane – POMP (angl. polymorphic outer membrane protein) ali Pmp (angl. polymorphic membrane protein). Ugotovili so, da se proteini Pmp sintetizirajo v pozni fazi klamidijskega razvojnega kroga sočasno s cistein bogatimi periplazemskimi proteinimi. Tako očitno niso potrebni pri rasti in celični delitvi (Tanzer in sod., 2001). Pri *C. psittaci* 6BC so identificirali 7 genov *pmp*, ki so sorodni s *C. abortus* *pmp90A/B* in *pmp91A/B* (Laroucau in sod., 2007)

#### 2. 4. 1. 1 Antigeni *C. psittaci*

Najbolj preiskovan antigen *C. psittaci* je beljakovina MOMP (Slika 4). Le-ta ima antigenske determinante, na podlagi katerih razlikujemo posamezne serotipe bakterije. MOMP se nahaja v zunanji membrani kot disulfidni oligomer (Vlahović in sod., 2002). Za tipizacijo izolatov klamidij se uporabljajo monoklonska protitelesa (Andersen, 1991; Vanrompay in sod., 1993). Ta protitelesa prepoznajo specifične regije na površini izpostavljenih epitopov MOMP klamidij (Vanmropay in sod., 1995).



Slika 4: Shema poglavitne beljakovine zunanje ovojnice – MOMP v klamidijski celični steni. Neprekinjena črta predstavlja v zunanjem membrano (ZM) vstavljeni peptidno verigo MOMP, sivi kvadrati predstavljajo variabilne domene (VD I–IV), beli kvadrati so ohranjeni cisteini. Prisotnost lipopolisaharida – LPS (črne kocke) je nakazana kot del zunanje membrane (Vanrompay in sod., 1995).

MOMP predstavlja 60 % teže zunanje membrane. Obstajajo dokazi, da imajo protitelesa za površinsko dostopne epitope MOMP zaščitno vlogo pri imunosti na klamidijsko okužbo (Vanrompay in sod., 1995).

Klamidijski lipopolisaharid (LPS) je tudi osnovna sestavina zunanje membrane in tako kot MOMP predstavlja površinsko izpostavljen antigen klamidij tako pri ET kot pri RT. LPS ima molekulsko težo 10 kDa in je kemično ter serološko soroden z LPS po Gramu negativnih bakterij (Andersen in Vanrompay, 2003). Klamidijski LPS vsebuje antigenske determinante, ki navzkrižno reagirajo z LPS po Gramu negativnimi bakterijami *Acinetobacter calcoaceticus* in Re mutantami *Salmonella* sp. (Nurminen in sod., 1984; Brade in sod., 1985). Vendar LPS klamidij vsebuje v svojem saharidnem deležu trisaharid 3-deoksi-D-mano-2-oktulosonsko kislino (Kdo), ki se povezuje z (2–8) in (2–4) vezmi (Brade in sod., 1987). Ta antigenski epitop imajo samo predstavniki rodu *Chlamydia* in *Chlamydophila*. Tako predstavlja za družino *Chlamydiaceae* specifičen antigen (Heine in sod., 2003).

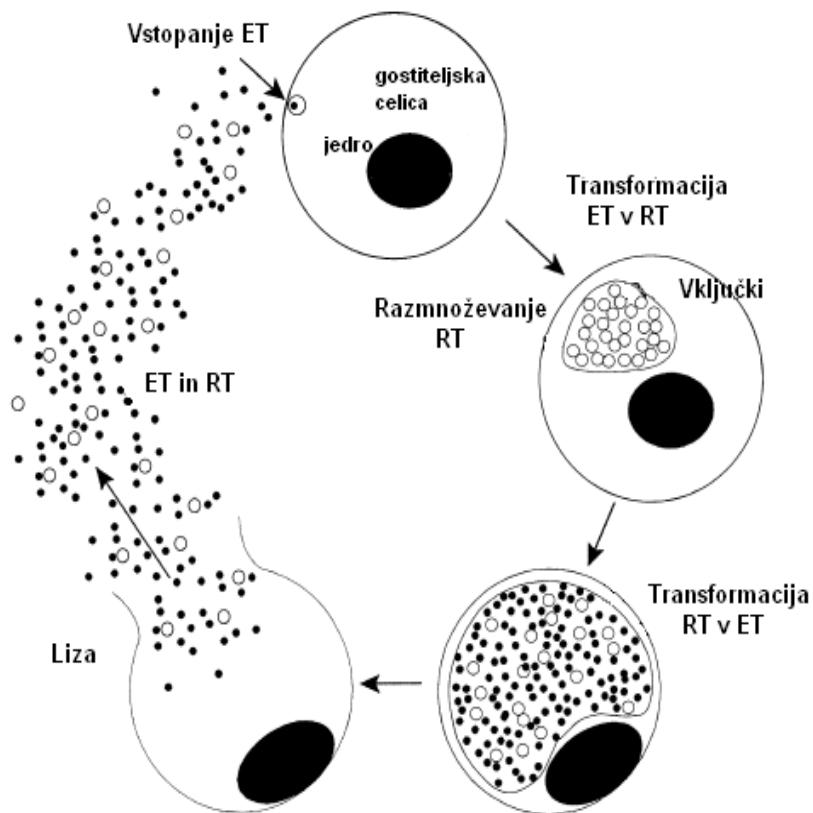
Ugotovili so, da ima LPS klamidij, v primerjavi z drugimi po Gramu negativnimi bakterijami, nizko endotoksično aktivnost (Brade in sod., 1986). Heine in sodelavci so dokazali, da je LPS *C. psittaci* najmanj 10-krat manj aktiven kot ostali endotoksini (Heine in sod., 2003). Nizko endotoksično aktivnost pripisujejo nenavadnemu vzorcu acilacije, ki povečuje hidrofobnost LPS (Brade in sod., 1986). Daljša dolžina acilnih verig in nizko število acilnih verig lahko vplivata na nizko endotoksično aktivnost (Ingalls in sod., 1995). Prav tako je nizka aktivnost lahko rezultat evolucijskega prilagajanja klamidij na perzistenco znotraj gostiteljske celice (Sahachter in Caldwell, 1980 cit. po Brade in sod., 1986).

#### **2. 4. 2 Razvojni krog bakterije *C. psittaci***

Razvojni krog klamidij razdelimo v naslednje stopnje:

- pritrditev ET na celično membrano
- vstop ET v gostiteljevo celico
- sprememba ET v RT znotraj vključka
- razmnoževanje RT z delitvijo na dvoje
- sprememba RT v ET
- liza celičnega vključka in sprostitev ET (Kayser in sod., 2005).

Prva stopnja v razvoju klamidijske infekcije je pritrjanje ET na receptorska mesta v celični membrane gostiteljeve celice. Sledi vstopanje ET (Slika 5) (Keše, 2002).



Slika 5: Razvojni krog klamidij (Everett, 2000).

Verjetno imajo klamidije več kot en mehanizem vstopa v celico (Hodinka in Wyrick, 1986). Stephens je opisal mehanizem povezave med klamidijsko in evkarijontsko celico, pri katerem glikozaminglikanu (GAG) podobna molekula na površini omogoča pritrditev. Klamidije sintetizirajo molekulo, ki posnema heparan sulfat in jo uporablja pri pritrditvi na evkarijontske celice na receptorje za heparan sulfat (GAG) (Stephens 1992 cit. po Vanrompay in sod., 1995).

Prisotnosti dvovalentnih kationov ( $\text{Ca}^{2+}$  in  $\text{Mg}^{2+}$ ), ki zmanjšujejo elektrostatični odboj med evkarijontsko in bakterijsko celico, pospeši pritrjevanje *C. psittaci* na evkarijontske

celice (Hatch in sod., 1981). Ugotovili so, da je površina *C. psittaci* hidrofobna in negativno nabita pri pH 7 (Vance in Hatch, 1980). K uspešni fagocitozi pa pripomorejo tudi hidrofobne sile (Escalante - Ochoa in sod., 1998). Pomembno vlogo ima tudi beljakovina MOMP, ki deluje kot adhezin. Vstop ET je odvisen tako od kontinuirane integritete membrane kot od metabolne aktivnosti gostiteljske celice (Escalante - Ochoa in sod., 1998).

Po vstopu v gostiteljsko celico najdemo klamidije v citoplazemskih vključkih, ki nastanejo z invaginacijo membrane gostiteljske celice med prehodom klamidij (Vanrompay in sod., 1995). Pri fagocitozi klamidij se fagosom in lizosom ne spojita in tako ostane mikrob skozi ves razvojni ciklus nepoškodovan (Mehle in Bole - Hribovšek, 2000). Infektivno ET se nato preoblikuje v neinfektivno RT, ki začne z delitvijo. Vse to se dogaja znotraj vključka. Po razmnoževanju, ki traja 16 do 20 ur, se RT v vključku preoblikujejo nazaj v ET, ki se nato sprostijo iz gostiteljske celice (Vanrompay in sod., 1995). V okuženi celici se razvije od 10 do 1000 novih ET (Naglić in sod., 2005).

Po vstopu ET v gostiteljsko celico se spremeni celična stena infektivnih teles. V zunanji membrani ET so disulfidne vezi navzkrižno povezane, kar daje zunanji membrani trdnost. Prehod v znotrajcelično RT spremlja redukcija disulfidnih vezi in s tem povečana prepustnost membrane (Bavoil in sod., 1984).

Mehanizem sproščanja klamidij ni jasen. Klamidije se lahko sprostijo iz gostiteljske celice s celično lizo (Vanrompay in sod., 1995). Todd in Caldwell (1985) sta predstavila morfološke dokaze sproščanja ET brez celične lize. Lahko pa pride tudi do perzistentne okužbe (Moulder in sod., 1980).

## 2. 4. 3 Metabolizem

Zaradi edinstvenega znotrajceličnega razvojnega kroga ter odpornosti na gensko manipulacijo je malo znanega o molekularnem mehanizmu klamidijske okužbe (Bavoil in sod., 2000).

Tako pri ET kot pri RT so dokazali prisotnost DNA in RNA (Wyrick in Richmond, 1989). Vendar je količina RNA in DNA višja pri RT (Andersen in Vanrompay, 2003). Znotraj gostiteljske celice RT izvršuje samostojno sintezo nukleinske kisline, sintezo proteinov in aminokislin (Hatch in sod., 1982). Nekatere metabolne sposobnosti pa so omejene v primerjavi s prostoživečimi bakterijami. Ne morejo končati pentoznega cikla in ne uporabljajo piruvata preko cikla trikarboksilinske kisline (Andersen in Vanrompay, 2003). Vendar lahko katabolizirajo piruvat, aspartansko in glutaminsko kislino, kjer pridobijo CO<sub>2</sub> ter 2- in 4-karbonske ostanke (Moulder, 1969 cit. po Vanrompay in sod., 1995).

Klamidije so tekom evolucije izgubile sposobnost sinteze energetskih molekul, zato so odvisne od celic gostitelja, v katerem parazitirajo. RT ne more ustvariti visokoenergijske fosfatne vezi pri metabolizmu številnih sladkorjev in aminokislin (Vanrompay in sod., 1995). Klamidije tako uporabljajo ATP gostiteljske celice s pomočjo specifičnih prenašalnih beljakovin, ki katalizirajo vnos ATP v prokariontsko celico preko bakterijske celične membrane. Le-ta je sicer nepropustna za relativno velike in nabite molekule. V obratni smeri pa prenašalne beljakovine omogočijo prenos bakterijske ADP nazaj v gostiteljski citosol (Schmitz - Esser in sod., 2004).

V celicah, okuženih s *C. psittaci*, je mitohondrij v tesni povezavi z vključkom (Wyrick, 2000). Možno je, da je zaradi fizične bližine pospešen prenos ATP iz mitohondrija v klamidijsko celico (Escalante - Ochoa in sod., 1998)

Potem, ko se po vstopu klamidij v gostiteljsko celico klamidijski vključek izogne lizosomu, le-ta fuzira s sfingomielinskimi vezikli gostiteljske celice. Ti lipidi prihajajo iz Golgijevega aparata okužene celice, ki se verjetno zaradi olajšanega prenosa nahaja v bližini klamidijskega vključka (Hackstadt in sod., 1997). Do večanja klamidijske inkruzije prihaja zaradi lipidne sinteze (Wyrick, 2000). Wylie in sodelavci so dokazali, da poleg sfingomielina iz Golgijevega aparata, klamidijska inkruzija pridobi še fosfatidilinozitol, fosfatidilholin in holesterol iz endoplazemskega retikulumu in mitohondrija gostiteljske celice (Wylie in sod., 1997).

## 2. 5 GENETIKA BAKTERIJE *C. psittaci*

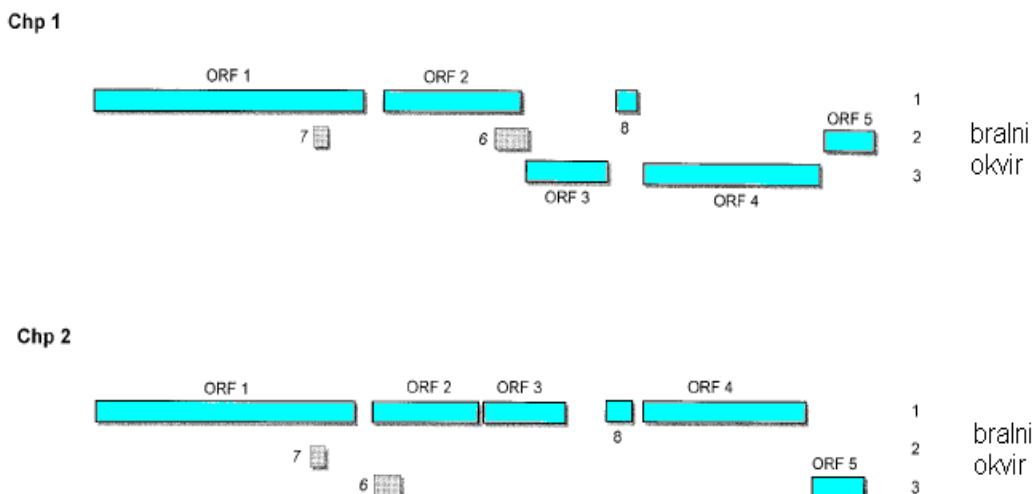
Prisotnost ribosomalne RNA (rRNA) v ET *C. psittaci* je bil prvi znak, da se klamidije razlikujejo od virusov (Tamura in Higashi, 1963 cit. po Vanrompay in sod., 1995).

Geni 16S rRNA različnih serotipov *C. psittaci* se med sabo razlikujejo za manj kot 0,8 % (Everett in sod., 1999). Številni sevi *C. psittaci* imajo prisoten zunajkromosomski plazmid (Everett in sod., 1999). Thomas in sodelavci so proučevali genetsko raznolikost plazmidov pri klamidijah. Iz račjega seva N325 *C. psittaci* so določili 7553 bp velik plazmid (pCpA1) (Thomas in sod., 1997).

Primerjava podatkov med različnimi klamidijami ni razjasnila splošne biološke funkcije plazmidov, vendar je pokazala precejšno ohranjenost zaporedja (manj kot 60 %) in izredno dosledno razvrstitev genoma. Klamidijski plazmidi so med seboj bolj sorodni kot kromosomalna DNA. Vsi klamidijski plazmidi imajo osem glavnih odprtih bralnih okvirjev – ORF (angl. open reading frame), daljših od 100 aminokislin in štiri 22 bp dolge tandemske ponovitve v intergenskih regijah med ORF 8 in ORF 1. Obsežna ohranjenost zaporedja med plazmidi različnih klamidij nakazuje evolucijski razvoj plazmidov iz skupnega prednika (Thomas in sod., 1997). Sevi *C. psittaci*, ki povzročajo splav pri prežvekovalcih (*C. abortus*), nimajo prisotnega plazmida (Everett in sod.,

1999; Van Loock in sod., 2003), medtem ko imajo sevi *C. psitaci*, ki povzročajo okužbe mačk (*C. felis*) in morskih prašičkov (*C. caviae*), prisotne plazmide (Everett, 2000).

Bakteriofage (klamidiofage) pri *C. psittaci* so prvič opisali leta 1982, ko so pri racah odkrili dva izolata *C. psittaci*, ki sta vsebovala fage. Bakteriofag so poimenovali Chp1. Pomnožuje se v RT *C. psittaci*. Ugotovili so, da gre za 22 nm velik ikozaedrični virus (Richmond in sod., 1982). Hibridizacijske študije s kloniranimi fragmenti DNA Chp1 so pokazale, da DNA faga ne vstopa v klamidijski kromosom in ni soroden plazmidu, ki ga najdemo pri mnogih klamidijskih sevih (Storey in sod., 1989b). Poliakrilamidna elektroforeza – PAGE (angl. polyacrylamide gel electrophoresis) je pokazala, da je bakteriofag Chp1 sestavljen iz treh velikih strukturnih proteinov VP1, VP2 in VP3 z molekulskimi masami 75, 30 in 16,5 kDa, ki jih kodirajo ORF 1, ORF 2 in ORF 3 (Storey in sod., 1989b). Genomsko zaporedje enoverižne krožne DNA je dolgo 4877 bp in lahko kodira 11 proteinov. Chp1 vsebuje osem ORF. ORF 6 in ORF 7 ležita znotraj ORF 2 in ORF 1 (Slika 6). ORF 8 lahko kodira beljakovine, vendar ni funkcionalen.



Slika 6: Primerjava računalniške analize odprtih bralnih okvirjev – ORF in organizacija genoma klamidiofagov Chp1 in Chp2. Modri kvadrati predstavljajo glavne ORF, ki lahko kodirajo funkcionalne proteine. Sivi kvadrati (ORF 6 in ORF 7) se prekrivajo z ORF 1 in ORF 2 (Liu in sod., 2000).

Izkazalo se je, da je Chp1 soroden dobro opisanemu bakteriofagu *Escherichia coli*, φX174, iz virusne družine *Microviridae*. Aminokislinska homologija in podobnost v organizaciji genoma Chp1 in ostalih predstavnikov *Microviridae* nakazujejo, da so se razvili iz skupnega prednika (Storey in sod., 1989a).

Liu in sodelavci (2000) so prvi opisali bakteriofag Chp2, ki okužuje ovče seve *C. psittaci* (*Chlamydophila abortus*). Računalniška analiza krožnega genoma Chp2 je pokazala prisotnost osmih ORF, kar je podobno organizaciji genoma Chp1 (Slika 6).

Chp2 in Chp1 imata podobno morfologijo, vendar ima Chp2 drugačen citopatološki učinek na RT. Elektronska mikroskopija je pokazala majhno spremembo v velikosti in obliki neokuženih RT in RT okuženih s Chp2. To je v nasprotju z RT, okuženimi s Chp1, kjer se RT povečajo in se klamidofagi kopičijo v obliki parakristalnih vrst (Liu in sod., 2000). Dokazali so, da Chp2 lahko okužuje poleg *C. abortus* tudi *C. felis* in *C. pecorum*, vendar ne more okužiti ostalih predstavnikov rodu *Chlamydophila* (Everson in sod., 2002).

Hsia in sodelavci so leta 2000 poročali o bakteriofagu φCPG1, ki okužuje sev *C. psittaci* (*Chlamydophila caviae*), ki povzroča vnetje očesne veznice pri morskih prašičkih. Posledica okužbe klamidij z bakteriofagom φCPG1 je spremenjena pot razmnoževanja. Celična delitev je ovirana. Otežuje jo nenormalno velika RT, ki ne zorijo v ET (Hsia in sod., 2000). Read in sodelavci (2000) so primerjali klamidijske fage φAR39 (*C. pneumoniae*), φCPG1 in Chp2 s klamidijskim fagom Chp1 *C. psittaci*. Čeprav si vsi širje fagi delijo identično razvrstitev petih glavnih genov, se Chp1 bistveno razlikuje v nukleotidnem in proteinskem zaporedju od ostalih treh fagov, med katerimi je sorodnost genoma več kot 90% (Read in sod., 2000).

Gen *ompA* kodira poglavito beljakovino zunanje membrane – MOMP. Vsebuje pet ohranjenih in štiri variabilne regije (angl. variable sequence regions, VS) VS1 do VS4, ki kodirajo domene variabilnih beljakovin (angl. variable protein domains, VD) VDI do VDIV. VDI, VDII in VDIV še posebaj štrlico iz membrane *C. psittaci* (Slika 4).

Mapiranje epitopa je pokazalo, da se rodovno in vrstno specifične antigenske determinante nahajajo znotraj ohranjene regije. Vendar so vrstno specifične antigenske determinante našli tudi znotraj ohranjenih delov VDIV (Vanrompay in sod., 1995).

Molekularno proučevanje persistence *C. psittaci* je pokazalo sposobnost patogena, da odgovori na izzive gostitelja s spremenjanjem izražanja specifičnih genov mRNA. Ta sprememba vodi v stanju persistence do oviranja ali popolne ustavitev izražanja mRNA. Reverzibilnost tega stanja kaže na zmožnost klamidijskega odziva in nudi razlago za številne posebnosti, kot so kronična klamidioza, neuspešno antibiotično zdravljenje in imunoprofilaksa ter praktične težave pri izolaciji in kultivaciji sevov iz okuženih tkiv (Goellner in sod., 2006).

Geens in sodelavci so leta 2005 odkrili nov genotip *C. psittaci* E/B. Tako sedaj poznamo 7 znanih genotipov: genotip A, B, C, D, E, F in E/B (Geens in sod., 2005a). Vsak genotip je bolj ali manj povezan s specifično skupino ptic iz katerih je običajno izoliran (Heddem in sod., 2006a).

Genotipizacijo *C. psittaci* lahko izvedemo s sekvencioniranjem gena *ompA* (Vanrompay in sod., 1997) ali z analizo RFLP (Sudler in sod., 2004). Genotipe razlikujemo tudi z metodo PCR v realnem času, kjer se uporablja genotipsko-specifičen gen *ompA* (Geens in sod., 2005b).

## 2. 6 EPIDEMIOLOGIJA BAKTERIJE *C. psittaci*

Klamidije so najbolj poznane po boleznih, ki jih povzročajo pri ljudeh. Vendar te znotrajcelične bakterije vključujejo številne druge vrste, ki so odgovorne za široko raznolikost kliničnih in ekonomsko pomembnih bolezni pri živalih, ki živijo v skupinah (Everett, 2000).

Epidemiologija klamidijskih okužb ima nekaj skupnih lastnosti. Zaradi dolgega razvojnega cikla (48 do 72 ur) je inkubacijska doba relativno dolga (1 do 3 tedne). Pogoste so persistentne okužbe, ki so klinično nezazanavne (Schachter, 1990).

Okužbe s *C. psittaci* so razširjene po celem svetu (Naglić in sod., 2005). Zaradi zoonotičnega potenciala morajo biti upoštevani varnostni ukrepi pri ravnanju z okuženimi pticami ali kontaminiranim materialom (Andersen in Vanrompay, 2003). Zunaj gostitelja zadržijo klamidije infektivnost nekaj dni do nekaj tednov. Dlje pri nižji temperaturi (Naglić in sod., 2005).

Epidemiološke raziskave so potrebne pri nadzorovanju prenosa *C. psittaci* pri pticah in ljudeh. Epidemiološka preiskava mora biti vpeljana:

- če je bila ptica, pri kateri so potrdili klamidiozo (ornitozo), dobljena iz trgovine z živalmi ali od rejca ptic znotraj 60 dni od začetka pojavljanja znakov
- če je bila ptica v stiku z ljudmi, pri katerih je bila potrjena psitakoza
- če so bili ugotovljeni številni domnevni primeri iz istega vira (NASPHV, 2008; CDC, 2000).

## 2. 6. 1 Ptice

Naravni gostitelji *C. psittaci* so ptice (Kayser in sod., 2005). Okužbo z bakterijo pri pticah imenujemo klamidioza ali ornitoza, lahko tudi psitakoza (Vanrompay in sod., 1995). *C. psittaci* povzroča okužbo respiratornih organov, prebavne poti, genitalnih poti in očesne veznice papig ter ostalih ptic (Kayser in sod., 2005).

Kaleta in Taday sta objavila podatke o številu vrst okuženih ptic s klamidiozo. V raziskavi so ugotovili, da lahko *C. psittaci* okuži 467 prostoživečih ali domačih vrst ptic, ki jih uvrščamo v 30 rodov (Kaleta in Taday, 2003).

Red *Psittaciformes* (papige) naj bi vseboval največ vrst (45 %), ki so okužene s *C. psittaci*. Prav tako je veliko vrst, več kot 20 %, okuženih znotraj redov *Lariformes*

(galebi), *Sphenisciformes* (pingvini) in *Anseriformes* (race in gosi). Samo 5 % vseh ptičjih vrst znotraj reda *Phasianiformes* (kure) se lahko okuži s *C. psittaci* (Kaleta in Taday, 2003).

Obstajajo številne poti okužb pri pticah. Do prenosa klamidij lahko pride preko inhalacije ali zaužitja kontaminiranega materiala. Veliko število klamidij najdemo v izločkih respiratornega trakta in v fekalnem materialu okuženih ptic. Direkten aerosolni prenos respiratornega izločka naj bi bila primarna pot prenosa med izbruhom bolezni (Andersen in Vanrompay, 2003). Klamidije se lahko razširjajo po organizmu. S tem pa se omogoča tudi širjenje klamidij v okolico, predvsem z izločenim blatom (Dovč in sod., 2000).

Odrasle papagajske vrste hranijo svoje potomce z bljuvanjem. Samci bljuvajo hrano samicam med valjenjem jajc. Tako je tudi oralna pot pogosta pot prenosa, saj je hrana lahko kontaminirana s klamidijo v izločkih ptičje golše, nosne votline in žrela (Freitas Raso in sod., 2006).

## 2. 6. 2 Človek

V Parizu so leta 1893 prvič poročali o prenosu okužbe iz papige na človeka, ki je povzročil prehladu podobne simptome. Bolezen so poimenovali psitakoza, po latinski besedi *psittacus*, ki pomeni papiga (Vanrompay in sod., 1995). Kasneje so dokazali povezavo med klamidiozo drugih vrst ptic in njenim možnim prenosom na ljudi. Tako je bil uveden nov pojem, ornitoza (gr. *ornithos* – ptica). S tem so se kot vir okužbe prepoznale tudi druge vrste ptic (Vlahović in sod., 2002). Oba naziva se še vedno uporabljata, vendar v novejšem času dobivata prednost naziva ptičja klamidioza oziroma ptičja klamidofiloza (Naglić in sod., 2005).

Incidenca psitakoze pri ljudeh narašča v industrializiranih državah in je povezana z uvozom eksotičnih ptic (Vanrompay in sod., 2007). Do večine okužb pri ljudeh prihaja zaradi izpostavljenosti ptičjim hišnim ljubljenčkom. Te ptice imajo običajno

gastrointestinalno okužbo. Tako se okužba širi preko vdihovanja aerosolov infektivnega fecesa (Schachter, 1990).

Do izbruha bolezni pri ljudeh pride v primeru tesnega ali stalnega stika med ljudmi in okuženimi pticami. Osebe, ki so najpogosteje izpostavljene nevarnosti okužbe, so rejci ptic, ljudje zaposleni v perutninarnstvu (klavnice in predelovalne tovarne), veterinarji, veterinarski tehniki, laboratorijski delavci, kmetje in delavci v živalskih vrtovih (CDC, 1997; Andersen in Vanrompay, 2003; Heddema in sod., 2006b; Sewell, 1995; Hinton in sod., 1993).

Raziskava v 80. letih je pokazala, da izpostavljenost pticam v kletkah predstavlja 70 % primerov psitakoze, pri katerih je vir okužbe znan. Med njimi največje število okuženih ljudi predstavljajo rejci in lastniki ptic (43 %), zaposleni v trgovinah z živalmi pa predstavljajo dodatnih 10 % primerov (CDC, 1997).

Okužbo ljudi lahko povzroči tudi kratka (prehodna) izpostavljenost pticam ali njihovim izločkom. Zato se lahko okužijo tudi ljudje, ki jih ne uvrščamo v rizične skupine (CDC, 1997).

## 2. 7 PATOGENEZA BAKTERIJE *C. psittaci*

Pomembna lastnost klamidij so trajne, klinično tihe okužbe ljudi in živali, ki omogočajo obstanek in širjenje povzročitelja v populaciji (Naglić in sod., 2005).

Vključke *C. psittaci* lahko najdemo v alveolarnih makrofagih in epitelijskih celicah. Organizem se preko krvožilnega sistema razširja na različna mesta (Schachter, 1990).

### 2. 7. 1 Okužba s *C. psittaci* pri pticah

Pomembno je ugotoviti okužbo, ki se lahko prenaša s pticami, saj so ptice lahko vir okužbe za druge živali in za ljudi. Čeprav mnoge ptice ne kažejo kliničnih znakov bolezni, predstavljajo potencialne prenašalce bakterijskih, virusnih in parazitskih bolezni (Dovč in sod., 2004).

Seve *C. psittaci* razdelimo glede na patogenost v dve splošni skupini:

- visoko virulentni sevi, ki povzročajo akutne epidemije, pri katerih pogine 5–30 % okuženih ptic
- manj virulentni sevi, ki povzročajo počasi napredajoče epidemije (Andersen in Vanrompay, 2003).

Sevi obeh skupin imajo enako sposobnost širitve v jati. Visoko virulentni sevi so največkrat izolirani iz puranov in občasno iz klinično zdravih ptic. Sevi nizke virulence pa imajo manj kot 5% smrtnost in potekajo brez komplikacij s sekundarnimi bakterijskimi ali parazitskimi okužbami. Sevi z nizko virulenco so pogosteje izolirani iz golobov in rac ter občasno iz puranov, vrabcev in drugih divjih ptic (Andersen in Vanrompay, 2003).

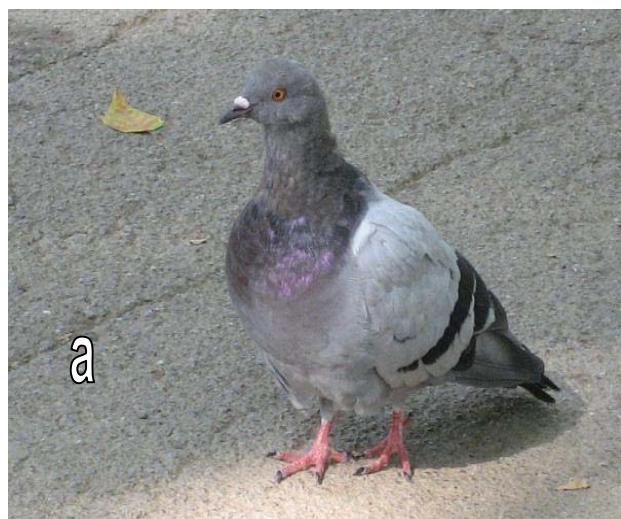
Klinična slika se razlikuje glede na virulenco povzročitelja in vrsto gostitelja. Klinično zdrave živali lahko izločajo povzročitelja tudi več let (Dovč, 1998).

Veliko število eksotičnih vrst divjih ptic se prodaja na črnem trgu. Ko ptice ulovijo, jih odstranijo iz njihovega naravnega okolja. Nezadostni higienski pogoji, hrnanje in preveliko število ptic na enem mestu vpliva stresno na ptice, kar oslabi njihov imunski sistem (Dovč in sod., 2000; Freitas Raso in sod., 2006). Ptice v ujetništvu so tako bolj dovezetne za okužbe. Do izraza pridejo predvsem latentne okužbe (Freitas Raso in sod., 2006). Ptice so na videz zdrave, vendar so lahko prenašalke *C. psittaci*, ki mikroorganizme sproščajo občasno. Ker je *C. psittaci* odporna na izsuševanje, lahko ostane infektivna tudi do nekaj mesecev (CDC, 1997).

#### 2. 7. 1. 1 Prostoživeči golobi

Populacija prostoživečih golobov se povečuje v vsakem večjem mestu po svetu. V Ljubljani so ocenili, da živi približno 5000 mestnih golobov (Dovč in sod., 2004).

Slika 7 prikazuje mestnega goloba (*Columba livia domestica*), slikanega na različnih lokacijah po Ljubljani.



Slika 7: Mestni golobi na različnih lokacijah po Ljubljani. a) Mestni golob (*Columba livia domestica*), b) Kongresni trg v Ljubljani c) Streha hiše v centru Ljubljane d, e) Mestna tržnica v Ljubljani.

Ugotovili so, da so golobi najpogosteje okuženi z genotipom B *C. psittaci* (Geens in sod., 2005a; Heddema in sod., 2006a; Vanrompay in sod., 1993; Vanrompay in sod., 1997).

Neposreden stik prostoživečih in pasemskih golobov ima z epizootiološkega stališča velik pomen, saj se obolenje zlahka prenaša tudi na pasemske golobe, s katerimi so ljudje v tesnem stiku (Dovč in sod., 2000). Poleg tega obstaja tudi tveganje okužbe perutnine in hišnih ptic, ki tudi živijo v tesnem stiku z ljudmi (Heddema in sod., 2006a).

Čas med izpostavljenostjo bakteriji in začetkom bolezni pri pticah v kletkah je od treh dni do nekaj tednov (CDC, 1997). Vendar se akutna bolezen lahko pojavi šele leta po izpostavljenosti. Bolezen lahko poteka asimptomatsko, v akutni ali kronični obliki, kar je odvisno od vrste ptice, virulence seva, infektivne doze, stresnih faktorjev, starosti in obsegu zdravljenja ali profilakse (CDC, 2000).

Inkubacijska doba pri golobih ni znana. Okužba je endemična in se primarno ohranja zaradi prenosa med ptičjim mladičem in staršem (Andersen in Vanrompay, 2003). Lahko se opazi neješčost, apatija, driska in serozno gnojen izcedek iz nosnic in oči (Dovč in sod., 2000). Simptomi klamidioze pri golobih so različni. Pri akutnih boleznih se pojavlja anoreksija, diareja in slaba rast (Andersen in Vanrompay, 2003). Anoreksične ptice lahko izločajo redke, temnozelene izločke (CDC, 2000). Pri nekaterih golobih pa se razvije vnetje očesne veznice in nosne sluznice, veke otečejo. Respiratorne težave spreminja hropenje. Ko bolezen napreduje, ptica oslabi in shujša. Pri nekaterih pticah okužba poteka brez vidnih znakov ali pa imajo okužene ptice le prehodno diarejo, preden postanejo prenašalci (Andersen in Vanrompay, 2003).

Ptice, ki imajo potrjeno klamidiozo in ptice, pri katerih sumimo na klamidiozo, morajo biti v izolaciji in zdravljene. Zaželen je nadzor veterinarjev (CDC, 1997). Cepljenje in

pametna uporaba antimikrobnih zdravil pri pticah sta potrebna za preprečevanje psitakoze pri ljudeh, kot tudi za preprečevanje razvoja bakterijskih sevov, ki so odporni na zdravila (Vanrompay in sod., 2007).

### **2. 7. 2 Okužba s *C. psittaci* pri sesalcih**

Po stari taksonomiji je bila *C. psittaci* poznana tudi kot povzročiteljica okužb pri različnih sesalcih. Sev *C. psittaci*, ki povzroča splav pri prežvekovalcih, so po novi taksonomiji preimenovali v *Chlamydophila abortus*. *C. abortus* kolonizira placento in primarno povzroča splav in skotitev slabotnega novorojenčka. *C. abortus* je endemična bakterija med prežvekovalci. Izolirali so jo pri ovcah, govedu in kozah povsod po svetu. Prav tako jo povezujejo s splavi pri konjih, zajcih, morskih prašičkih, miših in svinjah (Everett, 2000; Everett in sod., 1999). Zdrave živali se hitro okužijo od obolelih v času splava, ko se s placento in izcedkom maternice izloča velika količina klamidij v okolico, kjer ohranjajo infektivnost nekaj dni (Naglić in sod., 2005). Opisani so tudi primeri žensk, ki so delale z ovčami in so splavile zaradi *C. abortus* (Jorgensen, 1997; Hyde in Benirschke, 1997; Kampinga in sod., 2000).

Od *C. psittaci* so ločili tudi sev, ki povroča okužbo morskih prašičkov. Tipski sev je bil izoliran iz morskega prašička (*Cavia cobaya*), od tod tudi ime *Chlamydophila caviae*. Vsi znani izolati imajo identično zaporedje v genu *ompA*. Izolirali so ga iz očesne veznice morskih prašičkov, kjer povzroča očesno vnetje z izcedkom. *C. caviae* primarno okužuje mukozni epitelij in ni invazivna (Everett, 2000).

*C. psittaci*, ki povroča okužbo pri mačkah (lat. *felis*) povsod po svetu, so preimenovali v *Chlamydophila felis*. Z bakterijo je lahko okuženo do 10 % mačk. Povzroča vnetje očesne veznice, rinititis in respiratorne težave. Živali večinoma spontano ozdravijo v nekaj tednih, lahko pa ostanejo latentno okužene in širijo povzročitelja ter pod določenimi pogoji ponovno zbolijo. Poročali so o zoonotični okužbi ljudi s *C. felis* (Everett, 2000; Naglić in sod., 2005).

## 2. 7. 3 Okužba s *C. psittaci* pri človeku

*C. psittaci* povzroča pri ljudeh psitakozo, ki običajno poteka kot pljučnica (CDC, 2000). Najpogostejši prenašalci mikroba na ljudi so papige in golobi (Dovč, 1998; Sudler in sod., 2004).

Človek se okuži z vdihovanjem aerosolnih delcev posušenih izločkov ptic ali pri obdelavi okuženega mesa (Keše, 2002). Do prenosa okužbe lahko pride ob stiku ust s kljunom ptic in pri rokovjanju s perjem okuženih ptic. Tudi kratka izpostavljenost lahko vodi do simptomatske okužbe. Zato se nekateri bolniki s psitakozo ne spominjajo in ne poročajo, da so imeli stik s pticami (NASPHV, 2008).

Preden so bila na razpolago ustreznna antimikrobna zdravila, je bila smrtonosnost visoka (več kot 20%). Največ smrtnih primerov je bilo pri ljudeh starejših od 50 let (Schachter, 1990). Sedaj je zdravljenje psitakoze s tetraciklini (z ustreznimi zdravili) uspešno in bolezen je redkeje življenjsko ogrožajoča (Schachter, 1990; CDC, 2000).

CDC je leta 2007 objavil poročilo prijavljenih psitakoz (Summary of Notifiable Disease) za leto 2005, ko so v Ameriki zabeležili 16 primerov psitakoze. Od 1990 do 2005 je bilo prijavljenih 791 primerov okužb (Preglednica 1). Glede na prejšnja leta število primerov vsako leto upada (CDC, 2007). Ker je diagnoza psitakoze lahko težavna, predstavljajo prijavljeni primeri psitakoze podcenjeno število dejanskega števila okužb (CDC, 1997).

Preglednica 1: Prijavljeni primeri psitakoze v Ameriki od 1995 do 2005 (CDC, 2007).

Reported cases of notifiable diseases — United States, 1990–1997								
Disease	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997
Leptospirosis	77	58	54	51	38	†	†	†
Lyme disease	†	†	9,895	8,257	13,043	11,700	16,455	12,801
Lymphogranuloma venereum	277	471	302	285	235	†	†	†
Malaria	1,292	1,278	1,087	1,411	1,229	1,419	1,800	2,001
Measles	27,786	9,643	2,237	312	963	309	508	138
Meningococcal disease, invasive	2,451	2,130	2,134	2,637	2,886	3,243	3,437	3,308
Mumps	5,292	4,264	2,572	1,692	1,537	906	751	683
Murine typhus fever	50	43	28	25	†	†	†	†
Pertussis	4,570	2,719	4,083	6,586	4,617	5,137	7,796	6,564
Plague	2	11	13	10	17	9	5	4
Poliomyelitis, paralytic	6	10	6	4	8	7	7	6
Psittacosis	113	94	92	60	38	64	42	33

Reported cases of notifiable diseases — United States, 1998–2005								
Disease	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005
Hemolytic uremic syndrome, postdiarrheal	119	181	249	202	216	178	200	221
Hepatitis, viral, acute***								
A	23,229	17,047	13,397	10,609	8,795	7,653	5,683	4,488
B	10,258	7,694	8,036	7,843	7,996	7,526	6,212	5,119
C	3,518	3,111	3,197	3,976	1,835	1,102	720	652
Influenza-associated pediatric mortality	**	**	**	**	**	**	**	45
Legionellosis	1,355	1,108	1,127	1,168	1,321	2,232	2,093	2,901
Listeriosis	**	823	755	613	665	696	753	896
Lyme disease	16,801	16,273	17,730	17,029	23,763	21,273	19,804	23,305
Malaria	1,611	1,666	1,560	1,544	1,430	1,402	1,458	1,494
Measles	100	100	86	116	44	56	37	66
Meningococcal disease, invasive†††								
all serogroups	2,725	2,501	2,256	2,333	1,814	1,756	1,361	1,245
serogroup A, C, Y, & W-135	—	—	—	—	—	—	—	297
serogroup B	—	—	—	—	—	—	—	156
other serogroup	—	—	—	—	—	—	—	27
serogroup unknown	—	—	—	—	—	—	—	765
Mumps	666	387	338	266	270	231	258	314
Pertussis	7,405	7,288	7,867	7,580	9,771	11,647	25,827	25,016
Plague	9	9	6	2	2	1	3	8
Psittacosis	47	16	17	25	18	12	12	16

\*\* = † = bolezen, ki je ni bilo potrebno prijaviti, — = ni podatkov, \*\*\*= test za določanje hepatitis C protiteles postane dostopen 1990.

Najpogosteje se okužba s *C. psittaci* prične z vdihovanjem infektivnih delcev, ki vstopajo v pljuča. Inkubacijska doba traja od enega do treh tednov (Kayser in sod., 2005). Bolezen lahko poteka brez bolezenskih znakov ali kot sistematska oblika s hudo pljučnico. Simptomatska okužba se začne z nenadnim izbruhom vročine, mrzlico, glavobolom, slabostjo in bolečinami v mišicah. Ponavadi se razvije neproduktiven kašelj, ki ga spreminja težko dihanje in dihalna stiska v prsnem košu. Včasih pride do pulzno-temperaturne disocijacije (vročina brez povečanega pulza), povečane vranice in pojava izpuščajev (NASPHV, 2008) Okužba s *C. psittaci* lahko prizadene tudi druge organske sisteme in poteka kot miokarditis, perikarditis ali kot endokarditis (Falces Salvador in sod., 1999; NASPHV, 2008).

## 2. 8 DIAGNOSTIKA

Za dokazovanje klamidioze ne obstaja enostavna diagnostika. *C. psittaci* pri ljudeh in pticah še vedno predstavlja izziv za laboratorijsko diagnostiko (Geens in sod., 2005b). Zaradi možnega prenosa *C. psittaci* na ljudi je pomembna hitra diagnostika pri okuženih pticah. Pravilna diagnoza klamidioze pri pticah pomaga preprečevati izpostavljanje in okužbe pri ljudeh (Elder in Brown, 1999).

### 2. 8. 1 Odvzem vzorca

Celoten postopek z obolelimi ali mrtvimi pticami, kot tudi odvzem vzorca za dokazovanje povzročitelja, mora biti previdno izveden, da ne bi prišlo do okužbe osebja (Vlahović in sod., 2002). Pri obdukciji ptice se za diagnostiko najpogosteje odvzame tkivo zračnih vreč, vranice, osrčnika, srca, jeter ali ledvic (Andersen in Vanrompay, 2003). Pri živih pticah najpogosteje odvzamemo brise kloake, brise žrela in brise fecesa, ki jih shranimo v transportnem gojišču pri temperaturi 4 °C in poslani v laboratorij na ledu, vendar ne smejo biti zamrznjeni (Andersen, 1996; Andersen in Vanrompay, 2003; CDC, 1997). Vzorci morajo biti odvzeti aseptično (Andersen in Vanrompay, 2003).

Dolžina časa po izpostavljanju vpliva na izbiro primerne kužnine. Ptice, pri katerih vzorčimo zgodaj po okužbi, imajo najverjetnejše klamidije samo v žrelnem vzorcu. Večina ptic ima kasneje po okužbi klamidije prisotne tudi v fekalnih in kloakalnih vzorcih. Respiratorni sistem je zadnji sistem, ki se očisti okužbe, kar se sklada s tem, da je aerosolna pot pomemben dejavnik v prenosu klamidij med pticami ter med pticami in ljudmi (Andersen, 1996).

## 2. 8. 2 Izolacija

Klamidije so obvezne znotrajcelične bakterije, zato jih izoliramo v celičnih kulturah, rumenjakovi vreči piščančjih embrijev ali v laboratorijskih živalih (miši) (Andersen in Vanrompay, 2003).

Celične kulture so nadomestile uporabo laboratorijskih živali. Njihova uporaba v diagnostiki je postala "zlati standard" za izolacijo klamidij (Kelata in Taday, 2003). Primerne celične linije so McCoy celice, mišji fibroblasti L-929, HeLa celice in Buffalo Green Monkey (BGM) celice (Huhn, 1991, cit. po Kelata in Taday, 2003).

V celicah se po inokulaciji kužnine razvijejo vključki, ki jih obarvamo z različnimi barvili (Giemsa, Gimenez) (Vanrompay in sod., 1995). Klamidijske vključke dokazujemo tudi z imunofluorescenčnim barvanjem z uporabo monoklonskih protiteles (Andersen in Vanrompay, 2003).

Klamidije se v feces izločajo v časovnih presledkih, zato negativen rezultat ene kultivacije še ni zanesljiv dokaz, da ptica ni okužena s klamidijo. Prav tako lahko dobimo lažno negativne rezultate po neučinkovitem zdravljenju. Uspešnost gojenja klamidij v kulturah je odvisna od vrste in starosti gostiteljskih celic, ki jih uporabljam, količine in viabilnosti klamidij v kužnini ter strokovne usposobljenosti laboratorija (Vanrompay in sod., 1995). Izolacija *C. psittaci* v celični kulturi je zahtevna metoda z nizko občutljivostjo in predstavlja veliko nevarnost okužbe laboratorijskega osebja, saj je bakterija zelo virulentna (Geens in sod., 2005b). Zato so potrebni za izvedbo te metode posebni zaščitni ukrepi in usposabljeno osebje (CDC, 1997).

## 2. 8. 3 Serologija

Za dokazovanje okužbe s klamidijo pri pticah se pogosto uporablja serološko testiranje (Kaleta in Taday, 2003). Velik problem pri serološkem testiranju je interpretacija

rezultatov. Pozitiven serološki test je dokaz, da je ptica bila okužena s *C. psittaci* v preteklosti, vendar ne dokazuje, da ima ptica trenutno akutno okužbo. Do lažnih negativnih rezultatov lahko pride pri pticah pri katerih so bili vzorci odvzeti pred imunskim odzivom, prav tako zdravljenje z antibiotiki lahko zmanjša protitelesni odziv (CDC, 1997). Za dokazovanje akutne okužbe je potreben štirikraten porast titra protiteles v parnih serumih (Andersen in Vanrompay, 2003).

Za diagnostiko klamidijskih okužb se uporablajo različni serološki testi. Z reakcijo vezave komplementa (RVK) ne razlikujemo okužbe s posamezno vrsto. RVK ima manjšo občutljivost (Bas in sod., 2001). Test mikroimunofluorescence (MIF) ima večjo občutljivost in specifičnost kot RVK (Wong in sod., 1994). MIF naj bi bila vrstno specifična metoda, vendar poročajo o navzkrižni reaktivnosti med klamidijskimi vrstami (Wong in sod., 1999). Mnogo klamidijskih okužb je lahko kroničnih ali dolgotrajnih. Problem pri interpretaciji serološkega testa predstavljajo protiteesa, ki perzistirajo v serumu daljše obdobje v višjem titru. V tem primeru pa težko razlikujemo med preteklo in akutno okužbo. Po navideznem ozdravljenju ptice obdržijo zmerno do visoko vrednost RVK titrov protiteles (1/128 do 1/256) od nekaj tednov do mesecev. Zato je dokazovanje protiteles bolj primerno za epidemiološke študije ptičje klamidioze kot za diagnozo akutne okužbe (Vanrompay in sod., 1995).

#### **2. 8. 4 Detekcija klamidijskih antigenov**

Testi za dokazovanje klamidijskega antiga imajo v primerjavi z izolacijsko metodo številne prednosti. Z njimi dokazujemo žive in nežive klamidiye kot tudi topne antigene v izločkih. Trenutno so na voljo direktna imunofluoresanca (DIF), encimsko-imunska metoda – ELISA (angl. enzyme – linked immunosorbent assay) in imunokromatografija – IC (angl. immunochromatography) za hitro diagnostiko klamidijskega antiga (Andersen in Vanrompay, 2003).

Prednosti testa ELISA so v višji občutljivosti in možnost avtomatizacije (Kaleta in Taday, 2003). Nekateri testi ELISA so lahko lažno pozitivni zaradi navzkrižne reakcije z drugimi bakterijami (CDC, 1997).

Metode za dokazovanje antigena so relativno cenejše, enostavne za izvedbo, ne potrebujejo posebnih pogojev transporta vzorcev, hkrati pa so mnogo hitrejše v primerjavi s kultivacijo klamidij (Andersen in Vanrompay, 2003).

## 2. 8. 5 Molekularno dokazovanje nukleinske kisline *C. psittaci*

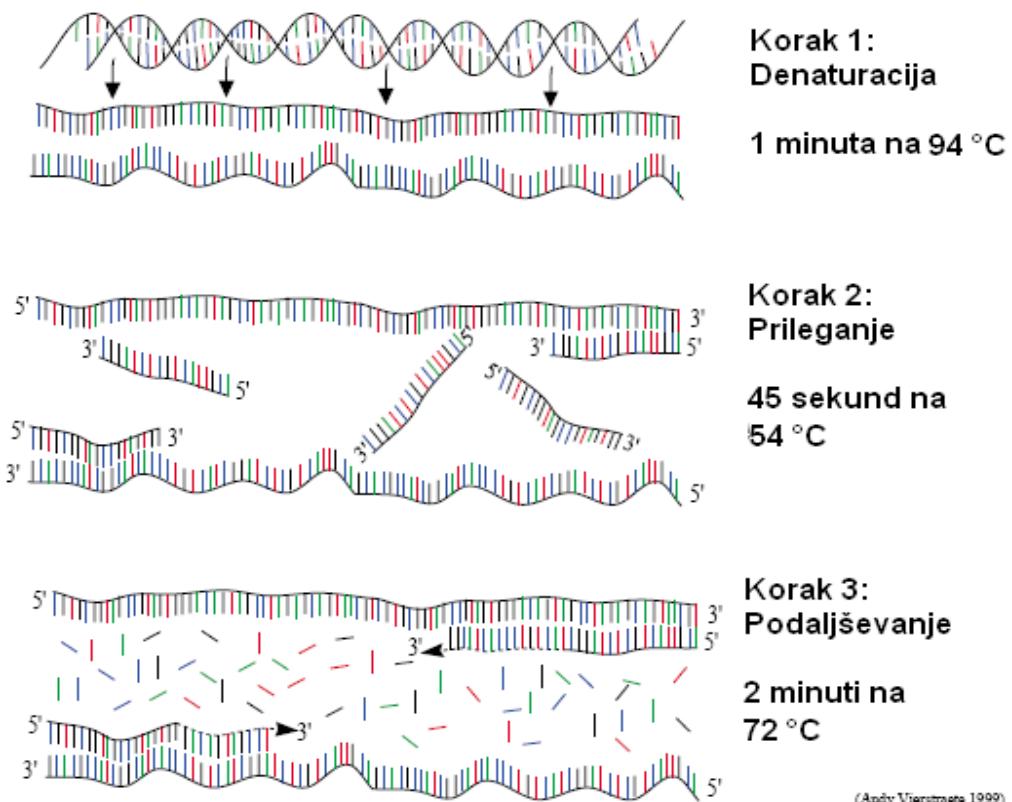
Z molekularnimi metodami dokazujemo navzočnost nukleinskih kislin bakterij v kužnini (Madigan in sod., 2003). Zato je prvi korak osamitev DNA ali RNA iz vzorca. Temu sledi dokazovanje DNA, za kar se uporablja več metod, to so metoda določevanja nukleotidnega zaporedja, hibridizacijske metode in metode pomnoževanja delcev nukleinskih kislin (Koren in sod., 2002). Molekularne tehnike nam omogočajo natančen vpogled v strukturo genoma organizmov in so zato pogosto bolj informativne kot pa tehnike, ki se opirajo na fenotipske lastnosti (Dovč in Dovč, 1999).

Specifično pomnoževanje genomskeih odsekov *C. psittaci* je primerno orodje za potrditev prisotnosti patogena v kužnini (Dovč in Dovč, 1999).

### 2. 8. 5. 1 Verižna reakcija pomnoževanja s polimerazo – PCR (angl. polymerase chain reaction)

PCR omogoča pomnoževanje točno določenega odseka nukleinske kisline *in vitro*. Tako lahko zelo hitro namnožimo želene odseke DNA v tako velikem številu, da jih lahko direktno uporabljamo v analitske namene (Dovč, 1998).

PCR reakcija je sestavljena iz treh korakov (Slika 8).



Slika 8: Princip verižne reakcije pomnoževanja s polimerazo – PCR (Principle of the..., 1999).

Za uspešno pomnoževanje pa je nujno potrebno poznavanje vsaj dela genoma, kar nam omogoča pravilno izbiro začetnega oligonukleotida, ki je komplementaren mejnemu delu genoma, ki ga želimo pomnožiti (Koren in sod., 2002).

Od 1990 so razvili številne tehnike PCR za dokazovanje in identifikacijo DNA *C. psittaci*. Večina od njih uporablja kot tarčo gen *ompA* (Ménard in sod., 2006; Kaltenboeck in sod., 1991). Nedavno so Laroucau in sodelavci predlagali uporabo para začetnih oligonukleotidov (CpsiA/CpsiB), katerih tarča je ohranjena družina genov *pmp* bakterije *C. abortus*. Čeprav njihova funkcija še ni znana, predpostavljajo, da se proteini Pmp nahajajo na zunanji membrani ET. Laroucau in sodelavci so potrdili, da je

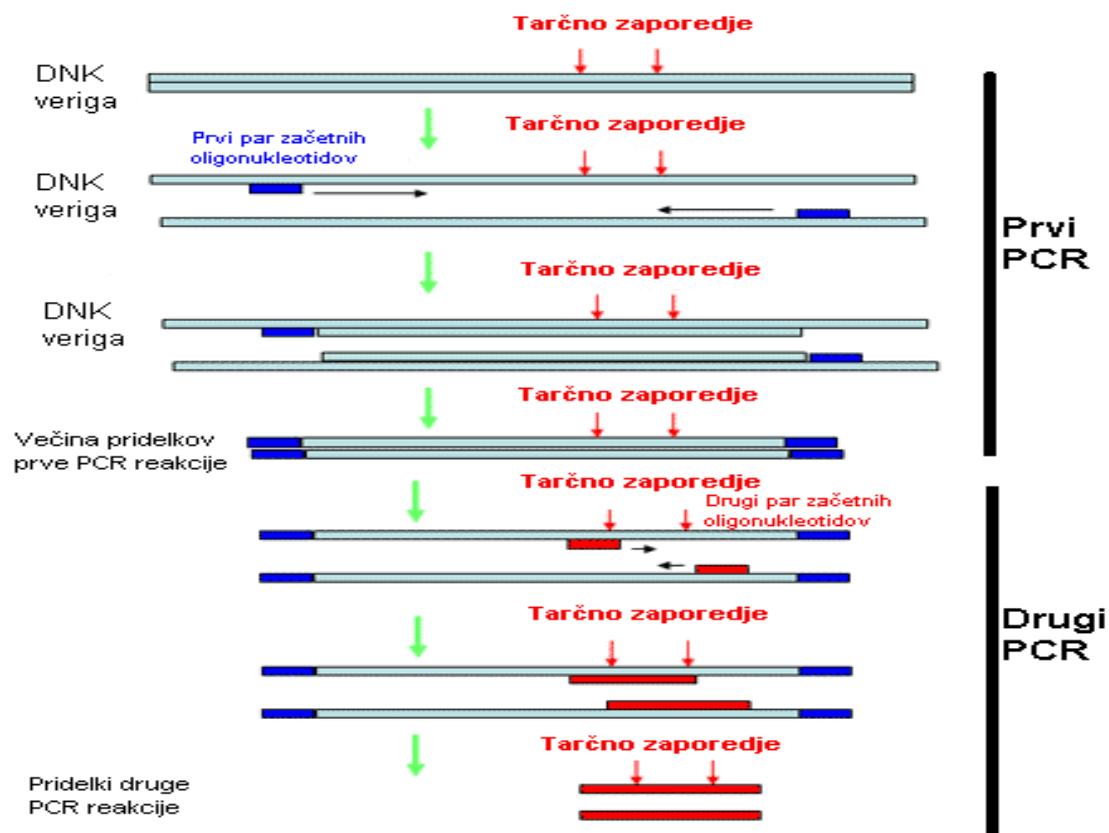
PCR za gene *pmp* visoko občutljiv in specifičen za dokaz klamidioze. S tem parom začetnih oligonukleotidov so dokazali vse znane serotype/genotype (razen genotipa E/B, ki ni bil vključen v raziskavo). Ker so bili začetni ologonukleotidi CpsiA/CpsiB specifični za *C. abortus*, je vprašanje navzkrižne reaktivnosti z DNA *C. psittaci* (Laroucau in sod., 2007). Čeprav ni bilo velikokrat opisano, se *C. abortus* lahko pojavi tudi pri pticah (Sting in sod., 2006).

Prednosti PCR pred drugimi metodami so preprosta izvedba, hitrost in možnost standardizacija testa (Laroucau in sod., 2007). PCR je visoko občutljiva in specifična metoda za dokazovanje tarčne DNA in je odvisna od količine organizma v vzorcu (Messmer in sod., 1997). Omogoča enostaven in neinvaziven odvzem vzorcev. Ker niso potrebne žive klamidije, je transport in shranjevanje enostavno (Andersen in Vanrompay, 2003).

Glavna pomankljivost PCR metode pa je možnost navzkrižne kontaminacije, za kar potrebujemo sterilne pogoje dela in natančno delo. Do negativnih rezultatov lahko pride zaradi mutacij v nukleinski kislini genov, ki jih uporabljamo kot markerje za detekcijo (Andersen in Vanrompay, 2003).

#### 2. 8. 5. 1. 1 “Nested” PCR

“Nested” PCR je PCR metoda, kjer uporabljamo dva seta začetnih oligonukleotidov (Slika 9). Najprej se izvede standardna PCR reakcija z uporabo zunanjih začetnih oligonukleotidov. Nato sledi druga PCR reakcija, kjer se uporabijo notranji (ugnezdeni, angl. nested) začetni oligonukleotidi pri pomnoževanju pridelkov prve PCR reakcije (Nested PCR..., 2006). S pomnoževanjem pridelka prve reakcije, “nested” PCR, se poveča občutljivost PCR metode. Tudi specifičnost metode naraste, ker se notranji začetni oligonukleotidi pomnožujejo samo, če je pridelek prve reakcije specifičen produkt (Detection of HHV - 6..., 2005).



Slika 9: Potek “nested” PCR reakcije. V prvi PCR reakciji se uporabijo začetni oligonukleotidi, ki pomnožujejo zunaj tarčnega zaporedja. Sledi druga PCR reakcija, kjer drugi par začetnih oligonukleotidov specifično pomnožuje znotraj tarčnega zaporedja produktov prve PCR reakcije (Nested PCR,...,2005).

#### 2.8.5.1.2 Multiplex PCR

Multiplex PCR se uporablja za sočasno dokazovanje več vrst organizmov v vzorcu. Tong in sodelavci (1999) so uporabili multiplex PCR za sočasno dokazovanje DNA *Mycoplasma pneumoniae*, *C. pneumoniae* in *C. psittaci* v kužnini bolnika. Ugotovili so, da ima multiplex PCR metoda nižjo občutljivost v primerjavi s PCR metodo, kjer se uporabljajo posamezni začetni oligonukleotidi (Tong in sod., 1999).

#### 2. 8. 5. 1. 3 Touchdown PCR

Touchdown PCR je še ena različica klasičnega PCR. Madico in sodelavci (2000) so razvili občutljivo in specifično Touchdown Enzyme Time Release (TETR) metodo PCR za identifikacijo vseh klamidij, ki povzročajo bolezni pri človeku. Metoda vključuje aktivacijo DNA polimeraze pri 95 °C. S tem so posnemali "hot start" za preprečevanje DNA sinteze pred termalnim ciklom. S postopnim zniževanjem temperature so povečali specifičnost vezave začetnih oligonukleotidov. Postopna aktivacija encima DNA polimeraze med termalnim ciklom pa je omogočila 60 ciklov za izboljšanje analitične občutljivosti. Ugotovili so, da je občutljivost metode boljša v primerjavi s klasično metodo PCR in različico PCR-ELISA (angl. polymerase chain reaction-enzyme immunoassay) ter enaka kot pri "nested" PCR (Madico in sod., 2000).

#### 2. 8. 5. 1. 4 PCR v realnem času

PCR v realnem času ponuja prednost pred tradicionalnimi metodami in klasičnim PCR s svojo hitrostjo, enostavnostjo, avtomatizacijo, zmanjšanim tveganjem kontaminacije in možnostjo kvantifikacije nukleinske kisline (Yang in sod., 2006). Pri PCR v realnem času poteka pomnoževanje specifičnega odseka nukleinske kisline sočasno z detekcijo nastalega produkta. Tako omogoča specifično in občutljivo kvantifikacijo DNA z minimalnim tveganjem kontaminacije (Geens in sod., 2005b).

Geens in sodelavci (2005b) so dokazali uporabnost vrstno-specifičnega in genotipsko-specifičnega PCR v realnem času za ugotavljanje DNA *C. psittaci* v vzorcu. Vse genotipe, razen genotipa E, ki ima enak restriktionski vzorec kot genotip E/B, so določili z uporabo *ompA* RFLP analizo ali s sekveniranjem gena *ompA*. Genotipsko-specifičen PCR v realnem času bi se lahko uporabljal za epidemiološke raziskave (Geens in sod. 2005b). Heddema in sodelavci so opisali občutljiv, specifičen in hiter PCR v realnem času za dokazovanje DNA *C. psittaci* v človeških vzorcih. Vendar začetni

oligonukleotidi in sonde zaradi sekvenčne homologije gena *ompA* niso razlikovale med vrstami iz rodu *Chlamydophila* (Heddema in sod., 2006c).

#### 2. 8. 5. 2 DNA mikročipi

Tehnologija DNA mikročipov se v diagnostiki bakterijskih in virusnih patogenov še razvija (Borel in sod., 2007). Omogoča nam sočasno pregledovanje DNA vzorcev z velikim številom sond, ki izhajajo iz polimorfnih genskih segmentov in/ali različnih genskih regij (Kempf in sod., 2006). Sachse in sodelavci so v svoji študiji pokazali uporabo mikromrež za direktno dokazovanje vrst iz rodu *Chalmydia* in *Chlamydophila spp.* v kliničnih vzorcih. Test vključuje PCR pomnoževanje tarčnega zaporedja na 23S rDNA s sočasno biotinilacijo in hibridizacijo v ArrayTube (AT) sistemu (Sachse in sod., 2006). Z DNA mikromrežo lahko dokažemo eno samo tračno kopijo PCR pomnoževanja (Ehricht in sod., 2006; Sachse in sod., 2006). Občutljivost ArrayTube<sup>TM</sup> DNA mikromrež je primerljiva s PCR v realnem času, klasičnim PCR ali imunohistokemijo (Kempf in sod., 2006; Borel in sod., 2007). Mikromreže so uporabne tudi za rutinsko diagnostiko (Borel in sod. 2007).

### 3 MATERIAL IN METODE

#### 3.1 ZBIRANJE IN SHRANJEVANJE KUŽNINE

Z Inštituta za zdravstveno varstvo perutnine (doc. dr. Alenka Dovč, dr. vet. med.), Veterinarske fakultete Ljubljana, smo pridobili kloakalne brise 86 prostoživečih mestnih golobov iz Ljubljane. Brise smo do testiranja hrаниli v transportnem gojišču 2SP pri  $-70^{\circ}\text{C}$ .

#### 3.2 IZOLACIJA BAKTERIJSKE DNA

Postopek izolacije bakterijske DNA smo izvajali v sterilni zaščitni komori LFV 91T (Iskra PIO, d. o. o., Slovenija) pod sterilnimi pogoji. Pri delu smo uporabljali rokavice in aseptično tehniko dela. Tako smo preprečili možnost kontaminacije vzorcev med postopkom izolacije bakerijske DNA in možnost okužbe med delom.

Kužnine smo predhodno odtajali pri sobni temperaturi. Izolacijo DNA smo izvedli s kompletom reagentov QIAamp<sup>®</sup> DNA Mini Kit (QIAGEN GmbH, Nemčija). Osamitev smo izvedli po navodilih proizvajalca, s spremembjo v prvem koraku izolacije.

Oprema in reagenti:

- termostresalnik mikrotubic Thermo Shaker TS-100, ( $56^{\circ}\text{C}$ ) (BIOSAN, Latvija)
- termostresalnik mikrotubic, Thermomixer 5436 ( $70^{\circ}\text{C}$ ) (Eppendorf, Nemčija)
- centrifuga Centrifuge 5403 (Eppendorf, Nemčija)
- avtomatske pipete (Eppendorf)
- sterilni nastavki za pipette (Eppendorf)
- stojalo za mikrotubice
- sterilne mikrotubice (1,5 ml)
- mikrokolone (QIAamp Spin Column, priložene kitu) z 2 ml zbiralnimi epruvetami

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

V 1,5 ml mikrotubico smo prenesli 200 µl kužnine (bris kloake). Nato smo vsebino centrifugirali 20 minut pri 15000 obratih/minuto. Po končanem centrifugiranju smo zavrgli 100 µl supernatanta, dodali 180 µl pufra ATL in usedlino resuspendirali. Vsebini smo dodali 20 µl proteinaze K. Mešanico smo premešali z vorteksiranjem in inkubirali pri 56 °C na stresalniku čez noč.

Po lizi bakterijskih celic smo mikrotubice kratko centrifugirali (1–2 sekundi), da smo odstranili kapljice z notranjih sten mikrotubice. Nato smo dodali 200 µl pufra AL, premešali z vorteksiranjem 15 sekund in inkubirali 10 minut pri –70 °C. Po inkubaciji smo mikrotubico centrifugirali 1–2 sekundi.

Mešanici smo dodali 200 µl 90–100% etanola in vsebino premešali na vorteksu 5 sekund. Nato kratko centrifugirali, da smo odstranili kapljice z notranjih sten mikrotubice.

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 DNA pa prenesli v novo zbiralno epruveto.

V tubico smo dodali 500 µl pufra AW1. Ponovno smo centrifugirali 1 minuto pri 8000 obratih/minuto. Izpirek in zbiralno tubico smo 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 DNA *C. psittaci* smo eluirali iz membrane kolone z 2 minutnim centrifugiranjem pri 8000 obratih/minuto. Mikrokolono smo nato zavrgli. Izolirano DNA smo do nadaljne obdelave hranili pri -20 °C (Tissue Protocol..., 2003).

### 3. 3 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO

#### 3. 3. 1 Sestava reakcijske mešanice in pogoji PCR

Za pomnoževanje izolirane DNA *C. psittaci* z metodo "nested" PCR smo uporabili komplet reagentov nemškega proizvajalca Genkam Biotechnology AG. V prvem koraku PCR reakcije reagenti omogočajo pomnoževanje DNA *Chlamydia* spp., v drugem koraku PCR reakcije pa reagenti pomnožujejo DNA *C. psittaci*. Za pravilno izvedbo metode smo sledili navodilom proizvajalca.

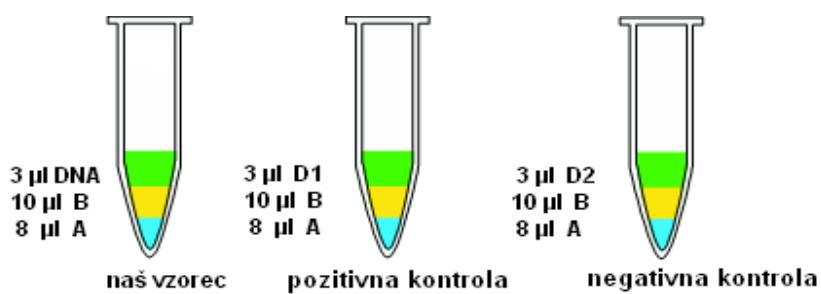
Posamezne faze reakcije PCR smo izvajali v ločenih prostorih, tako smo zmanjšali možnost kontaminacije vzorcev in prostora. Pripravo reakcijske mešanice smo izvajali v zaščitni komori (Iskra PIO LFV 91T) pod sterilnimi pogoji.

## Oprema in reagenti:

- mikrotubice (0,2 ml)
- reagent A
- reagent B
- reagent H
- pozitivna kontrola (reagent D1)
- negativna kontrola (reagent D2)
- označevalec molekulske mase (tubica E)
- barvilo (tubica F)
- termični pomnoževalnik Perkin Elmer PCR 9600 (PE Applied Biosystems, ZDA)
- Herolab UV komora
- pipete (Eppendorf)
- sterilni nastavki za pipete (Eppendorf)

Do uporabe morajo biti vsi reagenti shranjeni v zamrzovalniku pri  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Reakcijska mešanica za prvi korak PCR reakcije (Slika 10) je vsebovala reagenta A in B, ki smo jima dodali še izolirano DNA. V prvem koraku reakcije PCR pomnožujemo rogovno specifičen odsek klamidijske DNA. Pozitivno kontrolo smo pripravili tako, da smo namesto izolirane DNA dodali reagent D1. Pri negativni kontroli smo namesto izolirane DNA dodali reagent D2. Skupni volumen reakcijske mešanice je bil 21  $\mu\text{l}$ .



Slika 10: Reakcijska mešanica prvega koraka verižne reakcije s polimerazo – PCR reakcije (Genekam Biotechnology, AG).

Pomnoževanje 420 baznih parov dolgega zaporedja DNA smo izvedli v termičnem pomnoževalniku PE 9600 s 50-kratno ponovitvijo temperaturnega ciklusa PCR, sestavljenega iz treh zaporednih inkubacij.

1. 1 sekunda pri 97 °C
  2. 1 sekunda pri 97 °C
  - 60 sekund pri 50 °C
  - 60 sekund pri 72 °C
  3. 60 sekund pri 72 °C
- } 50 ponovitev

Po končanem pomnoževanju pridelke prvega koraka reakcije PCR nismo dokazovali z elektroforezo. Ohladili smo jih na 4 °C in jih uporabili v naslednjem koraku reakcije PCR.

V drugem koraku reakcije PCR pa pomnožujemo z oligonukleotidnimi začetniki, ki so specifčni za DNA *C. psittaci*. Reakcijska mešanica je vsebovala reagenta H in B, katerima smo dodali pridelek iz prvega koraka PCR reakcije (Slika 11). Pozitivno kontrolo smo pripravili tako, da smo dodali pridelek pozitivne kontrole iz prvega koraka reakcije PCR. Pri negativni kontroli pa smo dodali pridelek negativne kontrole iz prvega koraka reakcije. Skupni volumen reakcijske mešanice je bil 20 µl.



Slika 11: Reakcijska mešanica drugega koraka verižne reakcije s polimerazo – PCR reakcije (Genekam Biotechnology, AG).

Pomnoževanje 389–404 baznih parov dolgega zaporedja smo izvedli s 30-kratno ponovitvijo temperaturnega ciklusa PCR, sestavljenega iz treh zaporednih inkubacij.

1. 1 sekunda pri 97 °C
  2. 1 sekunda pri 97 °C  
60 sekund pri 50 °C  
60 sekund pri 72 °C
  3. 60 sekund pri 72 °C
- } 30 ponovitev

Po končanem pomnoževanju smo pridelke drugega koraka reakcije PCR dokazovali z elektroforezo. Dobljene PCR pridelke smo do nadaljne obdelave shranili pri 4 °C (Genekam Biotechnology AG, 2007).

### **3. 4 DOKAZOVANJE PRIDELKOV PCR REAKCIJE**

#### **3. 4. 1 Priprava agaroznega gela in elektroforeza**

Pridelke PCR smo ločevali z vodoravno elektroforezo (HE33 mini horizontal submarine unit Hoefer™, Nemčija) v 2% agaroznem gelu. Uporabili smo agarozo v prahu Nusieve 3 : 1 (FMC Bio Products, ZDA), ki smo jo raztopili v 1x 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 segreli do vrelischa 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 4,5 µl etidijevega bromida (Sigma, ZDA, 10 mg/ml) in gel nalili v kadičko z glavnikom.

#### **3. 4. 2 Priprava vzorcev in nanos na gel**

V vdolbinice gela smo nanesli mešanico 10 µl pridelka PCR, ki smo mu dodali še 2 µl barvila iz tubice F (priložen kompletu reagentov za PCR). Nanesli smo tudi pozitivno kontrolo.

V prvo in zadnjo vdolbinico smo nanesli 10 µl označevalca molekulske mase iz tubice E, ki vsebuje odseke DNK v velikosti mnogokratnika 100 baznih parov.

### **3. 4. 3 Pogoji elektroforeze in fotografiranje gela**

Elektroforeza je potekala pri sobni temperaturi v električnem polju 100 Voltov 55 minut. Po končani elektroforezi smo gel pregledovali v transluminatoriju LKB MacroVue (Pharmacia, Švedska) z UV svetlobo valovne dolžine 302 nm in jih fotografirali s polaroidno kamero Palaroid DS 34 (direct screen instant camera, Polaroid, ZDA). Gel smo obdelali in slikali še s pomočjo računalniškega sistema Gel Doc 2000 (Biorad, Italija).

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

## **3. 5 POTRJEVANJE POZITIVNIH REZULTATOV**

Vzorce, pri katerih smo pri elektroforezi pridelkov PCR opazili proge v območju 389–404 bp, smo potrjevali s ponovnim testiranjem z isto metodo. Iz vzorcev smo ponovno izolirali celokupno DNA iz brisov kloake, ki smo jo nato ponovno pomnoževali v dveh korakih z enako “nested” PCR reakcijo. Pridelke druge PCR reakcije smo dokazovali z gelsko elektroforezo. Vzorci pri katerih smo dokazali pridelke PCR reakcije v velikosti 389–404 baznih parov po ponovljenem testiranju, so bili obravnavani kot pozitivni.

## **3. 6 CLEARVIEW**

Na Veterinarski fakulteti so predhodno v istih vzorcih dokazovali *C. psittaci* s hitro metodo CLEARVIEW (*Chlamydia* test, Unipath Limited, England). Pozitivne rezultate

so potrjevali z direktno imunofluoresenco z uporabo monoklonskih protiteles (Chlamydia direct IF (ID) BioMerieux, France). CLEARVIEW je hitri encimsko imunski test za dokazovanje klamidijskega antiga. V tem testu izvleček klamidijskega antiga nanesemo na membrano v vzorčnem okencu Clearview ploščice, kjer so vezana anti-klamidijska monoklonska protitelesa. Antigen z označenimi monoklonskimi protitelesi tvori kompleks, katerega posledica je vidna obarvana črta (Arumainayagam in sod., 1990). Test ima nizko specifičnost in nizko občutljivost (Yin in sod., 2006).

## 4 REZULTATI

### 4.1 DOKAZOVANJE DNA BAKTERIJE *C. psittaci*

V prvem koraku PCR reakcije smo uporabili par začetnih oligonukleotidov, ki so specifični za rod *Chlamydia*, pri čemer smo dobili fragment DNA v velikosti 420 baznih parov. Prvi pridelek smo nato uporabili v drugem koraku "nested" reakcije PCR, kjer smo dobili pomnožen fragment DNA v velikosti 389–404 baznih parov. Velikost pridelkov smo določali glede na velikost DNA označevalca molekulske mase in glede na pozitivno kontrolo.

Po prvem testiranju smo dobili pri sedmih vzorcih jasno pozitivne rezultate, medtem ko pri osmih vzorcih rezultat ni bil povsem jasen. Zato smo jih ponovno testirali (Preglednica 2). Od 86 vzorcev kloakalnih brisov mestnih golobov smo dobili s ponovnim PCR testiranjem jasno pozitivnih 7 vzorcev (oz. 7 za *C. psittaci* pozitivnih PCR vzorcev), kar predstavlja 8,14 % pregledanih vzorcev.

Osem dvomljivo pozitivnih rezultatov po prvem testiranju je bilo negativnih po drugem testiranju.

Preglednica 2: Število pozitivnih vzorcev na *Chlamydia psittaci* po prvem in drugem testiranju z metodo "nested" PCR.

PCR	Prvo testiranje	Potrjevanje rezultatov s ponovnim testiranjem
Število vzorcev	86	86
Število pozitivnih vzorcev na <i>C. psittaci</i>	7 + 8*	7
Število negativnih vzorcev na <i>C. psittaci</i>	71	79

\* predstavlja nejasne rezultate

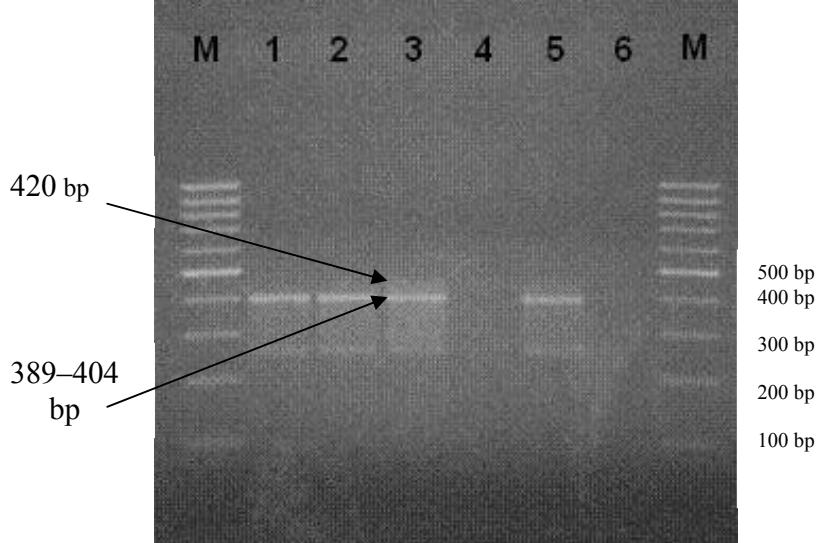
Primerjali smo rezultate metode PCR in metode CLEARVIEW. Z "nested" PCR smo potrdili en jasno pozitiven rezultat dobljen z metodo CLEARVIEW, hkrati pa dokazali

DNA *C. psittaci* še v šestih vzorcih (Preglednica 3). Metoda “nested” PCR je pokazala višjo občutljivost v primerjavi z metodo CLEARVIEW.

Preglednica 3: Delež pozitivnih rezultatov na *Chlamydia psittaci* z metodo CLEARVIEW in “nested” PCR. En pozitiven vzorec (1\*) so označili za sumljivega.

Metoda	CLEARVIEW	“Nested” PCR
Število vzorcev	86	86
Število pozitivnih vzorcev	1 + 1 *	7
Število negativnih vzorcev	84	79
Delež pozitivnih (%)	1,16	8,14

Slika 12 prikazuje pozitivne rezultate z metodo “nested” PCR po gelski elektroforezi, kjer so vidni pomnoženi fragmenti v ustreznji velikosti 398–404 baznih parov, ki predstavljajo DNA *C. psittaci*. Fragmenti v velikosti 420 baznih parov pa predstavljajo pridelek prvega koraka “nested” PCR, ki je specifičen za rod *Chlamydia* spp.



Slika 12: Gelska elektroforeza pridelkov verižne reakcije s polimerazo (PCR) *Chlamydia psittaci*. M: označevalec molekulske mase v velikosti mnogokratnika 100 baznih parov. Proge 1, 2 in 3 so pozitivni vzorci; 4 predstavlja negativen vzorec; proga 5 je pozitivna kontrola; 6 je negativna kontrola.

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5. 1 RAZPRAVA

Klamidioza pri pticah je zoonoza, ki jo povzroča bakterija *C. psittaci* (Dovč, 1998). Mikroorganizem je patogen ptic, ki se prenaša z inhalacijo okuženega prahu, aerosolov ali z neposrednim stikom (Trávniček in sod., 2002; NASPHV, 2008). Okužene ptice širijo *C. psittaci* skozi iztrebke in respiratorne izločke (Vanrompay in sod., 1995).

Klamidioza pri pticah je običajno sistemska okužba. Klinični znaki se razlikujejo in so odvisni od vrste in starosti ptice ter virulentnosti seva *C. psittaci* (Andersen in Vanrompay, 2003). Okužene ptice so lahko brez bolezenskih znakov, a so prenašalke *C. psittaci*, ki lahko izločajo povzročitelja tudi več let (Peeling in Brunham, 1996; Dovč, 1998). Do povečanega širjenja in doveznosti ptic za okužbo pride zaradi stresa, kot je transportiranje, preveliko število ptic na enem mestu, stradanje ali valjenje jajc (Peeling in Brunham, 1996). Najpogostejsi prenašalci *C. psittaci* na ljudi so papige in golobi (Dovč, 1998; Sudler in sod., 2004).

Pomemben vir okužbe za ljudi so mestni golobi, ki živijo v tesnem stiku z ljudmi. Klinična slika pri golobih je največkrat neizrazita. Lahko se opazi neješčost, apatija, driska in serozen do serozno gnojen izcedek iz nosnic in oči (Dovč in sod., 2000).

Veliko število prostoživečih golobov živi v vsakem večjem mestu po svetu (Haag - Wackernagel in Moch, 2004). Pri golobih ni poznan čas inkubacije, a so okužbe s klamidijami endemične in se pogosto širijo s starša na mlade golobe (Vlahović in sod., 2002). Blato posameznih inficiranih golobov, zlasti med akutno fazo, vsebuje preko 10000 infekcioznih enot na gram iztrebka (Arnstein in Meyer, 1982 cit. po Dovč in sod., 2000), golob pa v enem letu izloči 2,5 kg iztrebkov (Gregurić in sod., 1992 cit. po Dovč in sod., 2000).

Rešidbegović in sodelavci so 2005 izvedli epidemiološko študijo zdravstvenega statusa prostoživečih golobov v Sarajevu. Protitelesa za *C. psittaci* so odkrili pri 30,1 % golobov (Rešidbegović in sod., 2006). Golobi so zelo razširjeni tudi na podeželju in mestnih področjih Japonske. V tesen stik z ljudmi prihajajo v parkih, templjih, svetiščih, javnih vrtovih in železniških postajah. Tanaka in sodelavci so 2005 z "nested" PCR pregledovali iztrebke mestnih golobov in poročali o 22,2 % pozitivnih primerov. Heddema in sodelavci so poročali o prevalenci okužb s *C. psittaci* pri mestnih golobih v Amsterdamu. Ker prihaja do sproščanja bakterije v presledkih in je lahko aktivirana s stresnimi faktorji, kot je parjenje, so odvzeli vzorce v času nizkega paritvenega obdobja (februar, marec) in v času visokega paritvenega obdobja (maj). Ugotovili so, da 5 (februar, marec) do 10 (maj) % pregledanih mestnih golobov v svojem fecesu sprošča *C. psittaci* (Heddema in sod., 2006a).

Mestni golobi živijo v tesnem stiku z ljudmi in živalmi. (Dovč in sod., 2004). Ljudje so pogostoma izpostavljeni različnim domačim ali divjim pticam v vsakodnevнем življenju zaradi poklica ali naključnega stika. Divje ptice se zbirajo v bližini javnih mest, tako kontaminirajo okolje z izločki in aerosoli s *C. psittaci* (Chahota in sod., 2006). Ljudje se najpogosteje okužijo med čiščenjem golobjih iztrebkov ali pri odstranjevanju golobov iz zgradb. Veliko ljudi ima naključne stike z golobi, od hranjenja v mestnih parkih do stika s pticami, ki gnezdi na oknih (Haag - Wackernagel in Moch, 2004). Jeseni 2002 je med prebivalci področja Blue Mountins v Avstraliji prišlo do izbruha psitakoze. S *C. psittaci* se je okužila skupina starejših prebivalcev, ki so večinom doma in zato bolj aktivni na svojih dvoriščih (vrtnarijo, kosijo travo). S pomočjo epidemiološke študije so poskušali določiti faktorje tveganja. Ugotovili so, da stik z živimi ali mrtvimi divjimi pticami ter košnja trave s kosilnico brez lovilca trave pojasni 70 % primerov okužb. Proizvajalci kosilnic navajajo, da lovilci trave zmanjšujejo nastajanje prahu ter tako zmanjšujejo količino izločenega prahu v okolico (Telfer in sod., 2005).

Pospíšil in sodelavci (1988) so prav tako dokazali, da so golobi pomemben vir okužbe za ljudi. Osemnajst izmed dvaindvajset delavcev na katedrali St. Elisabeth v mestu Košice je zbolelo za akutno ornitozo. Vir okužbe je bil prah posušeneg fecesa mestnih golobov (Pospíšil in sod., 1988 cit. v Trávniček in sod., 2002).

Zraven možne okužbe ljudi, predstavljajo golobi nevarnost tudi za prenos okužbe na udomačene živali, kot so ptičji ljubljenčki in perutnina, ki živijo v tesnem stiku z ljudmi (Heddemra in sod., 2006a). Nemogoče je preprečiti stik pasemskih golobov s prostoživečimi mestnimi golobi in vrabci, zato je toliko bolj pomemben stalen nadzor ptic (Dovč, 1998). Trávniček in sodelavci so s serološkimi testi dokazovali protitelesa IgG proti *C. psittaci* pri fazanih na kmetiji in pri divjih golobih. Dokazali so visoko stopnjo okuženosti pri golobih. Izstopali so golobi, ki so bili ulovljeni aprila 2000 (77,1 %) in 2001 (85,1 %), v primerjavi z junijem (41 % in 33,3 %). Visok delež so razlagali z dejstvom, da golobi preživljajo zimski čas skriti na kmetijah, kjer je njihova koncentracija in medsebojni stik zelo visok. Ptice so oslabljene zaradi nezadostnega hranjenja v zimskem času, kar lahko povzroči aktivacijo infektivnega procesa. Stik med golobi in fazani na kmetiji je običajno posreden, predvsem, ko golobi ali druge divje ptice iščejo hrano ter tako kontaminirajo hrano in okolje (Trávniček in sod., 2002).

Diagnoza klamidioze pri pticah je otežena zaradi pogosto odsotnih kliničnih znakov bolezni (Vlahović in sod., 2002). Izolacija *C. psittaci* je zahtevna za izvajanje, relativno neobčutljiva ter predstavlja nevarnost za okužbo (Geens in sod., 2005b). Ker je visoko infektivna in se širi z aerosoli, zahteva delo v laboratoriju tretje varnostne stopnje (Ménard in sod., 2006). Najpogosteje se pri pticah izvaja serološko testiranje. Interpretacija rezultatov je težavna, saj ima večina ptic navzoča protitelesa od predhodnih okužb, ki lahko vztrajajo tudi do nekaj mesecev. Zaradi obveznega pregledovanja parnih serumov ima serologija manjši klinični pomen (Geens in sod., 2005b).

Zaradi teh pomankljivosti so razvili številne metode PCR za dokazovanje okužb s *C. psittaci* (Ménard in sod., 2006). Njeni prednosti pred drugimi metodami sta hitra izvedba in možnost standardizacije (Laroucau in sod., 2007). PCR so opisali kot visoko občutljivo metodo za dokaz DNA *C. psittaci*. Zazna lahko manj kot 10 klamidijskih ET (Kaltenboeck in sod., 1991; Rasmussen in sod., 1992). Ker za dokazovanje nukleinske kisline niso potrebne žive klamidije, je transport in shranjevanje kužnine enostavnejše (Andersen in Vanrompay, 2003).

Kaltenboeck in sodelavci (1991) so razvili dvostopenjski, "nested" PCR za dokazovanje *C. psittaci*. Van Loock in sodelavci (2005) so objavili različico "nested" PCR-ELISA s 100% specifičnostjo. Chahota in sodelavci (2006) so opisali "nested" PCR, ki lahko zazna 2 do 10 kopij DNA. Tong in sodelavci so uporabili multiplex PCR za razlikovanje med *Mycoplasma pneumoniae*, *C. pneumoniae* in *C. psittaci*, tremi povzročitelji atipične pljučnice. Ugotovili so, da ima multiplex PCR nižjo občutljivost v primerjavi s PCR, kjer se uporabljajo posamezni začetni oligonukleotidi (Tong in sod., 1999). Messmer in sodelavci so pri izbruhu psitakoze uporabili kombinacijo nested-multiplex PCR. V prvem koraku PCR reakcije so pomnoževali za rod specifičen odsek DNA, v drugem PCR pa so razločevali DNA *C. pneumoniae*, *C. psittaci* in *C. trachomatis* (Messmer in sod., 1997). PCR v realnem času se uporablja za identifikacijo in/ali kvantifikacijo *Chlamydia* spp. Ta metoda je zelo občutljiva in hitra. Ker se vsi koraki izvajajo v eni mikrotubici je manjša možnost za kontaminacijo s PCR pridelki (Ménard in sod., 2006).

Metoda DNA mikročipov se v diagnostiki bakterijskih in virusnih patogenov šele razvija (Borel in sod. 2007). Sachse in sodelavci so prikazali uporabnost DNA mikromrež za direktno dokazovanje vrst iz rodu *Chalmydia* in *Chlamydophila* spp. v kliničnih vzorcih (Sachse in sod., 2006).

V naši diplomske nalogi smo uvedli molekularno dokazovanje klamidioze z "nested" PCR pri mestnih golobih. Iz Veterinarske fakultete Ljubljana smo pridobili 86 brisov

kloake mestnih golobov. Celokupno DNA smo izolirali po protokolu za izolacijo DNA iz tkiv s kompletom reagentov QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN GmbH, Nemčija). Z "nested" PCR smo v prvem koraku reakcije PCR pomnoževali rodovno specifičen odsek klamidijske DNA. V drugem koraku reakcije PCR pa smo pomnoževali odsek DNA z vrstno specifičnimi začetnimi oligonukleotidi, v velikosti 389–404 bp, ki smo ga dokazali s pomočjo gelske elektroforeze.

*C. psittaci* povzoča med drugim okužbo gastrointestinalne poti. V naši diplomski nalogi smo kužnino pridobili z odvzemom brisa kloake mestnih golobov, ki smo jih pregledovali z molekularno metodo "nested" PCR.

Vzorci, ki so bili pozitivni po prvem testiranju z "nested" PCR, smo še enkrat preverili z isto metodo pri drugem testiranju z "nested" PCR. Pri osmih vzorcih, kjer smo po prvem testiranju dobili nejasen rezultat, smo s ponovnim testiranjem dokazali negativen rezultat. Vzorci, ki so bili po prvem testiranju z "nested" PCR "močno" pozitivni (so imeli močno progo na gelu), so bili pozitivni tudi po drugem testiranju. Žal potrditve pozitivnih rezultatov z referenčno metodo osamitve bakterije v celični kulturi ni bilo možno izvesti, saj vemo, da lahko izolacijo in kultivacijo *C. psittaci* izvedemo le v laboratoriju tretje varnostne stopnje.

Ko smo primerjali metodo CLEARVIEW z "nested" PCR, smo ugotovili višjo občutljivost molekularne metode. S tem smo potrdili nizko občutljivost in specifičnost metode CLEARVIEW.

Od 86 vzorcev kloakalnih brisov mestnih golobov smo po končani gelski elektroforezi drugega testiranja dobili 7 pozitivnih vzorcev, kar predstavlja 8,14 % pregledanih pozitivnih vzorcev. Prekuženost mestnih golobov je večja v primerjavi z okrasnimi golobi. Kramljak (2006) ni v svoji diplomski nalogi pri nobenem izmed 50 vzorcev okrasnih golobov z metodo "nested" PCR dokazala DNA *C. psittaci*, kar je razumljivo, saj je danes reja pasemskeih golobov pod veterinarskim nadzorom.

Leta 2004 je bila objavljena raziskava o zdravstvenem statusu prostoživečih golobov v Ljubljani. S serološkim testom so ugotovili prekuženost s *C. psittaci* pri 23,7 % mestnih golobov (Dovč in sod., 2004). V primerjavi s prejšnjimi raziskavami, kjer so rezultati kazali na veliko višje odstotke seroprevalence [(66,7 % (Dovč, 1998), 22,5 % (Dovč in sod., 2000) in 23,7 % (Dovč, 2004)], kažejo rezultati naše naloge (8,14 %) na ugodnejši epidemiološki položaj v primerjavi s prejšnjimi leti.

Prisotna je velika razlika v odstotkih seroprevalence in neposrednem dokazu DNA. Interpretacija rezulatov predstavlja veliko pomankljivost seroloških testov. Pozitiven serološki test je dokaz, da je bila ptica okužena s *C. psittaci* v preteklosti, vendar ne dokazuje, da ima ptica trenutno akutno bolezen, ali je klicenosec. Medtem ko dokaz nukleinske kisline kaže na direktno prisotnost bakterije v kužnini.

V naši študiji smo pričakovali najmanj 5 % prekuženost mestnih golobov, saj številne raziskave potrjujejo prisotnost *C. psittaci* pri mestnih golobih (Tanaka in sod., 2005; Rešidbegović in sod., 2006; Heddema in sod., 2006a; González - Acuña in sod., 2007). Uspešno smo izolirali bakterijsko DNA in potrdili uporabnost "nested" PCR metode pri dokazovanju *C. psittaci* iz koloakalnih brisov mestnih golobov.

Populacija prostoživečih golobov je izrazito narasla v velikih mestih povsod po svetu. Preveliko število golobov v človeškem okolju predstavlja resen zdravstven, sanitaren, ekonomski in ekološki problem (Rešidbegović in sod., 2006). Klamidioza je zoonoza, tako zaradi zdravstvenih kot ekonomskih razlogov je pomembno takojšnje in pravilno odkrivanje vira okužbe (Trevejo in sod., 1999). Molekularne tehnike ne omogočajo samo občutljivejšo in hitrejšo diagnostiko v primerjavi s serološkim testiranjem, ampak nudijo tudi možnost tipizacije sevov. To je še posebej uporabno pri preiskavah izbruhov in potrditvi zoonoznega prenosa (Peeling in Brunham, 1996). V prihodnje bi bilo tako smiselno tipizirati/sekvenirati izolate mestnih golobov ter tako preveriti, če je genotip B res prevladujoči genotip.

## 5.2 SKLEPI

Na podlagi naše raziskave in podatkov iz literature smo prišli do naslednjih zaključkov:

- Bris kloake predstavlja ustrezen kužnino za dokaz okužbe s *Chlamydia psittaci*
- “Nested” PCR je uporabna molekularna metoda za dokazovanje DNA *C. psittaci*
- Pri mestnih golobih smo dokazali 8,14% prevalenco okužb s *C. psittaci*

## 6 POVZETEK

*C. psittaci* je obvezna znotrajcelična bakterija, ki povzroča klamidiozo pri pticah. Okužba je zoonoza, saj se lahko prenaša na človeka. Okužbo s *C. psittaci* pri ljudeh imenujemo psitakoza ali ornitiza. Ljudje se najpogosteje okužijo z aerosolom posušenega fecesa ali iz respiratornih izločkov okuženih ptic.

Mestni golobi predstavljajo pomemben vir okužbe tako za ljudi kot za druge vrste ptic. Do okužbe ljudi lahko pride v mestnih parkih, kjer se golobi redno zadržujejo. Osebe, ki golobe hrani, so lahko izpostavljeni infektivnim aerosolom posušenega fecesa, prav tako lahko pridejo v stik z okuženim perjem golobov. Izpostavljeni so tudi delavci na gradbiščih, kjer prihaja do dvigovanja prahu, ki lahko vsebuje infektivne delce.

Dokaz okužbe s *C. psittaci* tako pri pticah kot pri ljudeh predstavlja izziv za laboratorijsko diagnostiko. Postopek direktnega dokazovanje *C. psittaci* z izolacijo je zahteven, dolgotrajen postopek in predstavlja nevarnost okužbe za izvajalca. Večinoma se uporablajo serološki testi, vendar velik problem pri serološkem testiranju predstavlja interpretacija rezultatov. Zaradi teh pomankljivosti prihajajo v zadnjem času v ospredje molekularne metode, ki omogočajo specifično, občutljivo in hitro dokazovanje patogenih mikroorganizmov.

V našem raziskovalne delu smo uvedli "nested" PCR pri dokazovanju *C. psittaci* pri mestnih golobih. Celokupno DNA smo izolirali iz kloakalnih brisov s kompletom reagentov QIAamp DNA Mini Kit po navodilih proizvajalca. Z "nested" PCR smo v prvem koraku reakcije PCR pomnoževali rodovno specifičen odsek klamidijske DNA. V drugem koraku reakcije PCR pa smo pomnoževali vrstno specifičen odsek DNA *C. psittaci*, ki smo ga dokazali s pomočjo gelske elektroforeze. Na koncu smo od 86 vzorcev kloakalnih brisov mestnih golobov po elektroforezi dobili 7 pozitivnih vzorcev, kar predstavlja 8,14 % pregledanih vzorcev.

Ugotovili smo, da je “nested” PCR primerna metoda za dokazovanje *C. psittaci* pri mestnih golobih. Potrdili smo ugotovitve številnih študij, da predstavljajo mestni golobi pomemben rezervoar za *C. psittaci*, ter tako vir okužbe za ljudi in živali, ki prihajajo v stik z njimi.

## 7 VIRI

Andersen A. A. 1991. Serotyping of *Chlamydia psittaci* isolates using serovar-specific monoclonal antibodies with the microimmunofluorescence test. *Journal of Clinical Microbiology*, 29, 4: 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., Vanrompay D. 2003. Avian chlamydiosis (psittacosis, ornithosis). V: Diseases of poultry. 11<sup>th</sup> ed. Saif Y. M. (ed.). Iowa, Iowa State University Press: 863–879

Arnstein P., Meyer K. F. 1982. Psittacosis and ornithosis. V: Diseases of cage and aviary birds. Petrak M. L. (ed.). Philadelphia: Lea and Febiger: 528–534. Cit. po: Dovč A., Kos A., Slavec B., Golja J. 2000. Razširjenost klamidioze (klamidofiloze) pri prostoživečih golobih (*Columbia livia domestica*) v Ljubljani. Veterinarske novice, 26, Suppl. 1: 73–75

Arumainayagam J. T., Matthews R. S., Uthayakumar S., Clay J. C. 1990. Evaluation of a novel solid-phase immunoassay, Clearview Chlamydia, for the rapid detection of *Chlamydia trachomatis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 28, 12: 2813–2814

Bannantine J. P., Rockey D. D., Hackstadt T. 1998. Tandem genes of *Chlamydia psittaci* that encode proteins localized to the inclusion membrane. *Molecular Microbiology*, 28, 5: 1017–1026

Barbour A. G., Amano K., Hackstadt T., Perry L., Caldwell H. D. 1982. *Chlamydia trachomatis* has penicillin-binding proteins but not detectable muramic acid. *Journal of Bacteriology*, 151, 1: 420–428

Bas S., Muzzin P., Ninet B., Bornand J. E., Scieux C., Vischer T. L. 2001. Chlamydial serology: comparative diagnostic value of immunoblotting, microimmunofluorescence test, and immunoassays using different recombinant proteins as antigens. *Journal of Clinical Microbiology*, 39, 4: 1368–1377

Bavoil P., Ohlin A., Schachter J. 1984. Role of disulfide bonding in outer membrane structure and permeability in *Chlamydia trachomatis*. *Infection and Immunity*, 44, 2: 479–485

Bavoil P. M., Hsia R., Ojcius D. M. 2000. Closing in on *Chlamydia* and its intracellular bag of tricks. *Microbiology*, 146: 2723–2731

Borel N., Kempf E., Hotzel H., Schubert E., Torgerson P., Slickers P., Ehricht R., Tasara T., Pospischil A., Sachse K. 2007. Direct identification of chlamydiae from clinical samples using a DNA microarray assay – A validation study. *Molecular and Cellular Probes*, 22, 1: 55–64

Brade L., Nurminen M., Makela H., Brade H. 1985. Antigenic properties of *Chlamydia trachomatis* lipopolysaccharide. *Infection and Immunity*, 48, 2: 569–572

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

Brade H., Brade L., Nano F. E. 1987. Chemical and serological investigations on the genus-specific lipopolysaccharide epitope of *Chlamydia*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84: 2508–2512

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

CDC - Centers for disease control and prevention. 1997. Compendium of psittacosis (chlamydiosis) control. Atlanta, CDC - Centers for disease control and prevention. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 46 (No. RR-13):1–19  
<http://www.cdc.gov/mmwr/PDF/rr/rr4613.pdf>

CDC - Centers for disease control and prevention. 2000. Compendium of measures to control *Chlamydia psittaci* infection among humans (psittacosis) and pet birds (avian chlamydiosis). Atlanta, CDC - Centers for disease control and prevention. *Morbidity and Mortality Weekly Report Recommendations and Reports*, 49 (RR-8):1-17  
<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr4908a1.htm>

CDC - Centers for disease control and prevention. 2007. Summary of Notifiable Diseases, United States, 2005. Atlanta, CDC - Centers for disease control and prevention. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 54, 53: 1–96  
<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5453a1.htm>

Chahota R., Ogawa H., Mitsuhashi Y., Ohya K., Yamaguchi T., Fukushi H. 2006. Genetic diversity and epizootiology of *Chlamydophila psittaci* prevalent emong the captive and feral avian species based on VD2 region of *ompA* gene. *Microbiology and Immunology*, 50, 9: 663–678

Corsaro D., Venditti D., Valassina M. 2002. New chlamydial linages from freshwater samples. *Microbiology Comment*, 148: 343–344

Corsaro D., Venditti D. 2004. Emerging chlamydial infections. Critical Reviews in Microbiology, 30, 2: 75–106

Detection of HHV-6, EBV and TLV-2 Genomic DNAs by Nested PCR. 2005. Wisconsin, Wisconsin Viral Research Group, Ltd.  
[www.wisconsinlab.com/nested\\_pcr.htm](http://www.wisconsinlab.com/nested_pcr.htm) (20. jun. 2008): 1 str.

Dovč A. 1998. Klamidioza (*Chlamydia psittaci*) pri domačih in divjih pernatih živalih v Sloveniji. Doktorska disertacija. Ljubljana. Univerza Ljubljana, Veterinarska fakulteta: 157 str.

Dovč A., Dovč P. 1999. Molekularnobiološki opis sevov bakterije *Chlamydia psittaci*, izoliranih iz papig v Sloveniji. Zbornik Veterinarske fakultete, 36, 2: 189–199

Dovč A., Kos A., Slavec B., Golja J. 2000. Razširjenost klamidioze (klamidofiloze) pri prostoživečih golobih (*Columbia livia domestica*) v Ljubljani. Veterinarske novice, 26, Suppl. 1: 73–75

Dovč A., Zorman - Rojs O., Vergles Rataj A., Bole-Hribovšek., Krapež U., Dobeic M. 2004. Health status of free-living pigeons (*Columba livia domestica*) in the city of Ljubljana. Acta Veterinaria Hungarica, 52, 2: 219–226

Ehricht R., Slickers P., Goellner S., Hotzel H., Sachse K. 2006. Optimized DNA microarray assay allows detection and genotyping of single PCR-amplifiable target copies. Molecular and Cellular Probes, 20, 1: 60–63

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

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

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

Everett K. D. E., Bush R. M., Andersen A. A. 1999. Emended description of the order *Chlamydiales*, proposal of *Parachlamydiaceae* fam. nov. and *Simkaniaeae* 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. E. 2000. *Chlamydia* and *Chlamydiales*: more than meets the eye. *Veterinary Microbiology*, 75: 109–126

Everson J. S., Garner S. A., Fane B., Liu B. L., Lambden P. R., Clarke I. N. 2002. Biological properties and cell tropism of Chp 2, a bacteriophage of the obligate intracellular bacterium *Chlamydophila abortus*. *Journal of Bacteriology*, 184, 10: 2748–2754

Falces Salvador C., Moleiro Oliva A., Barcons Vergés M., Ausiό Rusiñol I., Alcantarilla Roura D., Sadurní Serrasolsas J. 1999. Acute pericarditis with effusion as a form of presentation of psittacosis. *Revista Española de Cardiología*, 52, 9:727–729.

Freitas Raso T., Fernandes Seixas G. H., Robaldo Guedes N. M., Pinto A. A. 2006. *Chlamydophila psittaci* in free-living blue-fronted Amazon parrots (*Amazona aestiva*) and Hyacinth mascaws (*Anodorhynchus hyacinthinus*) in the Pantanal of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Veterinary Microbiology*, 117: 235–241

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

Genekam Biotechnology AG. 2007. *Chlamydia psittaci*: Principle and use. Duisburg, Genekam Biotechnology: 1–6

Geens T., Desplanques A., Van Loock M., Bönner B. M., Kaleta E. F., Magnino S., Andersen A. A., Everett K. D. E., Vanrompay D. 2005a. Sequencing of the *Chlamydophila psittaci* *ompA* gene reveals a new genotype, E/B, and the need for a rapid discriminatory genotyping method. *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

Ghuysen J. M., Goffin C. 1999. Lack of cell wall peptidoglycan versus penicillin sensitivity: new insights into the chlamydial anomaly. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43, 10: 2339–2344

Goellner S., Schubert E., 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

González - Acuña D., Silva G. F., Moreno S. L., Cerdá L. F., Donoso E. S., Cabello C. J., López M. J. 2007. Detection of some zoonotic agents in the domestic pigeon (*Columba livia*) in the city of Chillán, Chile. Revista Chilena de Infectología, 24, 3: 199–203

Grayston J. T., Kuo G. G., Wang S. P., Altman J. 1986. A new *Chlamydia psittaci* strain, TWAR, isolated in acute respiratory tract infections. New England Journal of Medicine, 315: 161–168

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 – Čabrilović J., Vučemilo M., Granić J. 1992. Gradske golubovi (*Columba livia domestica*) – ekološki, zdravstveni i gospodarski problem grada Zagreba. Veterinarska stanica, 23: 327–331. Cit. po: Dovč A., Kos A., Slavec B., Golja J. 2000. Razširjenost klamidioze (klamidofiloze) pri prostozivečih golobih (*Columba livia domestica*) v Ljubljani. Veterinarske novice, 26, Suppl. 1: 73–75

Haag - Wackernagel D., Moch H. 2004. Health hazards posed by feral pigeons. Journal of Infection, 48: 307–313

Hackstadt T., Fischer E. R., Scidmore M. A., Rockey D. D., Heinzen R. A. 1997. Origins and functions of the chlamydial inclusion. Trends in Microbiology, 5, 7: 288–293

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

Hatch T. P., Al-Hossainy E., Silverman J. A. 1982. Adenine nucleotide and lysine transport in *Chlamydia psittaci*. Journal of Bacteriology, 150, 2: 662–670

Hedema E. R., ter Sluis S., Buys J. A., Vandebroucke - Grauls C. M. J. E., van Wijnen J. H., Visser C. E. 2006a. Prevalence of *Chlamydophila psittaci* in fecal droppings from feral pigeons in Amsterdam, The Netherlands. Applied and Environmental Microbiology, 72, 6: 4423–4425

Hedema E. R., van Hannen E. J., Duim B., de Jongh B. M., Kaan J. A., van Kessel R., Lumeij J. T., Visser C. E., Vandebroucke - Grauls C. M. J. E. 2006b. An outbreak of psittacosis due to *Chlamydophila psittaci* genotype A in a veterinary teaching hospital. Journal of Medical Microbiology, 55: 1571–1575

Heddemra E. R., Bled M. G. H. M., de Wever B., Langerak A. A. J., Pannekoek Y., Duim B. 2006c. Development of 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., Müller - Loennies S., Brade L., Lindner B., Brade H. 2003. Endotoxic activity and chemical structure of lipopolysaccharides from *Chlamydia trachomatis* serotypes E and L2 and *Chlamydophila psittaci* 6BC. European Journal of Biochemistry, 270, 3: 440–450

Hinton D. G., Shipley A., Galvin J. W., Harkin J. T., Brunton R. A. 1993. Chlamydiosis in workers at a duck farm and processing plant. Australian Veterinary Journal, 70, 5: 174–176

Hodinka R. L., Wyrick P. B. 1986. Ultrastructural study of mode of entry of *Chlamydia psittaci* into L-929 cells. Infection and Immunity, 54, 3: 855–863

Horn M., Wagner M. 2001. Evidence for additional genus-level diversity of *Chlamydiales* in the environment. FEMS Microbiology Letters, 204: 71–74

Hsia R., Ohayon H., Gounon P., Dautry - Varsat A., Bavoil P. M. 2000. Phage infection of the obligate intracellular bacterium, *Chlamydia psittaci* strain guinea pig inclusion conjunctivitis. Microbes and Infection, 2, 7: 761–772

Huhn A. 1991. Untersuchung zur Optimierung der Anzüchtung und Antigenproduktion von *Chlamydia psittaci* in Zellkulturen. Meisterbrief. Gießen, Universität Gießen, Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten Tiere. Cit. po: Kaleta E. F., Taday E. M. A. 2003. Avian host range of *Chlamydophila spp.* based on isolation, antigen detection and serology. Avian Pathology, 32, 5: 435–462

Hyde S. R., Benirschke K. 1997. Gestational psittacosis: case report and literature review. Modern Pathology, 10, 6: 602–607

Ingalls R. R., Rice P. A., Qureshi N., Takayama K., Lin J. S., Golenbock D. T. 1995. The inflammatory cytokine response to *Chlamydia trachomatis* infection is endotoxin mediated. Infection and Immunity, 63: 3125–3130

Jorgensen D. M. 1997. Gestational psittacosis in a Montana sheep rancher. Emerging Infectious Diseases, 3, 2: 191–194

Kaleta E. F., Taday E. M. A. 2003. Avian host range of *Chlamydophila spp.* based on isolation, antigen detection and serology. Avian Pathology, 32, 5: 435–462

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

Kampinga G. A., Schröder F. P., Visser I. J., Anderson J. M., Buxton D., Möller A. V. 2000. Lambing ewes as a source of severe psittacosis in a pregnant woman. *Nederlands Tijdschrift Voor Geneeskunde*, 144, 52: 2500–2504

Kayser F. H., Bienz K. A., Eckert J., Zinkernagel R. M. 2005. *Medical microbiology*. New York, Thieme: 335–340

Kempf E., Borel N., Hotzel H., Schubert E., Torgerson P., Ehricht R., Pospischil A., Sachse K. 2006. Examination of clinical samples using a DNA microarray assay for chlamydiae. V: Diagnosis, pathogenesis and control of animal chlamydiosis. Proceedings of the Fourth Annual Workshop of COST Action 855 Animal Chlamydioses and Zoonotic Implications, Edinburgh, Midlothian, 3–5 sep. 2006. Longbottom D., Rocchi M. (eds.). Edinburgh, Midlothian, Moredun Research Institute

Keše D. 2002. Klamidije. V: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana. Medicinski razgledi: 321–329

Kostanjšek R., Štrus J., Drobne D., Avguštin G. 2004. ‘*Candidatus Rhabdochlamydia porcellionis*’, an intracellular bacterium from the hepatopancreas of the terrestrial isopod *Porcellio scaber* (Crustacea: Isopoda). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54: 543–549

Kramljak Z. 2006. *Chlamydia psittaci* pri pticah - dokazovanje okužb z molekularno metodo PCR. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 1–79

Laroucau K., Trichereau A., Vorimore F., Mahé A. M. 2007. A *pmp* genes-based PCR as a valuable tool for the diagnosis of avian chlamydiosis. *Veterinary Microbiology*, 121: 150–157

Liu B. L., Everson J. S., Fane B., Giannikopoulou P., Vretou E., Lambden P. R., Clarke I. N. 2000. Molecular characterization of a bacteriophage (Cph2) from *Chlamydia psittaci*. *Journal of Virology*, 74, 8: 3464–3469

Madico G., Quinn T., 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

Madigan M. T., Martinko J. M., Parker J. 2003. Brock Biology of Microorganisms. 10<sup>th</sup> ed. New York, Person Education, Inc.: 621–623, 713–714

Mehle J., Bole - Hribovšek V. 2000. Predlagane nove vrste in nova klasifikacija klamidij. Veterinarske novice, 26: 105–109

Ménard A., Clerc M., Subtil A., Mégraud F., Bébérac 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., Daugherty H., Fields B. 1997. Application of a nested, multiplex PCR to psittacosis outbreaks. Journal of Clinical Microbiology, 35, 8: 2043–2046

Moulder J. W. 1966. The relation of the psittacosis group (chlamydiae) to bacteria and viruses. Annual Review of Microbiology, 20: 107–30. Cit. po: Vanrompay D., Ducatelle R., Haesebrouck F. 1995. *Chlamydia psittaci* infections: a review with emphasis on avian chlamydiosis. Veterinary Microbiology, 45: 93–119

Moulder J. W. 1969. A model for studying the biology of parasitism, *Chlamydia psitaci* and mouse fibroblasts cells. Bioscience, 19: 875–881. Cit. po: Vanrompay D., Ducatelle R., Haesebrouck F. 1995. *Chlamydia psittaci* infections: a review with emphasis on avian chlamydiosis. Veterinary Microbiology, 45: 93–119

Moulder J. W., Levy N. J., Schulman L. P. 1980. Persistent infection of mouse fibroblast (L cells) with *Chlamydia psittaci*: evidence for a cryptic chlamydial form. Infection and Immunity, 30, 3: 874–883

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

Naglić T., Hajsig D., Madić J., Pinter L. 2005. Klamidije. V: Veterinarska mikrobiologija: specijalna bakteriologija i mikologija. Naglić T. (ur.). Zagreb, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu: Hrvatsko mikrobiološko društvo: 239–245

NASPHV - National Association of State Public Health Veterinarians. 20008. Compendium of measures to control *Chlamydophila psittaci* infection among humans (psittacosis) and pet birds (avian chlamydiosis). Ohio, NASPHV– National Association of State Public Health Veterinarians

<http://www.nasphv.org/Documents/Psittacosis.pdf> (2. maj.2008): 1–17

Nested PCR. 2006. PCR Station.

<http://www.pcrstation.com/nested-pcr> (31. jan. 2008): 1 str.

Nurminen M., Wahlstrom E., Kleemola M., Leinonen M., Saikku P., Makela H. 1984. Immunologically related ketodeoxyoctonate-containing structures in *Chlamydia trachomatis*, Re mutants of *Salmonella* species, and *Acinetobacter calcoaceticus* var. *anitratius*. Infection and Immunity, 44, 3: 609–613

Ossewaarde J. M., Meijer A. 1999. Molecular evidence for existence of additional members of the order *Chlamydiales*. Microbiology, 145: 411–417

Peeling R. W., Brunham R. C. 1996. Chlamydiae as pathogens: new species and new issues. Emerging Infectious Diseases. 2, 4: 307–319

Poljak M. 2002. Molekularno dokazovanje virusov. V: Splošna medicinska virologija. Koren S. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 129–142

Pospíšil R., Čistáková L., Balaghová D., Čamická A. 1988. Ornithosis in restorers of St. Elisabeth Cathedral in Košice. Pracovní Lékařství, 40: 246–248. Cit. po: Trávníček M., Čisláková L., Deptula W., Stosik M., Bhide M. 2002. Wild pigeons and pheasants - a source of *Chlamydophila psittaci* for humans and animals. Annals of Agricultural and Environmental Medicine: AAEM, 9: 253–255

Principle of the PCR. 1999. Ghent, University of Ghent, Faculty of Science, Department of Biology.  
<http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html> (20. jun. 2007): 1 str.

Rasmussen S. J., Douglas F. P., Timms P. 1992. PCR detection and differentiation of *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia psittaci* and *Chlamydia trachomatis*. Molecular and Cellular Probes, 6, 5: 389–394

Raulston J. E., Wyrick P. B. 2000. Chlamydia. V: Encyclopedia of microbiology. Vol. 1. 2<sup>nd</sup> ed.. Lederberg J. (ed.). San Diego, Academic Press: 781–788

Read T. D., Fraser C. M., Hsia R. C., Bavoil P. M. 2000. Comparative analysis of Chlamydia bacteriophages reveals variation localized to a putative receptor binding domain. Microbial and Comparative Genomics, 5, 4: 223–231

Rešidbegović E., Kavazović A., Abduzaimović - Maglajlić J., Dizdarević Z., Kustura A., Gagić A., Dovč A. 2006. Some bacterial and viral pathogens in free-living pigeons from the city of Sarajevo. V: Diagnosis, pathogenesis and control of animal chlamydioses. Proceedings of the fourth annual workshop of COST action 855 animal chlamydioses and zoonotic implications, Edinburgh, Midlothian, 3–5 sep. 2006. Longbottom D., Rocchi M. (eds.). Edinburgh, Midlothian, Moredun Research Institute: 133–137

Richmond S. J., Stirling P., Ashley C. R. 1982. Virus infecting the reticulate bodies of an avian strain of *Chlamydia psittaci*. FEMS Microbiology Letters, 14, 31–36.

Rockey D. D., Heinzen R. A., Hackstadt T. 1995. Cloning and characterization of a *Chlamydia psittaci* gene coding for a protein localized in the inclusion membrane of infected cells. Molecular Microbiology, 15, 4: 617–626

Rockey D. D., Grosenbach D., Hruby D. E., Peacock M. G., Heinzen R. A., Hackstadt T. 1997. *Chlamydia psittaci* IncA is phosphorylated by the host cell and is exposed on the cytoplasmic face of the developing inclusion. Molecular Microbiology, 24, 1: 217–228

Rockey D. D., Scidmore M. A., Bannantine J. P., Brown W. J. 2002. Proteins in the chlamydial inclusion membrane. Microbes and Infection, 4: 333–340

Sachse K., Hotzel H., Slickers P., Ehricht R. 2006. The use of DNA microarray technology for detection and genetic characterisation of chlamydiae. Developments in Biologicals, 126: 203–210

Schachter J. 1990. Chlamydial infections. Western Journal of Medicine, 153, 5: 523–534

Schachter, J., H. D. Caldwell. 1980. Chlamydiae. Annual Review of Microbiology, 34: 285-309. Cit. po: Brade H., Schramek S., Schade U. Brade H. 1986. Chemical, biological, and immunochemical properties of the *Chlamydia psittaci* lipopolysaccharide. Infection and Immunity, 54, 2: 568–574

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: 683–91.

Sewell D. L. 1995. Laboratory-associated infections and biosafety. Clinical Microbiology Reviews, 8, 3: 389–405

Stephens R. S. 1992. Challenge of chlamydia research. Infectious Agents and Disease, 1, 6: 279–293. Cit. po: Vanrompay D., Ducatelle R., Haesebrouck F. 1995. *Chlamydia psittaci* infections: a review with emphasis on avian chlamydiosis. Veterinary Microbiology, 45: 93–119

Sting R., Lerke E., Hotzel H., Jodas S., Popp C., Hafez H. M. 2006. Comparative studies on detection of *Chlamydophila psittaci* and *Chlamydophila abortus* in meat

turkey flocks using cell culture, ELISA, and PCR. Deutsche tierärztliche Wochenschrift, 113, 2: 50–54

Storey C. C., Lusher M., Richmond S. J. 1989a. Analysis of the complete nucleotide sequence of Chp1, a phage which infects avian *Chlamydia psittaci*. Journal of General Virology, 70: 3381–3390

Storey C. C., Lusher M., Richmond S. J., Bacon J. 1989b. Further characterization of a bacteriophage recovered from an avian strain of *Chlamydia psittaci*. Journal of General Virology, 70: 1321–1327

Sudler C., Hoelzle L. E., Schiller I., Hoop R. K. 2004. Molecular characterization of chlamydial isolates from birds. Veterinary Microbiology, 98: 235–241

Tamura A., Higashi N. 1963. Purification and chemical composition of meningopneumonitis virus. Virology, 20: 596–604. Cit. po: Vanrompay D., Ducatelle R., Haesebrouck F. 1995. *Chlamydia psittaci* infections: a review with emphasis on avian chlamydiosis. Veterinary Microbiology, 45: 93–119

Tanaka C., Miyazawa T., Watarai M., Ishiguro N. 2005. Bacteriological survey of feces from feral pigeons in Japan. Journal of Veterinary Science, 67, 9: 951–953

Tanzer R. J., Longbottom D., Hatch T. P. 2001. Identification of polymorphic outer membrane proteins of *Chlamydia psittaci* 6BC. Infection and Immunity, 69, 4: 2428–2434

Telfer B. L., Moberley S. A., Hort K. P., Branley J. M., Dwyer D. E., Muscatello D. J., Correll P. K., England J., McAnulty J. M. 2005. Probable psittacosis outbreak linked to wild birds. Emerging Infectious Diseases, 11, 3: 391–397

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

Tissue protocol (QIAamp DNA Mini Kit only). 2003. V: QIAamp DNA mini kit and QIAamp DNA blood mini kit handbook: For DNA purification from: whole blood, plasma, serum, buffy coat, body fluids, lymphocytes, cultured cells, tissue, swabs, dried blood spots. Qiagen, Hilden (Germany): 33–36

Todd W. J., Caldwell H. D. 1985. The interaction of *Chlamydia trachomatis* with host cells: ultrastructural studies of the mechanism of release of a biovar II strain from HeLa 229 cells. Journal of Infectious Diseases, 151, 6: 1037–1044

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

Trávníček M., Čisláková L., Deptula W., Stosik M., Bhide M. 2002. Wild pigeons and pheasants - a source of *Chlamydophila psittaci* for humans and animals. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine: AAEM*, 9: 253–255

Trevejo 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

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. E. 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 Diseases*, 5, 76–76

Vanrompay D., Andersen A. A., Ducatelle R., Haesebrouck F. 1993. Serotyping of european isolates of *Chlamydia psittaci* from poultry and other birds. *Journal of Clinical Microbiology*, 31, 1: 134–137

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

Vanrompay D., Butaye P., Sayada C., Ducatelle R., Haesebrouck F. 1997. Characterization of avian *Chlamydi psittaci* strains using *omp1* restriction mapping and serovar-specific monoclonal antibodies. *Research in Microbiology*, 148: 327–333

Vanrompay D., Harkinezhad T., van de Walle M., Beeckman D., van Droogenbroeck C., Verminnen K., Laten R., Martel A., Cauwerts K. 2007. *Chlamydophila psittaci* transmission from pet birds to humans. *Emerging Infectious Diseases*, 13, 7: 1108–1110

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

Wong Y. K., Skelton S. K., Daugherty H. 1994. Utility of complement fixation and microimmunofluorescence assays for detecting serologic responses in patients with clinically diagnosed psittacosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 32, 10: 2417–2421

Wong Y. K., Sueur J. M., Fall C. H., Orfila J., Ward M. E. 1999. The species specificity of the microimmunofluorescence antibody test and comparisons with a time resolved fluoroscopic immunoassay for measuring IgG antibodies against *Chlamydia pneumoniae*. *Journal of Clinical Pathology*, 52: 99–102

Wylie J. L., Hatch G. M., McClarty G. 1997. Host cell phospholipids are trafficked to and then modified by *Chlamydia trachomatis*. *Journal of Bacteriology*, 179, 23: 7233–7242

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

Wyrick P. B. 2000. Intracellular survival by chlamydia. *Cellular Microbiology*, 2, 4: 275–282

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

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

Yin Y. P., Peeling R. W., Chen X. S., Gong K. L., Zhou H., Gu W. M., Zheng H. P., Wang Z. S., Yong G., Cao W. L., Shi M. Q., Wei W. H., Dai X. Q., Gao X., Chen Q., Mabey D. 2006. Clinic-based evaluation of Clearview Chlamydia MF for detection of *Chlamydia trachomatis* in vaginal and cervical specimens from women at high risk in China. *Sexually Transmitted Infections*, 82, Suppl 5: 33–7

**ZAHVALA**

Zahvaljujem se svoji delovni mentorici doc. dr. Keše za vso strokovno pomoč in nasvete, s katerimi mi je zelo pomagala pri pripravi diplomskega dela.

Zahvaljujem se tudi doc. dr. Alenka Dovč, dr. vet. med. z Inštituta za zdravstveno varstvo perutnine, Veterinarske fakultete Ljubljana, ki nam je dala kužnine mestnih golobov za praktični del diplomskega dela.

Posebna zahvala pa je namenjena mojima staršema, ki sta mi omogočila študij, me skozi leta spodbujala in podpirala, ter mojemu fantu, ki je bil ves čas ob meni.