



Cvetka Marhold

**UGOTAVLJANJE BAKTERIJ IZ DRUŽINE CHLAMYDIACEAE PRI  
PTICAH V SLOVENIJI**

Doktorska disertacija

Ljubljana, 2013

**UNIVERZA V LJUBLJANI**

**VETERINARSKA FAKULTETA**

UDK 636.5/.6.09:598.2:616.159-078:57.083:577.2(497.6)(043.3)

Cvetka Marhold, dr. vet. med.

**UGOTAVLJANJE BAKTERIJ IZ DRUŽINE CHLAMYDIACEAE PRI PTICAH  
V SLOVENIJI**

Doktorska disertacija

**DETECTION OF BACTERIA BELONGING TO THE FAMILY CHLAMYDIACEAE IN  
BIRDS IN SLOVENIA**

Doctoral Thesis

Ljubljana, 2013

Cvetka MARHOLD

UGOTAVLJANJE BAKTERIJ IZ DRUŽINE CHLAMYDIACEAE PRI PTICAH V SLOVENIJI

Delo je bilo opravljeno na:

VETERINARSKI FAKULTETI, UNIVERZA V LJUBLJANI

INŠITUT ZA ZDRAVSTVENO VARSTVO PERUTNINE

Predstojnica: prof. dr. Olga Zorman-Rojs, dr. vet. med.

French Agency for Food, Environmental & Occupational Health Safety (ANSES)

Animal health Laboratory of Maisons-Alfort

Bacterial Zoonoses Unit

Predstojnik: dr. Pascal Boireau

Mentorica: dr. Karine Laroucau

Javni zagovor je bil opravljen v Ljubljani, dne \_\_\_\_\_

Mentorica: prof. dr. Alenka Dovč, dr. vet. med.

Izjavljam, da je doktorska disertacija rezultat lastnega raziskovalnega dela, da so rezultati korektno navedeni in nisem kršila avtorskih pravic in intelektualne lastnine drugih.

Člani strokovne komisije za oceno in zagovor:

Predsednik: viš. zn. sod. dr. Matjaž Ocepek, dr. vet. med.

Članica: prof. dr. Olga Zorman-Rojs, dr. vet. med.

Članica: doc. dr. Darja Keše, univ. dipl. biol.

**“Bodi sprememba, ki jo želiš videti v svetu.”**

(Mahatma Gandhi)

**“Be the change you want to see in the world.”**

(Mahatma Gandhi)

## IZVLEČEK

Ključne besede:

Ptica, bolezni – diagnoza; Chlamydiaceae infekcije – mikrobiologija; Chlamydia – izolacija in čiščenje – genetika; baze, zaporedje; molekulska zaporedje, podatki; polimerazna verižna reakcija – metode; ptice; Slovenija

Okužbe z bakterijami iz družine Chlamydiaceae pri pticah v Sloveniji smo ugotavljali z molekularnimi in serološkimi metodami. Vzorce smo odvzeli 350 prostoživečim pticam in 3621 pticam v ujetništvu na različnih območjih Slovenije v letih od 2008 do 2012. V raziskavo smo vključili tudi vzorce 33 ptic, pri katerih smo v predhodnih preiskavah dokazali okužbo z bakterijo *Chlamydia psittaci*. Z metodo posredne imunofluorescence smo ugotavljali specifična protitelesa proti bakterijam iz rodu *Chlamydia* v serumih kokoši s 6 farm intenzivne reje in pri 133 drugih pticah v ujetništvu. Z metodo PCR v realnem času smo preiskali brise žrela in brise kloake 1035 ptic ter različne vrste vzorcev 33 ptic, pozitivnih na *Chlamydia psittaci* v predhodnih raziskavah. Okužbe ptic s klamidijami smo ugotavljali z metodo PCR v realnem času in analizo nukleotidnega zaporedja na odseku gena 23S rRNA, značilnem za bakterije iz družine Chlamydiaceae. Okužbo s *Chlamydia psittaci* smo dokazali pri 23 papigah, 6 prostoživečih mlakaricah, prostoživečem domačem golobu in v dveh rejah pasemskih golobov. Okužbo s *Chlamydia abortus* smo ugotovili z analizo nukleotidnega zaporedja pri treh prostoživečih sivih vranah. Z metodo PCR v realnem času smo atipično kokošjo klamidijo dokazali pri 6 kokoših in puranu dvoriščne reje in na eni farmi intenzivne reje kokoši. Pri fazanu dvoriščne reje smo ugotovili okužbo z bakterijo, katere 100% identičnosti nismo potrdili z nobenim primerljivim referenčnim sevom bakterij iz družine Chlamydiaceae. S hkratno analizo večjega števila lokusov z variabilnim številom tandemskih ponovitev (MLVA) smo bakteriji *Chlamydia psittaci* določili genotip A pri 21 papigah, genotip B pri dveh agapornisih, prostoživečem domačem golobu in v dveh rejah pasemskih golobov ter genotip C pri 6 prostoživečih mlakaricah. Specifična protitelesa proti bakterijam iz rodu *Chlamydia* smo dokazali na eni farmi intenzivne reje kokoši z najvišjim titrom protiteles 1:80 in pri eni skobčevki s titrom protiteles 1:40. Z raziskavo smo ugotovili, da so prostoživeče ptice in ptice v ujetništvu v Sloveniji nosilci različnih vrst bakterij iz družine Chlamydiaceae.

## ABSTRACT

Key words:

Bird diseases – diagnosis; Chlamydiaceae infections – microbiology; Chlamydia – isolation and purification – genetics; base sequence; molecular sequence data; polymerase chain reaction – methods; birds; Slovenia

Infections of birds with the bacteria belonging to the family Chlamydiaceae were investigated in Slovenia by molecular and serological methods. Between 2008 and 2012, samples were taken from 350 wild birds and 3621 captive birds on different locations in Slovenia. Different samples from 33 birds shown to be positive for *Chlamydia-psittaci* in previous investigations were also included in our research. The indirect immunofluorescence method was used to detect specific antibodies against bacteria of the *Chlamydia* genus in the sera of hens from six intensive poultry farms and in the sera of 133 other captive birds. The pharyngeal and cloacal swabs taken from 1035 birds and 33 previously taken samples from different birds that were positive for *Chlamydia psittaci* in the previous study were investigated by the real-time PCR method. Chlamydial infections of birds were determined by the real-time PCR and sequence analysis of the 23S rRNA gene segment, which is specific for the bacteria from the Chlamydiaceae family. Infections with *Chlamydia psittaci* were detected in 23 parrots, 6 wild mallards, one feral pigeon and in two flocks of breed pigeons. Infection with *Chlamydia abortus* was detected in three wild hooded crows. The atypical chicken Chlamydiaceae was detected in 6 backyard hens and one backyard turkey poultry and in one intensive poultry farm. In one backyard pheasant infection with an bacterium, which was not 100% identical confirmed by any comparable reference strain of bacteria from the family Chlamydiaceae, was found. The *Chlamydia psittaci* genotype A was detected in 21 parrots, genotype B was confirmed in two lovebirds, one feral pigeon and one domestic pigeon and genotype C was detected in 6 wild mallards by the Multiple-locus variable number tandem repeat analysis (MLVA). Specific antibodies against the bacteria of *Chlamydia* genus were found in one intensive chicken farm and in one budgerigar. The highest detected titres were 1:80 and 1:40, respectively. Our research confirmed that wild and captive birds in Slovenia are infected with different types of bacteria belonging to the family Chlamydiaceae.

## KAZALO VSEBINE

<b>IZVLEČEK .....</b>	5
<b>ABSTRACT .....</b>	6
<b>KAZALO VSEBINE .....</b>	7
<b>KAZALO SLIK .....</b>	10
<b>INDEX OF FIGURES .....</b>	11
<b>KAZALO TABEL .....</b>	12
<b>INDEX OF TABLES .....</b>	13
<b>SEZNAM OKRAJŠAV .....</b>	14
<b>1 UVOD .....</b>	15
<b>1.1 Namen in hipoteze .....</b>	16
<b>2 PREGLED LITERATURE .....</b>	17
<b>2.1 Splošno o bakterijah iz družine Chlamydiaceae .....</b>	17
<b>2.2 Taksonomska ureditev .....</b>	17
<b>2.3 Morfologija .....</b>	19
<b>2.4 Razvojni krog .....</b>	19
<b>2.5 Struktura celične stene .....</b>	21
<b>2.5.1 Antigeni bakterije <i>Chlamydia psittaci</i> .....</b>	23
<b>2.6 Organizacija genoma .....</b>	25
<b>2.6.1 Izražanje posameznih genov bakterije <i>Chlamydia psittaci</i> med razvojnim krogom .....</b>	28
<b>2.6.2 Genotipi bakterije <i>Chlamydia psittaci</i> .....</b>	29
<b>2.7 Metabolizem .....</b>	29
<b>2.8 Odpornost klamidij na fizikalne in kemične dejavnike .....</b>	30
<b>2.9 Okužbe z bakterijami iz družine Chlamydiaceae pri živalih in človeku .....</b>	31
<b>2.9.1 Okužbe z bakterijami iz družine Chlamydiaceae pri pticah .....</b>	31
<b>2.10 Okužbe z bakterijo <i>Chlamydia psittaci</i> pri pticah .....</b>	32
<b>2.10.1 Razširjenost v Sloveniji .....</b>	34
<b>2.10.2 Prenos okužb .....</b>	35
<b>2.10.3 Klinični znaki .....</b>	35
<b>2.10.4 Patogeneza in patoanatomske spremembe .....</b>	36
<b>2.11 Okužbe z bakterijo <i>Chlamydia psittaci</i> pri človeku .....</b>	37
<b>2.12 Okužbe z bakterijo <i>Chlamydia psittaci</i> pri drugih sesalcih .....</b>	38

<b>2.13 Laboratorijska diagnostika okužb z bakterijami iz družine Chlamydiaceae .....</b>	38
2.13.1 Odvzem vzorca in transport kužnine .....	39
2.13.2 Posredno dokazovanje okužbe z bakterijami iz rodu <i>Chlamydia</i> .....	39
2.13.3 Izolacija bakterije <i>Chlamydia psittaci</i> .....	40
2.13.4 Dokaz antiga bakterije <i>Chlamydia psittaci</i> .....	41
2.13.5 Dokazovanje nukleinske kisline bakterij iz družine Chlamydiaceae.....	41
2.13.5.1 Verižna reakcija s polimerazo (PCR) .....	42
2.13.5.2 PCR v realnem času .....	42
2.13.5.3 Genotipizacija bakterije <i>Chlamydia psittaci</i> .....	43
<b>3 MATERIAL IN METODE .....</b>	44
<b>3.1 ODVZEM VZORCEV .....</b>	44
3.1.1 Odvzem vzorcev prostoživečim pticam .....	44
3.1.1.1 Vzorci prostoživečih ptic, ujetih v najlonske mreže .....	44
3.1.1.2 Vzorci prostoživečih ptic, ki so bili vključeni v program aktivnega nadzora virusa aviarne influence (AI) v Sloveniji.....	46
3.1.1.3 Vzorci prostoživečih ptic, oskrbljenih v Ambulanti za ptice, male sesalce in plazilce .....	47
3.1.2 Odvzem vzorcev pticam v ujetništvu.....	49
3.1.2.1 Vzorci sobnih ptic, pregledanih v Ambulanti za ptice, male sesalce in plazilce .....	49
3.1.2.2 Vzorci ptic iz živalskega vrta in živalskim vrtovom podobnih prostorov.....	50
3.1.2.3 Vzorci pasemskeih golobov.....	52
3.1.2.4 Vzorci dvoriščne perutnine .....	53
3.1.2.5 Vzorci perutnine iz intenzivne reje .....	56
3.1.3 Vzorci ptic, pozitivni na bakterijo <i>Chlamydia psittaci</i> ob predhodnih raziskavah v Sloveniji .....	58
<b>3.2 LABORATORIJSKA DIAGNOSTIKA .....</b>	59
3.2.1 Molekularne metode .....	59
3.2.1.1 Izolacija celokupne DNA .....	59
3.2.1.2 PCR v realnem času .....	59
3.2.1.2.1 Dokazovanje odseka gena 23S rRNA, značilnega za bakterije iz družine Chlamydiaceae .....	60
3.2.1.2.2 Dokazovanje odseka genov ompA in incA, značilnega za bakterijo <i>Chlamydia psittaci</i> .....	62
3.2.1.2.3 Dokazovanje odseka gena na 16S rRNA, značilnega za atipično kokošjo klamidijo (ACC) iz družine Chlamydiaceae .....	63
3.2.1.3 Genotipizacija bakterije <i>Chlamydia psittaci</i> z metodo MLVA.....	64
3.2.1.4 Določanje nukleotidnega zaporedja .....	67
3.2.1.5 Pozitivne in negativne kontrole .....	69
3.2.2 Dokazovanje specifičnih protiteles proti bakterijam iz rodu <i>Chlamydia</i> .....	69
<b>3.3 STATISTIČNA ANALIZA .....</b>	71

<b>4</b>	<b>REZULTATI</b>	72
<b>4.1</b>	<b>Prostoživeče ptice</b>	72
<b>4.2</b>	<b>Sobne ptice</b>	77
4.2.1	Ugotavljanje okužbe ptic z bakterijami iz družine Chlamydiaceae z molekularnimi metodami	77
4.2.2	Ugotavljanje okužbe ptic z bakterijami iz rodu <i>Chlamydia</i> z metodo posredne imunofluorescence	79
<b>4.3</b>	<b>Ptice živalskega vrta in živalskim vrtovom podobnih prostorov (zoo parki)</b>	79
<b>4.4</b>	<b>Pasemski golobi</b>	79
<b>4.5</b>	<b>Dvoriščna perutnina</b>	82
4.5.1	Ugotavljanje okužbe ptic z bakterijami iz družine Chlamydiaceae z molekularnimi metodami	82
4.5.2	Ugotavljanje okužbe perutnine z bakterijami iz rodu <i>Chlamydia</i> z metodo IIF	84
<b>4.6</b>	<b>Perutnina intenzivne reje</b>	84
4.6.1	Ugotavljanje okužbe perutnine z bakterijami iz rodu <i>Chlamydia</i> z metodo IIF	85
4.6.2	Ugotavljanje okužbe perutnine z bakterijami iz družine Chlamydiaceae z molekularnimi metodami	87
<b>4.7</b>	<b>Vzorci ptic z dokazano okužbo s <i>Chlamydia psittaci</i> v predhodnih raziskavah</b>	88
<b>4.8</b>	<b>Filogenetska analiza odseka na genu 23S rRNA, značilnem za bakterije iz družine Chlamydiaceae</b>	90
<b>4.9</b>	<b>Ugotovljene okužbe ptic z bakterijami iz družine Chlamydiaceae v Sloveniji</b>	92
<b>4.10</b>	<b>Statistična analiza</b>	93
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA</b>	95
<b>5.1.</b>	<b>Prostoživeče ptice</b>	98
<b>5.2</b>	<b>Ptice v ujetništvu</b>	105
5.2.1	Perutnina	105
5.2.2	Papige in pevci	107
<b>5.3</b>	<b>Bakterije iz družine Chlamydiaceae pri pticah v Sloveniji nekoč in danes</b>	110
<b>6</b>	<b>ZAKLJUČKI</b>	112
<b>7</b>	<b>POVZETEK</b>	114
<b>8</b>	<b>SUMMARY</b>	117
<b>9</b>	<b>ZAHVALA</b>	120
<b>10</b>	<b>LITERATURA</b>	122

## KAZALO SLIK

<b>Slika 1:</b> Razvojni krog bakterij iz družine Chlamydiaceae.....	21
<b>Slika 2:</b> Struktura celične stene bakterije <i>Chlamydia psittaci</i> .....	22
<b>Slika 3:</b> Diagram prikazuje število kodirajočih genov za posamezno vrsto klamidije in ujemanje števila genov z drugimi vrstami klamidij .....	26
<b>Slika 4:</b> Organizacija pmp beljakovin na genomu bakterij <i>Chlamydia psittaci</i> , <i>Chlamydia abortus</i> , <i>Chlamydia felis</i> , <i>Chlamydia pneumoniae</i> in <i>Chlamydia trachomatis</i> . ....	27
<b>Slika 5:</b> Odlov prostoživečih ptic v najlonske mreže.....	45
<b>Slika 6:</b> Odvzem brisa žrela in brisa kloake prostoživeči ptici.....	45
<b>Slika 7:</b> Lokacije in število vzorčenih mlakaric ( <i>Anas platyrhynchos</i> ) in labodov grbcev ( <i>Cygnus olor</i> ) na območju Slovenije .....	47
<b>Slika 8:</b> Odvzem krvi iz vratne vene, bris žrela in bris kloake sobni ptici ob izofluranski anesteziji. ....	49
<b>Slika 9:</b> Lokacije in število vzorčenih rej pasemskih golobov na območju Slovenije .....	52
<b>Slika 10:</b> Lokacije in število vzorčene dvoriščne perutnine na območju Slovenije .....	53
<b>Slika 11:</b> Odvzem brisa žrela, brisa kloake in krilne vene pri kokoši.....	54
<b>Slika 12:</b> Lokacije vzorčenih farm intenzivne reje perutnine na območju Slovenije.....	56
<b>Slika 13:</b> Grafični prikaz redov ptic, preiskanih z molekularnimi in serološkimi metodami na okužbo z bakterijami iz družine Chlamydiaceae.....	72
<b>Slika 14:</b> Rezultati pomnoževanja DNA, značilne za bakterije iz družine Chlamydiaceae, z metodo PCR v realnem času .....	73
<b>Slika 15:</b> Lokacije in število mlakaric ( <i>Anas platyrhynchos</i> ), pozitivnih na odsek gena <i>incA</i> , značilen za bakterijo <i>Chlamydia psittaci</i> .....	74
<b>Slika 16:</b> Primerjava dveh kromatogramov nukleotidnih zaporedij iz vzorca brisa žrela pri prostoživeči sivi vrani ( <i>Corvus cornix</i> ) in mlakarici ( <i>Anas platyrhynchos</i> ).....	75
<b>Slika 17:</b> Rezultati pomnoževanja DNA, značilno za bakterijo <i>Chlamydia psittaci</i> , z metodo PCR v realnem času .....	78
<b>Slika 18:</b> Lokacije in število rej pasemskih golobov, pozitivnih na bakterijo <i>Chlamydia psittaci</i> . .....	80
<b>Slika 19:</b> Primer MLVA metode: elektroforetska ločitev produktov pomnoževanja z metodo PCR in določitev tandemskih ponovitev posameznemu lokusu pri vzorcih iz dveh rej pasemskih golobov .....	81
<b>Slika 20:</b> Lokacije dvoriščne perutnine in število osebkov, pozitivnih na bakterije iz družine Chlamydiaceae .....	82
<b>Slika 21:</b> Poravnava nukleotidnih zaporedij v odseku tarčnega gena 23S rRNA, značilnem za bakterije iz družine Chlamydiaceae .....	83
<b>Slika 22:</b> Fotografija posredne imunofluorescence negativnega in pozitivnega serumra kokoši proti bakterijam iz rodu <i>Chlamydia</i> .....	86
<b>Slika 23:</b> Lokacije farm intenzivne reje perutnine, pozitivnih na specifična protitelesa IgG iz rodu <i>Chlamydia</i> .....	86
<b>Slika 24:</b> Primerjava dveh kromatogramov nukleotidnih zaporedij referenčnega seva bakterije <i>C. psittaci</i> s sevom, izoliranim iz vzorca kokoši .....	88
<b>Slika 25:</b> Filogenetsko drevo, izdelano z metodo Neighbour-joining .....	91
<b>Slika 26:</b> Lokacije ptic, pozitivnih na bakterije iz družine Chlamydiaceae .....	92

## INDEX OF FIGURES

<b>Figure 1:</b> Development cycle of bacteria from the family Chlamydiaceae.....	21
<b>Figure 2:</b> The structure of <i>Chlamydia psittaci</i> cell wall .....	22
<b>Figure 3:</b> Diagram showing the number of genes coding for each type of chlamydia and the matching of number of genes with other species of chlamydia.....	26
<b>Figure 4:</b> Organization of pmp proteins in the genome of the bacteria <i>Chlamydia psittaci</i> , <i>Chlamydia abortus</i> , <i>Chlamydia felis</i> , <i>Chlamydia pneumoniae</i> and <i>Chlamydia trachomatis</i> .....	27
<b>Figure 5:</b> Capture of wild birds in nylon nets .....	45
<b>Figure 6:</b> Taking the pharyngeal swab and cloacal swab of a wild bird.....	45
<b>Figure 7:</b> Locations and numbers of sampled mallards ( <i>Anas platyrhynchos</i> ) and mute swans ( <i>Cygnus olor</i> ) in Slovenia ....	47
<b>Figure 8:</b> Collection of jugular vein blood, pharyngeal swab and cloacal swab in cage bird under the isoflurane anesthesia .....	49
<b>Figure 9:</b> Locations and numbers of sampled flocks of breed pigeons in Slovenia .....	52
<b>Figure 10:</b> Locatioand numbers of sampled backyard poultry in Slovenia.....	53
<b>Figure 11:</b> Collection of pharyngeal swab, cloacal swab and blood from the wing vein of a hen.....	54
<b>Figure 12:</b> Locations of the sampled farms for intensive poultry productions in Slovenia .....	56
<b>Figure 13:</b> Graphical presentation of bird orders investigated by molecular and serological methods to infection with bacteria from the family Chlamydiaceae. ....	72
<b>Figure 14:</b> Results of DNA amplification specific for bacteria belonging to the family Chlamydiaceae by PCR in real time ....	73
<b>Figure 15:</b> Locations and numbers of positive mallards ( <i>Anas platyrhynchos</i> ) on <i>incA</i> gene region specific for bacterium <i>Chlamydia psittaci</i> .....	74
<b>Figure 16:</b> Comparison of two chromatograms of nucleotide sequences from the pharyngeal swab samples from wild hooded crows ( <i>Corvus cornix</i> ) and mallards ( <i>Anas platyrhynchos</i> ) .....	75
<b>Figure 17:</b> Results of DNA amplification specific for bacterium <i>Chlamydia psittaci</i> by PCR in real time.....	78
<b>Figure 18:</b> Locations and number of flocks of breed pigeons positive to <i>Chlamydia psittaci</i> . ....	80
<b>Figure 19:</b> Example of MLVA method: electrophoretic separation of the amplification products by PCR assay and the determination of each tandem repeats on individual locus in samples from two flocks of breed pigeons. ....	81
<b>Figure 20:</b> Locations of backyard poultry and the number of specimens positive for bacteria of the family Chlamydiaceae.....	82
<b>Figure 21:</b> Aligning of the nucleotid sequences in the region of targe 23S rRNA gene specific for bacteria belonging to the family Chlamydiaceae.....	83
<b>Figure 22:</b> Photo of indirect immunofluorescence of negative serum (left) and positive serum (right) of hens against the bacteria of the genus <i>Chlamydia</i> .....	86
<b>Figure 23:</b> Locations of intensive poultry production farms with a positive specific IgG antibody of the genus <i>Chlamydia</i> ...	86
<b>Figure 24:</b> Comparison of two chromatograms of genome sequences of the reference strain of <i>C. psittaci</i> with the strain isolated from a hen sample .....	88
<b>Figure 25:</b> The phylogenetic tree constructed by the Neighbour-Joining method .....	92
<b>Figure 26:</b> Locations of positive birds for bacteria belonging to the family Chlamydiaceae. ....	92

## KAZALO TABEL

<b>Tabela 1:</b> Serotipi in izolati bakterije <i>Chlamydia psittaci</i> ter njihovi naravni gostitelji .....	24
<b>Tabela 2:</b> Značilnosti genomov različnih vrst klamidij .....	25
<b>Tabela 3:</b> Najpogosteši klinični znaki in značilnosti okužb z bakterijo <i>Chlamydia psittaci</i> pri različnih skupinah ptic v ujetništvu .....	36
<b>Tabela 4:</b> Sistematska razvrstitev prostoživečih ptic in število vzorčenih ptic, vključenih v našo raziskavo .....	48
<b>Tabela 5:</b> Sistematska razvrstitev sobnih ptic in število vzorčenih ptic, vključenih v našo raziskavo .....	50
<b>Tabela 6:</b> Sistematska razvrstitev ptic v zoo parkih ter število vzorčenih ptic, vključenih v našo raziskavo .....	51
<b>Tabela 7:</b> Sistematska razvrstitev dvoriščne perutnine in število vzorčenih ptic, vključenih v našo raziskavo .....	55
<b>Tabela 8:</b> Vzorci farm intenzivne reje perutnine, vključenih v našo raziskavo .....	57
<b>Tabela 9:</b> Seznam ptic, ki so bile pozitivne na bakterijo <i>Chlamydia psittaci</i> v predhodnih raziskavah .....	58
<b>Tabela 10:</b> Začetni oligonukleotidi in sonda, njihova nukleotidna zaporedja in velikost produktov, dobljenih z metodo PCR v realnem času .....	60
<b>Tabela 11:</b> Začetni oligonukleotidi in sonda tarčnih genov <i>ompA</i> in <i>incA</i> bakterije <i>Chlamydia psittaci</i> , njihova nukleotidna zaporedja in velikost produktov, dobljenih z metodo PCR v realnem času .....	62
<b>Tabela 12:</b> Začetni oligonukleotidi in sonda tarčnega gena, značilnega za atipično kokošjo klamidijo iz družine Chlamydiaceae, njihova nukleotidna zaporedja in velikost produktov, dobljenih z metodo PCR v realnem času .....	63
<b>Tabela 13:</b> Oznaka osmih specifičnih odsekov VNTR bakterije <i>Chlamydia psittaci</i> in njihova nukleotidna zaporedja začetnih oligonukleotidov, dolžina produktov in dolžina ponavljanja se enote .....	65
<b>Tabela 14:</b> Število tandemskih ponovitev pozitivne kontrole seva Loth bakterije <i>Chlamydia psittaci</i> pri posameznem VNTR-ju .....	67
<b>Tabela 15:</b> Pozitivni rezultati molekularnih preiskav pri posamezni prostoživeči ptici .....	76
<b>Tabela 16:</b> Pozitivni rezultati molekularnih in seroloških preiskav pri posamezni sobni ptici .....	78
<b>Tabela 17:</b> Pozitivni rezultati molekularnih preiskav pri posamezni reji pasemskeih golobov .....	81
<b>Tabela 18:</b> Pozitivni rezultati molekularnih preiskav pri posamezni ptici dvoriščne perutnin .....	84
<b>Tabela 19:</b> Matična jata kokoši, pri kateri smo s posredno imunofluoresenco dokazali specifična protitelesa proti bakteriji iz rodu <i>Chlamydia</i> ter kokošim odvzeli brise žrela in brise kloake .....	85
<b>Tabela 20:</b> Rezultati molekularnih preiskav pri matični jatah kokoši .....	87
<b>Tabela 21:</b> Pozitivni rezultati molekularnih preiskav vzorcev ptic, ki so bile pozitivne na bakterijo <i>Chlamydia psittaci</i> v predhodnih raziskavah v Sloveniji .....	89
<b>Tabela 22:</b> Rezultati molekularnih in seroloških preiskav ptic, vključenih v našo raziskavo .....	93
<b>Tabela 23:</b> Vrednosti Ct vključene v statistično analizo .....	94

## INDEX OF TABLES

<b>Table 1:</b> Serotypes and isolates of <i>Chlamydia psittaci</i> and their natural hosts .....	24
<b>Table 2:</b> Genome characteristics of different species of chlamydia .....	25
<b>Table 3:</b> The most common clinical signs and characteristics of infection with <i>Chlamydia psittaci</i> in different groups of birds in captivity .....	36
<b>Table 4:</b> Systematic classification of wild birds and the number of birds sampled included in our study .....	48
<b>Table 5:</b> Systematic classification of cage birds and number of birds sampled included in our study .....	50
<b>Table 6:</b> Systematic classification of birds at zoo parks and number of birds sampled included in our study .....	51
<b>Table 7:</b> Systematic classification of backyard poultry and number of birds sampled included in our study .....	55
<b>Table 8:</b> Samples of intensive poultry production farms included in our study .....	57
<b>Table 9:</b> List of birds positive for <i>Chlamydia psittaci</i> in the previous studies .....	58
<b>Table 10:</b> Oligonucleotide primers and probe, their nucleotide sequences and amplification size obtained by PCR in real time .....	60
<b>Table 11:</b> Oligonucleotide primers and probe of target gene <i>ompA</i> and <i>incA</i> of the bacterium <i>Chlamydia psittaci</i> , their nucleotide sequences and amplification size obtained by PCR in real time .....	62
<b>Table 12:</b> Oligonucleotide primers and probe specific for the target gene of atypical chicken Chlamydiaceae from the family Chlamydiaceae, their nucleotide sequences and amplification size obtained by PCR in real time.....	63
<b>Table 13:</b> Identification of the eight specific VNTR segments of bacterium <i>Chlamydia psittaci</i> and their nucleotide sequences of initial oligonucleotides, amplification size and the length of the repeating unit.....	65
<b>Table 14:</b> The number of tandem repeats of positive control of the strain Loth of bacterium <i>Chlamydia psittaci</i> at each VNTR.....	67
<b>Table 15:</b> Positive results of molecular methods in individual wild bird .....	76
<b>Table 16:</b> Positive results of molecular and serological testings in a single cage bird .....	78
<b>Table 17:</b> Positive results of molecular tests for each flock of breed pigeons .....	81
<b>Table 18:</b> Positive results of molecular tests for individual bird from a flock of backyard poultry.....	84
<b>Table 19:</b> Breeder poultry flock, with detected specific antibodies against bacteria of the genus <i>Chlamydia</i> by indirect immunofluorescence method and from which the pharyngeal and cloacal swabs were taken .....	85
<b>Table 20:</b> The results of molecular investigations in breed flocks .....	87
<b>Table 21:</b> Positive results of molecular investigations of samples of birds positive for <i>Chlamydia psittaci</i> in the previous research in Slovenia.....	89
<b>Table 22:</b> The results of molecular and serological investigations of birds included in our study .....	93
<b>Table 23:</b> Ct values included in the statistical analysis .....	94

## SEZNAM OKRAJŠAV

<b>2SP</b>	0,2 M saharozno fosfatni pufer (angl. <i>0.2 M sucrose phosphate buffer</i> )
<b>Ab</b>	protitelo (angl. <i>antibody</i> )
<b>ACC</b>	atypična kokošja klamidija (angl. <i>atypical chicken Chlamydiaceae</i> )
<b>AI</b>	aviarna influenca (angl. <i>avian influenza</i> )
<b>ATP</b>	adenozin trifosfat (angl. <i>adenosine triphosphate</i> )
<b>bp</b>	bazni par (angl. <i>base pair</i> )
<b>CDSs</b>	kodirajoči geni (angl. <i>coding sequences</i> )
<b>Ct</b>	točka preboja, na kateri pride do dviga signala fluorescence poročevalske molekule nad vrednostjo praga, ki se izraža v številu ciklov (angl. <i>cycle threshold</i> )
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	bidestilirana voda (angl. <i>double-distilled water</i> )
<b>DIF</b>	neposredna imunofluoresanca (angl. <i>direct immunofluorescence</i> )
<b>DNA</b>	deoksiribonukleinska kislina (angl. <i>deoxyribonucleic acid</i> )
<b>dNTP</b>	deoksinukleozid trifosfat (angl. <i>deoxyribonucleotide triphosphate</i> )
<b>ELISA</b>	encimsko imunski test (angl. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> )
<b>ET</b>	elementarno telesce (angl. <i>elementary body</i> )
<b>GTP</b>	gvanozin trifosfat (angl. <i>guanosine triphosphate</i> )
<b>IIF</b>	posredna imunofluoresanca (angl. <i>indirect immunofluorescence</i> )
<b>IT</b>	intermediarno telesce (angl. <i>intermediate body</i> )
<b>LPS</b>	lipopolisaharid (angl. <i>lipopolysaccharide</i> )
<b>MLVA</b>	hkratna analiza večjega števila lokusov z variabilnim številom tandemskih ponovitev (angl. <i>multiple locus variable number tandem repeat analysis</i> )
<b>MOMP</b>	poglavitna beljakovina zunanje membrane (angl. <i>major outer membrane protein</i> )
<b>ORF</b>	odprt bralni okvir (angl. <i>open reading frame</i> )
<b>PBS</b>	fosfatni pufer (angl. <i>phosphate buffer saline</i> )
<b>PCR</b>	verižna reakcija s polimerazo (angl. <i>polymerase chain reaction</i> )
<b>Pmp</b>	polimorfna beljakovina zunanje membrane; (angl.: <i>polymorphic membrane protein</i> )
<b>PZ</b>	spreminjajoče območje gena (angl. <i>plasticity zone</i> )
<b>RFLP</b>	polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov (angl. <i>restriction fragment length polymorphism</i> )
<b>RNA</b>	ribonukleinska kislina (angl. <i>ribonucleic acid</i> )
<b>rRNA</b>	ribosomalna ribonukleinska kislina (angl. <i>ribosomal ribonucleic acid</i> )
<b>RT</b>	retikularno telesce (angl. <i>reticulate body</i> )
<b>TTSS</b>	sekrecijski sistem tipa III (angl. <i>type III secretion system</i> )
<b>VNTR</b>	variabilno število tandemskih ponovitev (angl. <i>variable number tandem repeat</i> )

## 1 UVOD

Klamidije so majhne, kokoidne, po Gramu negativne bakterije, ki jih uvrščamo v družino Chlamydiaceae. So obvezni znotrajcelični organizmi z značilnim dvofaznim razvojnim življenjskim krogom. Znotraj družine Chlamydiaceae je rod *Chlamydia* (C.), v katerega uvrščamo devet vrst: *C. trachomatis*, *C. pneumoniae*, *C. psittaci*, *C. abortus*, *C. pecorum*, *C. muridarum*, *C. suis*, *C. felis* in *C. caviae*.

Okužbe s klamidijami povzročajo številna obolenja pri različnih vrstah živali in pri človeku. Pomembna zoonoza je aviarna klamidioza, ki jo povzroča bakterija *C. psittaci*. Naravnii gostitelji te bakterije so ptice. Pri njih najpogosteje povzroča okužbo dihal, prebavil in očesne veznice. Okužba lahko poteka z ali brez kliničnih znakov. Okužene ptice izločajo povzročitelja z očesnimi in nosnimi izločki ter z iztrebki. Širok razpon okuženih vrst ptic s *C. psittaci* kaže, da obstajajo številni mehanizmi prenosa povzročitelja. Najpogostejši način okužbe je inhalacija s klamidijami onesnaženega aerosola in redkeje tudi zaužitje s klamidijami onesnažene hrane. Pri nekaterih vrstah ptic je dokazan tudi vertikalni prenos.

Do nedavnega so diagnostične metode klamidijskih okužb temeljile predvsem na izolaciji povzročitelja in dokazovanju specifičnih protiteles. Zaradi dolgotrajnosti in zahtevnosti gojenja klamidij s klasičnimi metodami ter otežene interpretacije seroloških rezultatov so pri dokazovanju okužb s klamidijami doble večji pomen molekularne metode. Prednost teh metod je predvsem v hitrosti, občutljivosti in specifičnosti.

Pri pticah so z molekularnimi metodami uspeli dokazati okužbe z različnimi vrstami klamidij: *C. psittaci*, *C. trachomatis*, *C. abortus*, *C. muridarum*, *C. pecorum*, *C. suis* in z atipičnimi vrstami klamidij.

V Sloveniji je predhodna diagnostika klamidijskih okužb pri pticah temeljila na izolaciji bakterije *C. psittaci*, dokazovanju njenega antigena in dokazovanju specifičnih protiteles proti *C. psittaci*, predvsem pri sobnih pticah, pasemskih golobih in perutnini v intenzivni reji.

## 1.1 Namen in hipoteze

Namen naše raziskovalne naloge je bil:

- z molekularnimi in serološkimi metodami ugotoviti razširjenost okužb z bakterijami iz družine Chlamydiaceae pri prostoživečih pticah, sobnih pticah, pticah v živalskem vrtu in v živalskim vrtom podobnih prostorih, dvoriščni perutnini in perutnini v intenzivni rejti v Sloveniji,
- uvesti sodobne molekularne metode za ugotavljanje okužb s klamidijami pri različnih vrstah ptic,
- z molekularnimi metodami potrditi okužbo ptic z različnimi genotipi *C. psittaci* in ugotoviti okužbe z vrstami klamidije, ki še v Sloveniji niso bile dokazane,
- na podlagi rezultatov molekularnih preiskav in filogenetske obdelave podatkov poskušati določiti odnose med klamidijami in njihovimi gostitelji.

Z raziskavo smo skušali potrditi naslednje hipoteze:

- prostoživeče ptice in ptice v ujetništvu v Sloveniji so nosilci različnih vrst bakterij iz družine Chlamydiaceae,
- ptice v Sloveniji so okužene z različnimi genotipi *C. psittaci* in
- menimo, da na osnovi genotipizacije *C. psittaci* lahko določimo povezave med posameznimi okužbami ptic s klamidijami v preteklih letih v Sloveniji.

## 2 PREGLED LITERATURE

### 2.1 Splošno o bakterijah iz družine Chlamydiaceae

Klamidije imenujemo bakterije, uvrščene v družino Chlamydiaceae. Ime izvira iz grškega poimenovanja *chlamys* (gr.: χλαμύς), kar pomeni plašč. Klamidije so v času odkritja opazili obdane z membrano, ki so jo imenovali plašč, znotraj evkariontskih celic (Eugster, 1980).

Klamidije so majhne, kokoidne, po Gramu negativne bakterije. Imajo edinstven dvofazni razvojni krog, ki vključuje infektivno, metabolno neaktivno elementarno telesce in neinfektivno, metabolno aktivno retikularno telesce (Vanrompay in sod., 1995).

Bakterije iz družine Chlamydiaceae povzročajo različna obolenja pri živalih in pri človeku. Okužbe s posameznimi vrstami klamidij se lahko prenesejo med živalmi različnih vrst in tudi z živali na ljudi. Do sedaj so okužbe s klamidijami potrdili pri sesalcih, pticah, plazilcih, dvoživkah in členonožcih (Longbottom in Coulter, 2003; Rodolakis in Yousef Mohamad, 2010; Circella in sod., 2011).

### 2.2 Taksonomska ureditev

Klamidije so sprva, v začetku 20. stoletja, uvrščali med protozoje (Halberstadter in von Prowazek, 1907). Šele po več desetletjih raziskovanj so jih zaradi njihove obvezne znotrajcelične narave uvrstili med viruse (Bedson in Western, 1930). V 60. letih prejšnjega stoletja so s pomočjo izolacije patogena in elektronske mikroskopije ugotovili, da so bakterije. Klamidije imajo v nasprotju z virusi obe nukleinski kislini (DNA in RNA) in celično steno, po strukturi primerljivo s celično steno Gram negativnih bakterij. Razmnožujejo se z delitvijo na dvoje in so občutljive na antibiotike (Stainer in van Niel, 1962).

Klamidije so najprej uvrstili v red Rickettsiales, ker tako kot rikecije rastejo in se razmnožujejo le v živih celicah gostitelja. V primerjavi z rikecijami imajo klamidije edinstven razvojni krog in ne morejo sintetizirati visoko energetskih molekul adenozintrifosfata (ATP) in gvanozintrifosfata (GTP) ter nimajo citokromov in drugih komponent dihalne verige (Ward, 1983).

Page je leta 1966 predlagal taksonomsko prerazporeditev klamidij, in sicer v nov red Chlamydiales (Page, 1966). V 80. letih prejšnjega stoletja so v red Chlamydiales uvrstili družino Chlamydiaceae z rodom *Chlamydia*, ki je zajemal dve vrsti: *C. trachomatis* in *C. psittaci* (Page, 1968; Storz in Page, 1971).

Vrsti *C. trachomatis* in *C. psittaci* so ločili glede na prisotnost glikogena v intracitoplazemskih vključkih in občutljivosti za sulfonamide. Za *C. trachomatis* je značilno, da imajo glikogen in so občutljive za sulfonamide, medtem ko so bakterije *C. psittaci* odporne proti sulfonamidom in ne vsebujejo glikogena (Ward, 1983).

Rezultati nadaljnjih imunoloških in molekularnih raziskav ter elektronske mikroskopije so bili povod, da so v rod *Chlamydia* uvrstili še novo odkriti vrsti: *C. pneumoniae* (Grayston in sod., 1989) in *C. pecorum* (Fukushi in Hirai, 1992).

Taksonomski status klamidij se spreminja z razvojem znanja o morfoloških, bioloških in molekularnih lastnostih bakterij. Na podlagi genetskih analiz so v red Chlamydiales uvrstili znotrajcelične bakterije s kompleksnim razvojnim krogom, ki imajo vsaj 80-odstotno podobnost genov za 16S in 23S rRNA (Everett in sod., 1999). V red Chlamydiales uvrščamo sedem družin: Waddliaceae, Simkaniaceae, Rhabdochlamydiaceae, Piscichlamydiaceae, Parachlamydiaceae, Criblamydiaceae in Chlamydiaceae (Lienard in sod., 2011). Slednja je s kliničnega vidika najpomembnejša družina.

Leta 1999 je Everett s sodelavci na podlagi biokemijskih in seroloških lastnosti ter molekularnih analiz genov za rRNA klamidij predlagala novo taksonomsko ureditev družine Chlamydiaceae. V družino Chlamydiaceae so uvrstili bakterije, ki imajo vsaj 97-odstotno podobnost genov za rRNA (Everett in sod., 1999). Istočasno so izolate bakterije *C. trachomatis*, ki povzročajo okužbe pri miših in hrčkih, preimenovali v novo vrsto *C. muridarum*, medtem ko so izolate, ki okužujejo prašiče, uvrstili v novo vrsto *C. suis*. Na podlagi fenotipskih, genotipskih in patogenih lastnosti so sesalske izolate bakterije *C. psittaci* razvrstili v tri nove vrste: *C. abortus*, *C. felis* in *C. caviae*. Devet vrst klamidij znotraj družine Chlamydiaceae so razvrstili v dva rodovala: *Chlamydia* in *Chlamydophila*. V rod *Chlamydia* so uvrstili tri vrste: *C. trachomatis*, *C. muridarum* in *C. suis*. V rod *Chlamydophila* pa šest vrst: *C. pecorum*, *C. pneumoniae*, *C. psittaci*, *C. caviae*, *C. felis* in *C. abortus*.

Taksonomska ureditev klamidij, ki jo je predlagala Everettova s sodelavci, ni bila dokončno sprejeta (Schachter in sod., 2001; Greub, 2010a; Greub, 2010b).

Po Bergeyevem priročniku iz leta 2010 v družino Chlamydiaceae uvrščamo rod *Chlamydia* z devetimi vrstami: *C. trachomatis*, *C. muridarum*, *C. suis*, *C. pecorum*, *C. pneumoniae*, *C. psittaci*, *C. caviae*, *C. felis* in *C. abortus* (Kuo in sod., 2010).

### **2.3 Morfologija**

Klamidije so negibljive, kokoidne, po Gramu negativne bakterije. Velikost in oblika klamidije je odvisna od vrste in razvojne stopnje bakterije (Naglić in sod., 2005).

Tekom razvojnega kroga se pojavljata dve funkcionalno in morfološko različni oblici klamidij. Zunajcelično obliko imenujemo elementarno telesce (ET), je infektivno in metabolno neaktivno. Elementarno telesce je okrogle oblike s premerom od 0,2 do 0,4 µm. Znotrajcelično obliko klamidije imenujemo retikularno telesce (RT), ki je metabolno aktivno in neinfektivno. Retikularno telesce je v primerjavi z ET enake oblike, vendar je v premeru večje in meri od 0,5 do 2,0 µm (Wyrick in Richmond, 1989).

Obe razvojni oblici imata nukleoid, citoplazemske membrano in celično steno, vendar se molekularna sestava in velikost pri obeh strukturah razlikujeta (Ward, 1983).

Infektivno ET je obdano s troslojno ovojnicico, ki omogoča osmotsko stabilnost in odpornost klamidijskega organizma izven gostiteljske celice (Raulston in Wyrick, 2000).

### **2.4 Razvojni krog**

Klamidije imajo edinstven dvofazni razvojni krog, v katerega sta vpeti obe morfološki oblici klamidij: ET in RT (Abdelrahman in Belland, 2005). Razvojni krog klamidij poteka v več stopnjah in vključuje: pritrditev in vstopanje ET v celice gostitelja, pretvorba ET v RT, rast in delitev RT, dozorevanje RT v ET in sprostitev ET iz celic gostitelja (Hammerschlag, 2002).

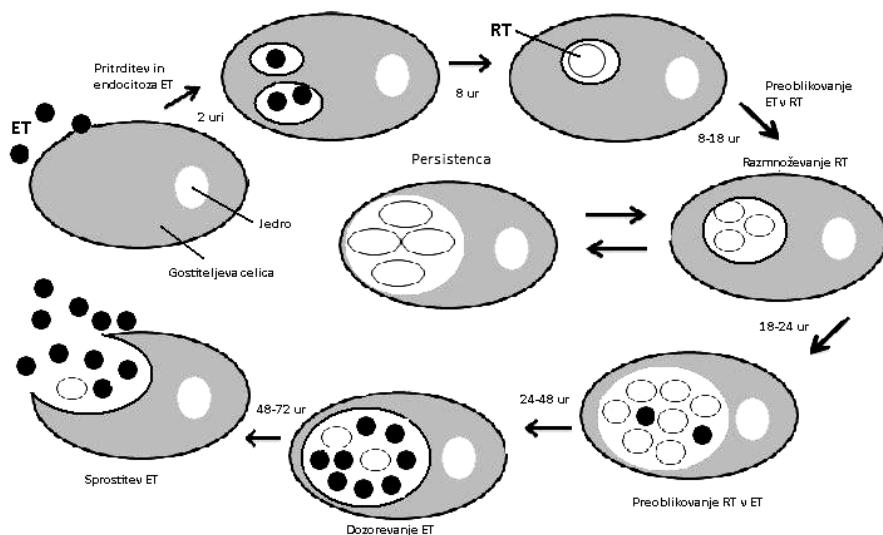
Infektivna ET se pritrdijo na površino gostiteljske celice in vanjo vstopijo z endocitozo. Med prehodom ET v gostiteljevo celico se z uvihanjem gostiteljeve celične membrane oblikujejo inkruzije, v katerih se nahajajo ET. Pri tem se klamidijski fagosomi ne spojijo s celičnimi lizosomi in tako ostane razvojna oblika klamidije v celici gostitelja nepoškodovana. V inkruziji se infektivna ET preoblikujejo v metabolno aktivna RT. Le-ta se razmnožujejo z delitvijo na dvoje in oblikujejo mikrokolonije (Hammerschlag, 2002).

Po razmnoževanju se RT preoblikujejo v ET (Abdelrahman in Belland, 2005). V okuženi gostiteljevi celici se razvije 10 do 1000 novih ET (Naglić in sod., 2005). Z elektronskim mikroskopom so vidne tudi vmesne razvojne oblike klamidij, imenovane intermediarna telesca (IT), (Abdelrahman in Belland, 2005).

Mehanizem sproščanja klamidij iz gostiteljskih celic poteka z eksocitozo (Todd in Caldwell, 1985) ali z lizo celice (Vanrompay in sod., 1995). Sproščena ET lahko nadalje okužijo sosednje tarčne gostiteljeve celice ali pa zapustijo organizem gostitelja. Izven gostitelja se ET prenašajo bodisi z aerosolom ali z neposrednim stikom z gostiteljem (Rodolakis in Yousef Mohamad, 2010).

Razvojni krog klamidij se zaključi, ko pride do sprostitve ET iz celic gostitelja. Časovni potek razvojnega kroga je odvisen predvsem od vrste klamidij in lahko traja od 36 do 96 ur (Corsaro in sod., 2003).

V interakciji med gostiteljevo celico in klamidijo se lahko razvije tudi aberantna oblika, ki je povezana s persistenco klamidij. Na tej stopnji ni rasti in razmnoževanja klamidij (slika 1). Pri persistenci se preoblikovanje RT v ET zgodi kasneje (Beatty in sod., 1994).



**Slika 1:** Razvojni krog bakterij iz družine Chlamydiaceae. Povzeto po: Hammerschlag (2002).

**Figure 1:** Development cycle of bacteria from the family Chlamydiaceae. Adapted from: Hammerschlag (2002).

## 2.5 Struktura celične stene

Celična stena klamidij je po strukturi podobna celični steni Gram negativnih bakterij. Klamidije so v vseh fazah razvoja obdane s citoplazemsko membrano in zunanjo membrano (Vanrompay in sod., 1995). Zunanjo membrano sestavljajo fosfolipidi, lipidi, lipopolisaharidi, glikolipidi in beljakovine (Turković in Brudnjak, 1989).

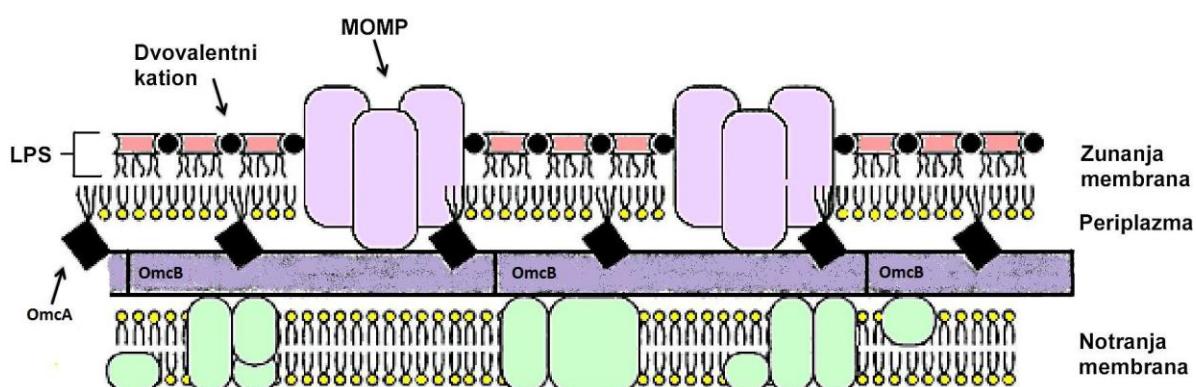
Klamidije, v nasprotju z ostalimi Gram negativnimi bakterijami, v celični steni nimajo muraminske kisline, ki je sestavni del peptidoglikana (Barbour in sod., 1982). Prisotnosti peptidoglikana pri klamidijah niso uspeli dokazati, čeprav so z analizo gena odkrili gene, potrebne za njegovo sintezo (Moulder, 1993; McCoy in sod., 2003).

V celični steni klamidij je struktura, ki spominja na peptidoglikan. To strukturo sestavlja mreža heksagonalnih podenot, v katero so z disulfidnimi vezmi povezane poglavitne beljakovine zunanje membrane (MOMP, angl. *major outer membrane protein*) in beljakovine periplazemskega prostora. Beljakovinsko strukturo periplazemskega prostora sestavljajo s cisteinom bogate beljakovine (OmcA) in s cisteinom bogati lipoproteini (OmcB), (Everett in Hatch, 1995; Heinz in sod., 2009). Takšno strukturno mrežo zasledimo le pri ET (Kaleta in Taday, 2003).

Beljakovine zunanje membrane (omp, angl. *outer membrane protein*) so najpomembnejše patogene determinante klamidij in so ključne v procesu pripajanja, vstopanja ter pri preprečevanju zlitja klamidijskega fagosoma s celičnimi lizosomi (Wyllie in sod., 1998).

MOMP predstavljajo 60 % vseh beljakovin zunanje membrane in jih zasledimo pri ET in RT. Struktura beljakovin se pri posamezni razvojni obliki klamidije razlikuje. V ET so MOMP z disulfidnimi vezmi močno povezane med seboj. V RT disulfidnih vezi ni, kar omogoča vnos hranil ter energetskih molekul v samo klamidijo (McClarty, 1994). Bavoil in sodelavci so dokazali, da MOMP v celici gostitelja deluje kot porin (Bavoil in sod., 1984).

V zunanjem membranskih stenah klamidij so vpete tudi beljakovine iz družine polimorfnih membranskih beljakovin (pmp, angl. *polymorphic membrane protein*). Beljakovine pmp sodelujejo predvsem pri vezavi klamidij na gostiteljevo celico, signalizaciji, transportu hranil in energetskih molekul (Rockey in sod., 2000).



Slika 2: Struktura celične stene bakterije *Chlamydia psittaci*. Povzeto po: Everett in Hatch (1995).

Figure 2: The structure of *Chlamydia psittaci* cell wall. Adapted from: Everett and Hatch (1995).

### 2.5.1 Antigeni bakterije *Chlamydia psittaci*

Predstavniki družine Chlamydiaceae imajo značilen lipopolisaharidni antigen (LPS, angl. *lipopolysaccharide*), (Rockey in sod., 2000; Heine in sod., 2003). Klamidijski LPS antigen ima tri antigenska področja, od katerih je le eno specifično za rod *Chlamydia*. Ostali dve antigenski determinanti sta skupni nekaterim po Gramu negativnim bakterijam. Zaradi tega lahko pri diagnostičnih metodah nastanejo navzkrižne reakcije klamidijskega LPS antiga na z LPS antigeni bakterij *Acinetobacter calcoaceticus* in *Salmonella* spp. (Nurminen in sod., 1984; Brade in sod., 1985).

Za LPS *C. psittaci* so ugotovili, da poleg epitopa, značilnega za rod *Chlamydia*, vsebuje tudi vrstno značilni epitop (Brade in sod., 2000).

Antigenske determinante, ki so značilne za rod, vrsto in tip bakterije *C. psittaci*, se nahajajo na beljakovinah MOMP (Vanrompay in sod., 1995). Za tipizacijo izolatov klamidij se uporablajo monoklonalna protitelesa (Andersen, 1991). Specifična protitelesa prepozna značilne regije na površini epitopov MOMP. Beljakovina MOMP je hkrati tudi glavni imunogen pri naravni okužbi s klamidijami. Zato protitelesa, usmerjena proti epitopom MOMP, ščitijo organizem gostitelja pred okužbo s klamidijami (Vanrompay in sod., 1995).

Z uporabo specifičnih monoklonalnih protiteles proti MOMP-u bakterije *C. psittaci* so serotipe razvrstili v osem skupin (A-F, M56 in WC). Med njimi jih je šest prvotno izoliranih iz ptic (A-F) in dva iz sesalcev (M56 in WC), kar prikazujemo v tabeli 1 (Longbottom in Coulter, 2003; Rodolakis in Yousef Mohamad, 2010).

**Tabela 1:** Serotipi in izolati bakterije *Chlamydia psittaci* ter njihovi naravni gostitelji. Povzeto po: Andersen in Vanrompay (2000).

**Table 1:** Serotypes and isolates of *Chlamydia psittaci* and their natural hosts. Adapted from: Andersen and Vanrompay (2000).

Serotip	Izolat	Naravni gostitelj
A	VS1	papige
B	CP3	golobi
C	GR9	race, gosi
D	NJ1	purani
E	MN	golobi, purani
F	VS225	papige
M56	M56	pižmovke, snežni zajec
WC	WC	govedo

Serotipi bakterije *C. psittaci* so praviloma vrstno specifični. Serotip A je endemično prisoten med papigami različnih vrst, sporadična obolenja pa povzroča tudi pri ljudeh, drugih sesalcih in plazilcih. Serotip B se endemično pojavlja pri golobih in puranih. Pri prežvekovalcih povzroča splav. Serotip C je pogosto ugotovljen pri racah in goseh, redkeje pri labodih, puranih in jerebicah. Serotip D je večinoma prisoten pri puranih, redkeje pri galebih, čapljah in papigah. Serotip E, predhodno znan kot povzročitelj meningopnevmonitisa pri ljudeh, so dokazali pri številnih vrstah ptic, najpogosteje pri racah in golobih, redkeje pri nojih in nandujih. Serotip F je bil prvotno dokazan pri papigah, kasneje tudi pri perutnini v intenzivni rej. Serotip M56 so ugotovili pri pižmovkah in zajcih, serotip WC pa endemično pri govedu (Andersen in Vanrompay, 2000; Geens in sod., 2005a; Van Loock in sod., 2005).

Prenos okužbe *C. psittaci* z živali na človeka je možen z vsemi serotipi bakterije (Harkinezhad in sod., 2009a).

## 2.6 Organizacija genoma

Zaradi prilagoditve na znotrajcelični način življenja so klamidije tekom evolucije izgubile številne gene za življenje na prostem, kar je vodilo v zmanjševanje velikosti njihovega genoma (Voigt in sod., 2012).

Klamidije imajo v primerjavi z ostalimi bakterijami zelo majhen genom, ki je le malo večji od najmanjšega predstavnika genoma iz rodu *Mycoplasma*. Prvi klamidijski genom je bil analiziran leta 1998, in sicer izolat *C. trachomatis* D/UW-3/Cx. Sestavljata ga kromosom, ki vsebuje 1.042.519 baznih parov (bp), in plazmid s 7.493 bp. Ugotovili so, da kromosom vsebuje 894 kodirajočih genov (CDSs, angl. *coding sequences*), (Stephens in sod., 1998). S sekvenčno analizo DNA so pri izolatu *C. psittaci* 6BC ugotovili, da je kromosom sestavljen iz 1.171.660 bp z 967 kodirajočimi geni in plazmid iz 7553 bp (Voigt in sod., 2012). Značilnosti genomov pri različnih vrstah klamidij so podane v tabeli 2.

**Tabela 2:** Značilnosti genomov različnih vrst klamidij. Povzeto po: Voigt in sod. (2012).

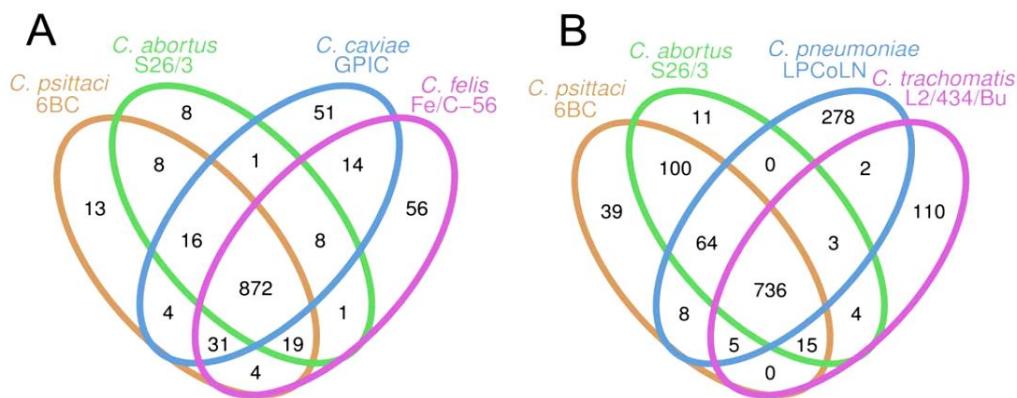
**Table 2:** Genome characteristics of different species of chlamydia. Adapted from: Voigt et al. (2012).

	<i>C. psittaci</i> 6BC	<i>C. abortus</i> S26/3	<i>C. felis</i> Fe/C-56	<i>C. caviae</i> GPIC	<i>C. pneumoniae</i> LPCoLN	<i>C. trachomatis</i> L2/434/Bu
<b>Genom (bp)</b>	1 171 660	1 144 377	1 166 239	1 173 390	1 241 020	1 038 842
<b>CDSs</b>	967	932	1005	998	1097	874
<b>Ø Gen (bp)</b>	1083	1075	1059	1051	1012	1059

Legenda: (bp) = bazni pari, (CDSs) = število kodirajočih genov, (Ø) = povprečna dolžina.

Legend: (bp) = base pairs, (CDSs) = number of coding genes, (Ø) = average length.

Ohranjenost števila kodirajočih genov pri bakteriji *C. psittaci*, *C. abortus*, *C. caviae*, *C. felis*, *C. psittaci*, *C. abortus*, *C. pneumoniae* in *C. trachomatis* je podrobnejše prikazana na sliki 3 (Voigt in sod., 2012).



**Slika 3:** Diagram prikazuje število kodirajočih genov za posamezno vrsto klamidije in ujemanje števila genov z drugimi vrstami klamidij. Slika A prikazuje primerjavo med bakterijami *C. psittaci*, *C. abortus*, *C. caviae* in *C. felis*. Slika B prikazuje primerjavo med bakterijami *C. psittaci*, *C. abortus*, *C. pneumoniae* in *C. trachomatis*. Povzeto po: Voigt in sod. (2012).

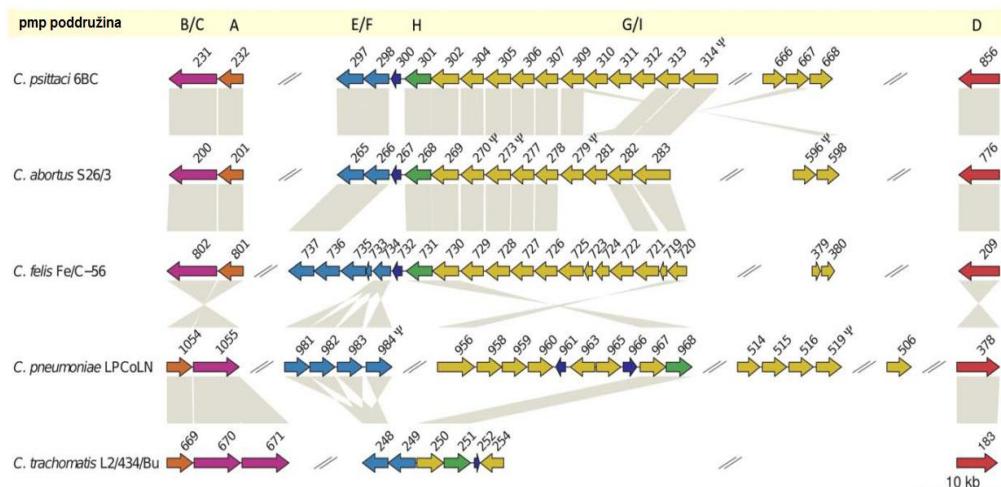
**Figure 3:** Diagram showing the number of genes coding for each type of chlamydia and the matching of number of genes with other species of chlamydia. Figure A shows the comparison between the bacterium *C. psittaci*, *C. abortus*, *C. caviae* and *C. felis*. Figure B shows the comparison between the bacterium *C. psittaci*, *C. abortus*, *C. pneumoniae* and *C. trachomatis*. Adapted from: Voigt et al. (2012).

Pri večini izolatov *C. psittaci* so odkrili 7553 bp velik plazmid (McClenaghan in sod., 1984; Thomas in sod., 1997). Plazmid so poimenovali pCpA1 (Thomas in sod., 1997). Pri izolatih *C. felis* in *C. caviae* so odkrili plazmide različnih velikosti, medtem ko jih pri izolatih *C. abortus* sploh niso dokazali (Wyrick in Richmond, 1989). Vsi klamidijski plazmidi imajo osem glavnih odprtih bralnih okvirjev (ORF, angl. *open reading frame*) in so označeni od ORF1 do ORF8. Med regijama ORF1 in ORF2 se nahajajo po 22 bp dolge tandemske ponovitve, ki so zelo ohranjene.

Klamidije brez plazmidov dokazujejo, da le-ti niso nujni za obstoj bakterije, vendar pa lahko vplivajo na njeno rast in virulentnost. S primerjavo genoma plazmida in kromosoma so ugotovili, da so si plazmidi med seboj bolj sorodni. Obsežna ohranjenost nukleotidnega zaporedja v plazmidih različnih klamidij nakazuje evolucijski razvoj iz skupnega prednika (Thomas in sod., 1997). Na evolucijski razvoj klamidij vpliva izraženje različnih genov.

Najpomembnejši med njimi so geni za kodiranje polimorfnih membranskih beljakovin (pmp), geni v variabilni regiji genoma (PZ, angl. *plasticity zone*) in geni za kodiranje beljakovin sekrecijskega sistema tipa III (TTSS, angl. *type III secretion system*), (Voigt in sod., 2012).

Geni *pmp* kodirajo obsežno družino beljakovin, ki so pomembne predvsem pri vezavi ET na gostiteljevo celico in prenosu hranilnih molekul v bakterijsko celico. Polimorfne membranske beljakovine razvrščamo v 6 poddržin (A, B/C, D, E/F, G/I in H). Največja med njimi je poddržina G/I (slika 4). Pri bakteriji *C. psittaci* so dokazali 14 različnih beljakovin G/I, pri bakteriji *C. trachomatis* in *C. muridarum* pa dve. Znotraj posamezne klamidijske vrste so v genih *pmp* prisotne številne mutacije. Domnevajo, da so mutacije nastale zaradi hitre časovne prilagoditve različnim gostiteljem (Voigt in sod., 2012).



**Slika 4:** Organizacija pmp beljakovin na genomu bakterij *Chlamydia psittaci*, *Chlamydia abortus*, *Chlamydia felis*, *Chlamydia pneumoniae* in *Chlamydia trachomatis*. Povzeto po: Voigt in sod. (2012).

**Figure 4:** Organization of pmp proteins in the genome of the bacteria *Chlamydia psittaci*, *Chlamydia abortus*, *Chlamydia felis*, *Chlamydia pneumoniae* and *Chlamydia trachomatis*. Adapted from: Voigt et al. (2012).

Variabilne regije v genomu so značilne za vse klamidije. Geni PZ so pomembni za virulentnost in patogenost pri posamezni klamidijski vrsti. Pri *C. psittaci* PZ vključuje 16 genov, pri *C. abortus* 11 genov, pri *C. caviae* 22 genov in pri *C. felis* 29 genov (Voigt in sod., 2012).

Geni, ki kodirajo TTSS, so prisotni pri številnih po Gramu negativnih bakterijah. Za posamezne vrste klamidij je značilno, da imajo na tem področju nizko število ohranjenih nukleotidov. Pri aktivaciji TTSS naj bi prišlo do sproščanja klamidijskih beljakovin v citoplazmo gostiteljske celice na primer beljakovine inc (angl. *inclusion membrane protein*), ki se vgradijo v inkluzijsko membrano. Pri bakteriji *C. trachomatis* so dokazali sedem beljakovin inc (A-G), medtem ko so pri *C. psittaci* poznane tri: incA, incB in incC. Beljakovini incA in incB vplivata na imunski odgovor gostitelja. Predvidevajo, da ima incB vlogo pri preprečitvi združitve klamidijskega fagosoma s celičnimi lizosomi, medtem ko vloga beljakovine incC še ni povsem znana (Voigt in sod., 2012).

### **2.6.1 Izražanje posameznih genov bakterije *Chlamydia psittaci* med razvojnim krogom**

Tekom razvojnega kroga bakterije *C. psittaci* se izražajo različni geni, ki jih razdelimo v tri skupine: zgodnji, srednji in pozni prepisi genov.

Zgodnji prepisi genov začnejo nastajati v eni do dveh urah po okužbi. Med pomembnejše produkte zgodnjih prepisov spadajo beljakovine EUO (angl. *early upstream ORF*) in beljakovine stresnega odziva (GroEL in DnaK). Te so ključnega pomena za obstoj in preobrazbo ET v RT (Beatty in sod., 1994; Zhang in sod., 1998).

Srednji prepisi nastanejo šest ur po okužbi, ko poteka rast in razmnoževanje RT. Najpomembnejša beljakovina v tej faziji je MOMP, ki jo kodira gen *ompA* (Yuan in sod., 1990; Kaltenboeck in sod., 1993).

Pozni prepisi nastanejo dvajset ur po okužbi, ko pride do preobrazbe RT v ET. V tej faziji se aktivira operon *crp* (angl. *cysteine rich protein*). Nastajajo s cisteinom bogate beljakovine, ki so pomembne za izgradnjo celične stene bakterije (Thomas in sod., 1997).

### **2.6.2 Genotipi bakterije *Chlamydia psittaci***

Gen *ompA* vsebuje ohranjene regije (CD, angl. *conserved domains*), ki so obdane z variabilnimi regijami (VD, angl. *variable domains*). Z analizo sekvenc variabilnih regij na genu *ompA* določimo vrste klamidij in tudi njihove genotipe (Sachse in sod., 2008). Identičnost nukleotidnega zaporedja v genu *ompA* med posameznimi genotipi *C. psittaci* je od 98% do 99,4% (Sachse in sod., 2008).

Do sedaj je bilo ugotovljenih 9 genotipov (A-F, E/B, WC in M56) *C. psittaci*. Naravni gostitelji genotipov od A do F in E/B so ptice, medtem ko so za genotip WC in M56 naravni gostitelji sesalci (Sachse in sod., 2008).

Z molekularnimi metodami so pri *C. psittaci* odkrili genotip E/B, ki ga s specifičnimi monoklonalnimi protitelesi niso mogli potrditi. Na genotip E/B bakterije *C. psittaci* reagirajo protitelesa za serotip B in E (Geens in sod., 2005b). Genotip E/B je bil večinoma dokazan pri racah, redkeje pri puranih, golobih in papigah (Geens in sod., 2005b; Harkinezhad in sod., 2007; Beeckman in Vanrompay, 2009).

Vsi genotipi bakterije *C. psittaci* lahko povzročijo okužbo tudi pri človeku (Beeckman in Vanrompay, 2009).

### **2.7 Metabolizem**

Bakterije iz reda Chlamydiales so se tekom evolucije prilagodile na znotrajcelični način življenja. S to prilagoditvijo so klamidije izgubile lasten sistem pridobivanja energije in nekatere metabolne poti klamidij so v primerjavi z drugimi bakterijami bolj omejene (Wyrick, 2000).

Med posameznimi vrstami klamidij se sinteza biotina zelo razlikuje, kar naj bi vplivalo na izbiro njihovega naravnega gostitelja. Geni, ki so potrebni za sintezo biotina, so v celoti ohranjeni pri bakteriji *C. psittaci*, *C. abortus*, *C. felis* in *C. pneumoniae*. Okrnjeno genetsko zasnovno za sintezo biotina zasledimo pri bakteriji *C. trachomatis*, *C. muridarum* in *C. caviae* (Voigt in sod., 2012).

Klamidije ne morejo dokončati pentoznega cikla in ne uporabljajo piruvata preko cikla trikarboksilinske kisline. So pa sposobne metabolizma aspartanske in glutaminske kisline (Beatty in sod., 1994; Vanrompay in sod., 1995).

Navzočnost DNA in RNA so dokazali pri obeh oblikah klamidij (Wyrick in Richmond, 1989). Pri RT je vsebnost nukleinskih kislin višja kot pri ET (Andersen in Vanrompay, 2003). Znotraj gostiteljske celice RT sintetizira nukleinske kisline, beljakovine in aminokisline (Hatch in sod., 1982). Pri metabolizmu številnih sladkorjev in aminokislin RT ne more ustvariti visokoenergetske fosfatne vezi, zato klamidije gostiteljeve energetske molekule koristijo s pomočjo specifičnih beljakovinskih prenašalcev (Schmitz-Esser in sod., 2004).

Po vstopu klamidij oziroma po oblikovanju intracitoplazemskega vključka se le-ta združi s sfingomielinskimi vezikli Golgijevega aparata gostiteljske celice. Fosfatidilinozitol, fosfatidiholin in holesterol klamidijski vključek pridobi od endoplazmatskega retikulum in mitohondrija gostiteljske celice (Wylie in sod., 1997).

## **2.8 Odpornost klamidij na fizikalne in kemične dejavnike**

Klamidije so izven gostitelja infektivne od nekaj dni do nekaj tednov. Pri nižjih temperaturah okolja se infektivnost ET ohrani dlje časa (Naglić in sod., 2005).

Klamidije inaktiviramo s toplotno obdelavo pri 56 °C v petih minutah (Daft in sod., 1989). Občutljive so na eter, kloroform, formalin, alkohol in na delovanje ultravijolične svetlobe. Za razkuževalna sredstva se priporoča uporaba kvartarnih amonijevih spojin (Tschirch in Kaleta, 1999).

## 2.9 Okužbe z bakterijami iz družine Chlamydiaceae pri živalih in človeku

Okužbe s klamidijami so potrdili pri členonožcih (Circella in sod., 2011) in številnih vretenčarjih: sesalcih, pticah, plazilcih in dvoživkah (Condon in Oakey, 2007).

Klamidije pri ljudeh veljajo za najpomembnejše povzročitelje spolno prenosljivih okužb (*C. trachomatis*) in obolenja dihal (*C. pneumoniae*), (Kalman in sod., 1999). Pri človeku so z molekularnimi metodami potrdili vpletenost klamidij tudi pri drugih bolezenskih stanjih: arteroskleroza, Alzheimerjeva bolezen, multipla skleroza, endokarditis in Kawasakiev sindrom (Kalman in sod., 1999; Corsaro in Venditti, 2004).

Pri živalih okužbe s klamidijami povzročajo različna obolenja. Bolezni dihal povzroča pri pticah *C. psittaci*, pri mačkah *C. felis*, pri miših in hrčkih *C. muridarum* ter pri konjih, koalah, prašičih in plazilcih *C. pneumoniae*. Splav pri ovcah, kozah in govedu povzroča *C. abortus*. Obolenja prebavil in dihal pri govedu povzroča *C. pecorum* in pri prašičih *C. suis*. Očesna obolenja pri morskih prašičkih povzroča *C. caviae*. Sistemsko obolenje pri dvoživkah povzroča *C. pneumoniae* (Borel in sod., 2008; Rodolakis in Yousef Mohamad, 2010).

Okužbe z bakterijami *C. psittaci*, *C. abortus*, *C. felis* ter *C. caviae* se lahko prenesejo z živali na ljudi. Pri ljudeh najpogosteje povzročijo atipično pljučnico (*C. psittaci*), splav (*C. abortus*) ali vnetje očesne veznice (*C. felis*, *C. caviae*), (Borel in sod., 2008).

Bakterijo *C. psittaci* so izolirali tudi iz klopor: *Ixodes pacificus*, *Dermacentor occidentalis*, *Ornithodoros coriaceus*. V njihovih celicah niso potrdili razmnoževanja bakterije, kakor tudi ne vloge pri prenosu okužbe na sesalce (Schachter, 1989).

### 2.9.1 Okužbe z bakterijami iz družine Chlamydiaceae pri pticah

Pri pticah je izmed bakterij iz družine Chlamydiaceae najpogosteje dokazana okužba s *C. psittaci* (Kaleta in Taday, 2003). Nedavno so pri pticah uspeli dokazati okužbe še z drugimi vrstami klamidij: *C. abortus* (Herrmann in sod., 2000; Sachse in sod., 2012), *C. suis* in *C. muridarum* (Lemus in sod., 2010), *C. pecorum* (Frutos in sod., 2012; Sachse in sod., 2012) in *C. trachomatis* (Sachse in sod., 2012).

Z različnimi molekularnimi metodami so pri pticah ugotovili okužbe tudi z do sedaj še nepoznanimi bakterijami, ki jih na podlagi filogenetskih značilnosti uvrščamo v družino Chlamydiaceae (Gasparini in sod., 2011; Sachse in sod., 2012; Zocevic in sod., 2012). Atipično kokošjo klamidijo (ACC, angl. *atypical chicken Chlamydiaceae*) so dokazali na farmah kokoši intenzivne reje v Evropi in na Kitajskem (Zocevic in sod., 2012). V Franciji in Nemčiji so pri prostoživečih golobih dokazali okužbo z bakterijo, ki je filogenetsko najbolj sorodna bakteriji ACC. Predvidevajo, da gre za novo vrsto klamidije (Gasparini in sod., 2011; Sachse in sod., 2012). V Franciji so pri svetu ibisu (*Threskiornis aethiopicus*) ugotovili okužbo z bakterijo, za katero so predlagali poimenovanje *Candidatus Chlamydia ibidis* (Vorimore in sod., 2012).

## 2.10 Okužbe z bakterijo *Chlamydia psittaci* pri pticah

Naravni gostitelji bakterije *C. psittaci* so ptice (Everett, 2000). Okužbe s *C. psittaci* so razširjene po vsem svetu in dokazane pri več kot 465 vrstah domačih in prostoživečih ptic, razvrščenih v 30 redov (Kaleta in Taday, 2003). Najpogosteje je okužba z bakterijo *C. psittaci* potrjena pri papigah in golobih (Kaleta in Taday, 2003; Beeckman in Vanrompay, 2010).

Glavni vir okužb s *C. psittaci* za ptice in sesalce predstavljajo papige (Psittaciformes) v ujetništvu (Harkinezhad in sod., 2009a). Med 342 vrstami papig so okužbo s klamidijami potrdili pri 153 vrstah (45 %), (Kaleta in Taday, 2003). Pri papigah z znaki splošne sistemske okužbe so specifična protitelesa proti *C. psittaci* najpogosteje dokazali pri amazonkah (88 %), arah (87 %), skobčevkah (81 %), kakadujih (80 %), senegalskih papigah (78 %), afriških sivih papigah in plemenitih papigah (75 %), agapornisih (68 %) in nimfah (65 %), (Harkinezhad in sod., 2007). Okužba s *C. psittaci* pri papigah povzroča obolenost do 81% in pogin do 50% (Harkinezhad in sod., 2009a). Do sedaj so pri papigah dokazali okužbe s *C. psittaci* genotipov A, B, E (Mitchell in sod., 2009), E/B (Harkinezhad in sod., 2007) in F (Geens in sod., 2005a).

Pomemben vir okužb s *C. psittaci* pri pticah v ujetništvu so tudi prostoživeče ptice, ki se zadržujejo v jatah (Telfer in sod., 2005). Med njimi so okužbe s klamidijami najpogosteje potrdili pri golobih vrste domači golob (*Columba livia domestica*), (Sachse in sod., 2012).

Okužbo s *C. psittaci* pri golobu so prvič dokazali leta 1940, leto kasneje pa so potrdili prvi prenos patogena z goloba na človeka (Pinkerton in Swank, 1940). Dickx je s sodelavci (2010) zbrala objave, ki zajemajo obdobje raziskovanja v letih od 1966 do 2005. Pri domačih golobih so s serološkimi metodami potrdili prevalenco okužbe s *C. psittaci* od 12,5% do 95,6%. V obdobju od leta 2003 do 2007 so pri golobih z molekularnimi raziskavami dokazali prevalenco okužbe od 3,4% do 52,6% (Dickx in sod., 2010). Pri golobih so najpogosteje okužbo s *C. psittaci* dokazali z genotipom B (87,6 %), (Sachse in sod., 2012). Potrdili so tudi okužbe z genotipi A, D, E in E/B (Geens in sod., 2005b).

Med prostoživečimi pticami so okužbo s *C. psittaci* pogosto potrdili pri pevcih (Passeriformes), najpogosteje pri taščicah, sivih pevkah, velikih sinicah, plavčkih, meničkih, domačih vrabcih, kosih in ščinkavcih (Simpson in Bevan, 1989; Colvile in sod., 2012). Okužbe s *C. psittaci* so bile dokazane tudi pri številnih vodnih prostoživečih pticah, najpogosteje pri galebih, racah in goseh (Kaleta in Taday, 2003) in pri 9 vrstah ujed (Falconiformes): postovka, mali sokol, škrjančar, sokol selec, sokol plenilec, arktični sokol, južni sokol, prerijski sokol in sokol vrste *Hierofalco jugger* (Kaleta in Taday, 2003).

Prostoživeče ptice, okužene s *C. psittaci*, predstavljajo pomemben dejavnik pri prenosu okužbe na domačo perutnino (Trávnicek in sod., 2002). Bakterija *C. psittaci* lahko povzroči obsežne gospodarske izgube v intenzivni reji perutnine in hkrati lahko predstavlja tveganje za zdravje ljudi na okuženih farmah. Okužbe s *C. psittaci* so pogosto dokazane na farmah puranov, rac in gosi ter kokoši, redkeje pri pavih (Yang in sod., 2011).

Bakterija *C. psittaci* je v Ameriki med leti 1951 in 1956 ter 1980 povzročila velike ekonomske izgube na farmah intenzivne reje puranov (Eugster, 1980; Schachter, 1989). V Nemčiji, Franciji in Belgiji se od leta 1990 okužba s *C. psittaci* pri puranih pojavlja endemično (Harkinezhad in sod., 2009a). Pri puranih so dokazali okužbe s *C. psittaci* serotipov A, B, D in E (Andersen in Vanrompay, 2000) ter z genotipi A, B, D, E, F in E/B (Verminnen in sod., 2008). Med njimi je za purane najbolj virulenten serotip D, saj povzroča od 50% do 80% obolenost in do 30% pegin (Andersen in Vanrompay, 2000).

Pri racah so okužbe s *C. psittaci* serotipa C povzročile velike gospodarske izgube v Evropi, Avstraliji in Ameriki zaradi do 80% obolenosti in do 30% pogina (Andersen in Vanrompay, 2000; Laroucau in sod., 2008).

Okužbe kokoši s *C. psittaci* redko povzročajo obolenje, zato so gospodarske izgube pri kokoših v intenzivni reji manjše kot pri puranih in racah. Kljub temu tudi pri kokoših zasledimo visoko prevalenco okuženosti s *C. psittaci*. V Belgiji so s serološkimi metodami potrdili okužbo s *C. psittaci* pri 93 % kokoši matičnih jat brojlerjev ter 90 % kokoši nesnic. Okužbe s *C. psittaci* so pri kokoših dokazali z genotipi B, C, F in E/B (Yin in sod., 2012).

Prvo okužbo z bakterijo *C. psittaci* v intenzivni reji pavov so potrdili na Kitajskem leta 2009. Okužba je v reji povzročila 60% obolenosti in 10% pogin. Z molekularnimi metodami so bakteriji določili genotip B (Yang in sod., 2011).

### **2.10.1 Razširjenost v Sloveniji**

V predhodnih raziskavah so v Sloveniji okužbe s *C. psittaci* ugotovili pri domačih in prostoživečih golobih (Dovč, 1993; Dovč, 1998), papigah (Dovč, 1993; Dovč, 1998; Dovč in sod., 2005; Dovč in sod., 2007), domači perutnini (Dovč, 1998) in pticah pevkah v ujetništvu (Dovč in sod., 2005) ter pri prostoživečih mlakaricah (Dovč in sod., 2009).

V obdobju od 1991 do 1992 so z metodo posredne imunofluorescence (IIF) dokazali okužbo s *C. psittaci* pri 37 papigah od 95 pregledanih (38,95 %). Od 76 pregledanih pasemskeih golobov so pri 46 (60,53 %) dokazali specifična protitelesa IgG proti *C. psittaci* (Dovč, 1993).

Od leta 1991 do 1997 so z metodo IIF dokazali specifična protitelesa proti *C. psittaci* pri 10,2 % papig, 29,9 % pasemskeih golobov in 6,6 % domačih kokoši. V raziskavi so bili pregledani 7203 ptičji serumi. Klamidijska protitelesa so bila dokazana pri 700 serumih (9,7 %), (Dovč, 1998).

Pri 3869 papigah in 2161 pticah pevkah v ujetništvu so z metodo IIF so dokazali protitelesa proti *C. psittaci* pri 6,2 % papig, 0,9 % zebrec in 0,8 % kanarčkov ter pri dveh od petih pregledanih liščkov (Dovč in sod., 2005).

Z metodami PCR so okužbo s *C. psittaci* ugotavljali pri 50 pasemskih golobih (Kramljak, 2006), 86 domačih golobih (Verbančič, 2008), 52 mlakaricah ter 90 pticah pevkah (Dovč in sod., 2009). Okužbo so potrdili pri 7 (8,1 %) prostoživečih domačih golobih (Verbančič, 2008) in pri eni prostoživeči mlakarici (1,9 %), (Dovč in sod., 2009).

### 2.10.2 Prenos okužb

Širok razpon s *C. psittaci* okuženih prostoživečih in domačih vrst ptic nakazuje na številne mehanizme prenosa bakterije. Okužene ptice izločajo klamidije v presledkih, najpogosteje z očesnimi in nosnimi izcedki ter z iztrebki. Pri pticah izločanje *C. psittaci* pospešujejo stresni dejavniki kot so sprememba okolja, prenaseljenost, slaba oskrba s hrano in obolenost z drugimi patogeni (Longbottom in Coulter, 2003; Harkinezhad in sod., 2009a).

Ptice se najpogosteje okužijo s *C. psittaci* z vdihavanjem s klamidijami onesnaženega aerosola in redkeje tudi z zaužitjem hrane, onesnažene s klamidijami. Vertikalni prenos okužbe so dokazali pri puranih, kokoših, racah, papigah, galebih in goseh (Longbottom in Coulter, 2003; Harkinezhad in sod., 2009a).

Klamidije se med gostitelji prenašajo neposredno. Prenos okužbe s *C. psittaci* je možen med različnimi vrstami ptic, s ptic na druge živalske vrste ter na ljudi (Longbottom in Coulter, 2003).

### 2.10.3 Klinični znaki

Okužba ptic s *C. psittaci* zelo pogosto poteka brez kliničnih znakov. Klinično zaznavno okužbo ozioroma obolenje imenujemo aviarna klamidioza. Inkubacijska doba bolezni pri pticah traja od tri dni do več tednov ali tudi nekaj let. Bolezen lahko poteka latentno, akutno, subakutno ali kronično. Potez bolezni je odvisen od vrste ptice in njene dovzetnosti, bakterijskega seva, infektivne doze, stresnih dejavnikov in starosti živali (Smith in Campbell, 2010).

Klinični znaki aviarne klamidioze so pri pticah podobni znakom splošne sistemske okužbe. Pri oboleni ptici je lahko opazna apatičnost, neješčnost, našopirjenost, vnetje očesne veznice s seroznim izcedkom ter nosni izcedek (tabela 3). Oslabele ptice praviloma izločajo vodene zeleno-rumene iztrebke in so shujšane ter dehidrirane, zaradi česar lahko tudi poginejo (Smith in Campbell, 2010).

**Tabela 3:** Najpogostejši klinični znaki in značilnosti okužb z bakterijo *Chlamydia psittaci* pri različnih skupinah ptic v ujetništvu. Povzeto po: Longbottom in Coulter (2003), Eatwell (2008), Pennycott (2008), Stanford (2008), Harcourt-Brown (2009), Worell (2009).

**Table 3:** The most common clinical signs and characteristics of infection with *Chlamydia psittaci* in different groups of birds in captivity. Adapted from: Longbottom and Coulter (2003), Eatwell (2008), Pennycott (2008), Stanford (2008), Harcourt-Brown (2009), Worell (2009).

REDOVI PTIC	NAJPOGOSTEJŠI KLINIČNI ZNAKI	ZNAČILNOSTI
<b>PAPIGE</b> PSITTACIFORMES	Našopirjenost, apatičnost, konjunktivitis, sinusitis, biliverdinuria, oteženo dihanje, spremenjeno oglašanje, tortikolis.	Amazonke, skobčevke in nimfe so pogosti latentni prenašalci povzročitelja. Za aviaro klamidiozo zelo pogosto oboli afriška siva papiga.
<b>PEVCI</b> PASSERIFORMES	Splošna oslabelost, očesni in nosni izcedek, poliurični iztrebki.	Pogosto se okužijo od papig. Za okužbo so manj dovetni v primerjavi s papigami.
<b>PLEZALCI</b> PICIFORMES	Ni znano.	Pri tukanu okužba s <i>C. psittaci</i> še ni bila potrjena.
<b>GOLOBI</b> COLUMBIFORMES	Konjunktivitis, sinusitis, periorbitalna apterija, oteženo dihanje, biliverdinuria, polidipsija.	Virulentnost <i>C. psittaci</i> je pri golobih nižja kot pri papigah. Pogosto obolijo mladiči, odrasli so mnogokrat latentni prenašalci.
<b>UJEDE</b> FALCONIFORMES	Konjunktivitis, rinitis, biliverdinuria.	Okužba s <i>C. psittaci</i> je pogosto sekundarne narave. Praviloma se okužijo preko okuženega plena.
<b>PLOJKOLJUNI</b> ANSERIFORMES	Race: nestabilnost, depresija, posedanje, očesni in nosni izcedek.  Gosi: depresija, torikolis, povešene peruti.	Okužba pri racah redko povzroči klinične znaake (nevarnost prenosa okužbe na ljudi). Pogosto obolijo mladiči. Odrasli so večinoma latentni prenašalci.

#### 2.10.4 Patogeneza in patoanatomske spremembe

Okužba s *C. psittaci* se prične z vstopom bakterije v epitelne celice in makrofage gornjih dihal, kjer se klamidije tudi razmnožujejo. Preko krvnožilnega sistema se patogen zanese v različna tkiva gostitelja, najpogosteje v epitelne celice dihal, prebavil in reprodukcijskih organov (Beeckman in Vanrompay, 2010). Klamidije lahko v organizmu gostitelja povzročajo obsežne poškodbe celičnih membran in lizosomov. Aktivirani encimi lizosomov vodijo do nekroze gostiteljeve celice (Mihajlović, 1984).

Klamidije povzročajo spremembe predvsem na vranici, jetrih in zračnih vrečkah (Longbottom in Coulter, 2003). Pri akutni obliki aviarne klamidioze so ugotovili intrasinusoidalno proliferacijo Küpferjevih celic v jetrih in proliferacijo monocitov in heterofilcev ter aktivacijo retikulo-endotelnega sistema v jetrih, vranici in ledvicah. Pri kronični obliki so pogosto ugotovili tudi epiteloidne celične granulome v jetrih in vnetje pljučnega tkiva s proliferacijo epitelnih celic zračnih vreč ter migracijo limfocitov v poškodovano tkivo (Gerlach, 1994; Longbottom in Coulter, 2003).

Vranica je mnogokrat povečana, polnokrvna in lahko je prekrita s sivo-belimi nekrotičnimi spremembami. Jetra so povečana in običajno rumeno ali zelenoobarvana. V akutni oblikih so na jetrih prisotna številna območja nekroz, medtem ko pri subakutni ali kronični oblikih opazimo še hiperplazijo žolčevodov. Serozne membrane in zračne vrečke so lahko pri akutni in subakutni oblikih prekrite s fibrinom in fibropurulentnim eksudatom, medtem ko se pri kronični oblikih razvije granulomatozno vnetje. *C. psittaci* povzroči tudi vnetje srčne mišice, nadledvične žleze in reprodukcijskih organov (Longbottom in Coulter, 2003).

## 2.11 Okužbe z bakterijo *Chlamydia psittaci* pri človeku

O prvem prenosu okužbe z bakterijo *C. psittaci* s papige na človeka so poročali leta 1893 v Parizu, povzročila pa je prehladu podobne klinične znake (Vanrompay in sod., 1995). Bolezen so poimenovali psitakoza, po latinski besedi *psittacus*, kar pomeni papiga (Vanrompay in sod., 1995; Longbottom in Coulter, 2003). Prenos na ljudi so leta 1938 dokazali tudi od drugih vrst ptic. Meyer je leta 1941 bolezen preimenoval v ornitozo, po grškem izrazu za ptico (gr. *ornithos*), (Eugster, 1980).

Najpogosteji prenašalci *C. psittaci* na človeka so okužene ptice v ujetništvu: papige, golobi in perutnina v intenzivni reji (Longbottom in Coulter, 2003). Za okužbo so najbolj dovezetni otroci, nosečnice in starejše osebe oziroma ljudje s slabšo imunsko odzivnostjo. Bolezen so večinoma potrdili pri rejcih in prodajalcih ptic ter lastnikih sobnih ptic. Pogosto zbolijo tudi delavci na perutninskih obratih, veterinarji ob kliničnih ali patoanatomskih pregledih okuženih ptic ter laboratorijsko osebje ob stiku s kužnim materialom (Beeckman in Vanrompay, 2009; Rodolakis in Yousef Mohamad, 2010).

Človek se okuži z vdihavanjem aerosolov posušenih iztrebkov ali očesnih in nosnih izločkov okuženih ptic. Okužba redko poteka prek poškodovane kože ali z zaužitjem okužene hrane. Do okužbe pogosto pride med rokovanjem z okuženo ptico ali ob čiščenju njene kletke (Smith in Campbell, 2010). Pri ljudeh *C. psittaci* pogosto povzroči atipično pljučnico. Inkubacijska doba je 5 do 14 dni, lahko tudi dlje. Značilni znaki so vročina, mrzlica, glavobol, slabost, mišični revmatizem in oteženo dihanje s suhim kašljem. Okužba lahko poteka tudi brez kliničnih znakov (Smith in Campbell, 2010).

Prenos *C. psittaci* s človeka na človeka je redek (Branley in sod., 2008; McGuigan in sod., 2012).

## **2.12 Okužbe z bakterijo *Chlamydia psittaci* pri drugih sesalcih**

Okužbe s *C. psittaci* so potrdili pri prašičih, konjih in psih (Rodolakis in Yousef Mohamad, 2010) ter pri govedu, pižmovkah in zajcih (Andersen in Vanrompay, 2000). Pri večini domačih živalih je klamidija povzročala obolenje dihal. Domnevajo, da so se živali okužile s *C. psittaci* neposredno ali posredno od predhodno okuženih ptic (Rodolakis in Yousef Mohamad, 2010).

## **2.13 Laboratorijska diagnostika okužb z bakterijami iz družine Chlamydiaceae**

Hitra in zanesljiva laboratorijska diagnostika klamidij je v veterinarski medicini pomembna za spremljanje zdravstvenega stanja živali in za preventivno ukrepanje pred prenosom okužb med živalmi in z živali na ljudi, kakor tudi za epizootiološko proučevanje (Borel in sod., 2008).

Laboratorijska diagnostika okužb s klamidijami pri pticah temelji predvsem na neposrednem dokazovanju *C. psittaci*. Okužbe s *C. psittaci* laboratorijsko potrdimo z izolacijo povzročitelja, dokazovanjem specifičnih protiteles, dokazovanjem bakterijskega antiga in dokazovanjem nukleinske kisline povzročitelja (Sachse in sod., 2009).

### 2.13.1 Odvzem vzorca in transport kužnine

Zelo pomemben dejavnik pri dokazovanju okužbe s klamidijami je pravilen odvzem in prenos kužnine v laboratorij. Občutljivost in specifičnost diagnostične metode je neposredno odvisna od ustreznosti vzorca (Marhold in sod., 2009).

Pri odvzemu kužnine je potrebno zajeti celice, v katerih se razmnožujejo klamidije. Za diagnostiko so primerni izločki in eksudati z vsebnostjo epitelnih celic (Keše in sod., 1999). Pri živih pticah dokazujemo *C. psittaci* v brisih žrela, kloake in očesne veznice. Vzorce praviloma odvzamemo pred začetkom izvajanja terapije z antibiotiki. Glede na to, da ptice izločajo klamidije v presledkih, se priporoča odvzem vsaj treh zaporednih vzorcev. Za dokaz specifičnih protiteles potrebujemo serum, ki ga pridobimo z odvzemom periferne venozne krvi (Billington, 2005). Pri poginulih pticah bakterijo najpogosteje dokazujemo v zračnih vrečkah, vranici, jetrih in v črevesju (Smith in Campbell, 2010).

Kužnino po odvzemu hranimo v transportnem gojišču, to je saharozni fosfatni pufer (2SP, angl. *0.2 M sucrose phosphate buffer*). V laboratorij jo prenesemo pri temperaturi 4 °C. Če vzorca ne moremo prenesti v laboratorij v 24 do 48 urah, ga zamrznemo pri temperaturi minus 70 °C (Pearson in sod., 1989).

### 2.13.2 Posredno dokazovanje okužbe z bakterijami iz rodu *Chlamydia*

Okužbe s *C. psittaci* lahko ugotovimo z dokazom specifičnih protiteles v serumu ptic. Pri seroloških testiranjih ima velik diagnostični pomen porast titra protiteles pri ponovnem pregledu iste živali po 14 do 21 dneh (Daft in sod., 1989). Do lažno negativnih rezultatov lahko pride pri pticah pred serokonverzijo in pri pticah, ki so bile v času odvzema vzorca zdravljene z antibiotiki (Andersen in Vanrompay, 2003). Dokazovanje protiteles proti *C. psittaci* pri pticah je primerno tudi za epidemiološke študije (Vanrompay in sod., 1995).

Za dokaz specifičnih protiteles pri pticah so sprva uporabljali naslednje diagnostične metode: reakcija vezave komplementa, aglutinacija, pasivna hemaglutinacija, lateks aglutinacija in precipitacija v agaroznem gelu (Dovč, 1993). Nadomestile so jih imunofluorescensa, mikroimunofluorescensa in ELISA (Dovč, 1998; Sachse in sod., 2009).

Metoda reakcije vezave komplementa je specifična samo za rod *Chlamydia* in ne razlikuje okužb med posameznimi vrstami klamidij (Bas in sod., 2001). Z lateks aglutinacijskim testom se ugotavlja protitelesa, ki so značilna za akutne okužbe. Zaradi številnih lažno negativnih rezultatov ni primeren pri diagnostiki agapornisov, nimf in skobčevk (Spenser, 1991). Klamidijsko vrstno specifična in hitro izvedljiva serološka metoda je posredna imunofluorescanca (IIF, angl. *indirect immunofluorescence*). Specifičnost te metode pri pticah je 89%, občutljivost pa 100%. Pri IIF metodi je za dokaz specifičnih protiteles potreben vrstno specifičen konjugat (Dovč, 1993; Sachse in sod., 2009).

### **2.13.3. Izolacija bakterije *Chlamydia psittaci***

Zaradi obveznega znotrajceličnega načina življenja klamidij uporabljamo za izolacijo *C. psittaci* iz kužnine kokošje zarodke, celične kulture in redkeje tudi laboratorijske živali (Moore in sod., 1988). Izolacija klamidij je dolgotrajna metoda z nizko občutljivostjo in predstavlja tudi nevarnost okužbe za laboratorijsko osebje. Kljub temu v diagnostiki klamidij še vedno velja za "zlati standard" (Longbottom in Coulter, 2003). Za raziskovanje interakcij *C. psittaci* z gostiteljsko celico in proučevanje razvojnega kroga klamidij se uporablja različne celične linije fibroblastov (McCoy, L-929, BHK-21) ali epitelijskih celic (HeLa 229 in BGM), (Draganov in sod., 2005).

V celicah se po inokulaciji klamidij razvijejo inkluzije z ET in RT. Te dokazujemo z različnimi barvili: Giemsa, Gimenez, akridin oranž ali Macchiavello (Vanrompay in sod., 1995). Za dokazovanje razvojnih oblik klamidij lahko uporabimo tudi s fluoresceinom označena specifična monoklonalna protitelesa (Andersen in Vanrompay, 2003). Z dokazom vključkov v celičnih kulturah potrdimo okužbo ptic s klamidijami. Negativen rezultat metode ne pomeni, da ptica ni nosilec bakterije *C. psittaci*, saj izločanje klamidij mnogokrat poteka v presledkih (Vanrompay in sod., 1995).

### **2.13.4 Dokaz antiga bakterije *Chlamydia psittaci***

Metode, s katerimi dokazujemo antigen *C. psittaci*, delujejo na principu nastanka in ugotavljanja imunskih kompleksov med antigenom in specifičnimi protitelesi, ki jih uporabljamo za izvedbo diagnostičnega postopka. Za ugotavljanje klamidijskega antiga se pogosto uporabljata metodi neposredna imunofluorescencija (DIF, angl. *direct immunofluorescence*) in encimski imunski test (Andersen in Vanrompay, 2003). Encimski imunski test je 100% občutljiva metoda, vendar so zaradi možnosti navzkrižnih reakcij z drugimi bakterijami rezultati mnogokrat lažno pozitivni. Metoda DIF je 98,9% specifična in 62,5% občutljiva (Woods in sod., 1989). Rezultate testov je potrebno ovrednotiti skupaj s klinično sliko preiskane ptice (Dovč, 1998). V primeru, da ptica nima kliničnih znakov in smo v kužnini dokazali klamidijski antigen, moramo okužbo s *C. psittaci* dokazati še z drugimi metodami. Kadar pri oboleni ptici v kužnini nismo dokazali antiga *C. psittaci*, je potrebno okužbo izključiti še s serološkimi ali molekularnimi metodami (Smith in Campbell, 2010).

### **2.13.5 Dokazovanje nukleinske kisline bakterij iz družine Chlamydiaceae**

Z molekularnimi metodami dokazujemo specifični odsek nukleinske kisline klamidij v kužnini. Za dokazovanje okužb s klamidijami pogosto uporabljamo različne metode verižne reakcije pomnoževanja s polimerazo (PCR, angl. *polymerase chain reaction*): vgnezditvena (angl. *nested*) PCR, hkratna (angl. *multiplex*) PCR in PCR v realnem času. Za tipizacijo klamidij uporabljamo metode polimorfizma dolžin restriktijskih fragmentov (RFLP, angl. *restriction fragment length polymorphism*), PCR, DNA mikročipov ter v novejšem času tudi hkratno analizo večjega števila lokusov z variabilnim številom tandemskih ponovitev (MLVA, angl. *multiple loci VNTR analysis*), (Geens in sod., 2005b; Laroucau in sod., 2008; Sachse in sod., 2008).

Tarčni geni se nahajajo na operonu 16S rRNA in 23S rRNA (Everett in sod., 1999; Ehricht in sod., 2006). Vrstno in genotipsko specifične odseke DNA dokazujemo na genih *ompA*, *incA* (Ménard in sod., 2006; Sachse in sod., 2009) ali *pmp* (Laroucau in sod., 2007).

### **2.13.5.1 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)**

Z metodo PCR pomnožujemo specifični odsek nukleinske kisline, s čimer lahko v kratkem času sintetiziramo veliko število kopij želenega odseka DNA. Zaradi tega za diagnostiko klamidijskih okužb zadostuje že zelo majhna količina vzorca, kar je bistvena prednost PCR pred klasičnimi diagnostičnimi metodami (Arko, 2004). Z metodo PCR lahko dokažemo že 60-600 femto gramov (femto  $10^{-15}$ ) klamidijske DNA, kar je ekvivalentno 6-60 bakterij na vzorec (Hewinson in sod., 1997). Z metodo PCR lahko dokažemo tudi neviabilni organizem (Tong in sod., 1999).

Slabost metode PCR je možnost lažno pozitivnih rezultatov zaradi kontaminacije matrične DNA (McElnea in Cross, 1999). Lažno negativni rezultati so največkrat posledica temperaturno obstojnih inhibitorjev (lipidi, polisaharidi) v vzorcu. Zaradi tega moramo pri izvedbi PCR uporabljati pozitivno, negativno in interno kontrolo (Betsou in sod., 2003).

### **2.13.5.2 PCR v realnem času**

PCR v realnem času predstavlja nadgradnjo klasične metode PCR in omogoča merjenje količine produkta PCR v vsakem ciklu med samo reakcijo (Arko, 2004). Prednost te metode je, da pomnoževanje in detekcija produktov PCR poteka hkrati in v zaprtem sistemu, kar zmanjša možnost kontaminacije s PCR produkti (Geens in sod., 2005b). Dokazovanje produktov temelji na merjenju fluorescence. Najpomembnejša prednost PCR v realnem času pred klasičnim PCR je lažja kvantifikacija nukleinskih kislin (Arko, 2004).

PCR v realnem času je metoda, ki jo uporabljajo mnogi laboratoriji predvsem zaradi pridobitve hitrega rezultata, možnosti standardizacije, visoke specifičnosti in občutljivosti (Pantchev in sod., 2009). Metoda je zaradi visoke specifičnosti primerna za diagnostiko posameznih vrst klamidij. Primerna je tako za klinično diagnostiko kakor tudi za epidemiološke študije aviarne klamidioze (Geens in sod., 2005b).

### 2.13.5.3 Genotipizacija bakterije *Chlamydia psittaci*

Bakterijo *C. psittaci* zaradi morfoloških in biokemijskih lastnosti klamidij težko tipiziramo s klasičnimi metodami. Šele razvoj molekularnih metod je olajšal in izboljšal identifikacijo klamidij ter prispeval k odkritju novih podtipov *C. psittaci* (Geens in sod., 2005a).

V zadnjem desetletju se za genotipizacijo *C. psittaci* najpogosteje uporablja metoda ugotavljanja polimorfizmov med fragmenti, pridobljenimi z restriktionskimi encimi, ki omogoča tipizacijo vseh 9 genotipov (A-F, WC in M56), (Geens in sod., 2005a; Rodolakis in Yousef Mohamad, 2010). Metoda je za izvedbo dolgotrajna in zahtevna. Kasneje so razvili metodo DNA mikromrež (angl. *microarray*), ki je primerna za rutinsko določanje genotipov bakterije *C. psittaci*. Zaradi visoke specifičnosti in občutljivosti so z metodo DNA mikromrež ugotovili raznolikost genotipov A, E/B in D *C. psittaci* (Sachse in sod., 2008). Ker je za posamezne genotipe *C. psittaci* značilna visoka stopnja polimorfizma na tandemskih ponavljajočih se zaporedjih, lahko genotipe dokazujemo tudi z metodo MLVA. Metoda je za dokaz različnih genotipov *C. psittaci* enostavna in hitra (Laroucau in sod., 2008).

Z genotipskimi metodami lahko dokazujemo tudi epidemiološke povezave, ki jih s fenotipskimi metodami nismo mogli odkriti. Pri ugotavljanju pestrosti posameznih izolatov klamidij na določenem geografskem območju in ugotavljanju virov ter načina prenosa okužbe so nam v pomoč metode za genotipizacijo (Zocevic in sod., 2012).

Genetske razlike med posameznimi izolati klamidij lahko, z analizo zaporedij nukleotidov na specifičnih odsekih genoma bakterije, nazorno prikažemo s filogenetskim drevesom (Zocevic in sod., 2012).

### **3 MATERIAL IN METODE**

#### **3.1 ODVZEM VZORCEV**

##### **3.1.1 Odvzem vzorcev prostoživečim pticam**

###### **3.1.1.1 Vzorci prostoživečih ptic, ujetih v najlonske mreže**

Ptice pevke in ptice drugih manjših vrst smo lovili na območju ornitološke postaje Prirodoslovnega muzeja Slovenije na Ljubljanskem barju v okolici Vrhnik. Za odlov smo uporabili najlonske mreže velikosti  $3,3 \times 12$  metrov (slika 5). Ptice smo privabili z uporabo zvočnih posnetkov njihovega oglašanja in petja. Lovili smo jih v sklopu rednega vsakoletnega obročanja ptic v obdobju jesenske selitve v letih 2008 in 2009 ter v obdobju pomladanske selitve leta 2010. Za našo raziskavo smo ulovili 198 ptic iz redov vpijatov (Coraciiformes), plezalcev (Piciformes) in pevcev (Passeriformes), tabela 4.

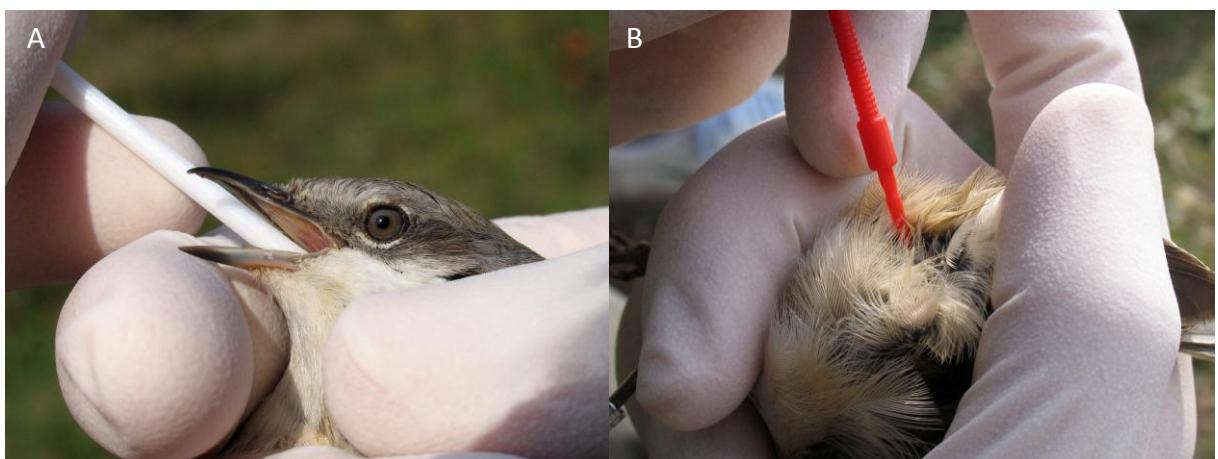
Ptice smo med postopkom popisovanja in obročanja klinično pregledali in jim odvzeli brise žrela in brise kloake. Uporabljali smo dakronske brise (Meus in Copan®, Italija). Izbor velikosti brisa je bil odvisen od velikosti posamezne ptice. S tem smo pri pticah preprečili poškodbe mehkih tkiv, ki bi lahko nastale pri odvzemu vzorca s prevelikim brisom (slika 6). Ptice smo po vzorčenju izpustili.

Brise žrela in kloake smo takoj po odvzemu vstavili v 2 ml vijalke (TTP, Švica) z 1 ml transportnega gojišča 2SP (0,2 M glukoza, 0,02 M fosfatni pufer, pH 7 in 10% telečji serum) za klamidije. Vzorce smo do prenosa v laboratorij hranili v hladilni torbi pri 4 °C. Brise smo v laboratoriju Inštituta za zdravstveno varstvo perutnine na Veterinarski fakulteti v Ljubljani do nadaljnjih preiskav hranili pri temperaturi minus 20 °C.



**Slika 5:** Odlov prostoživečih ptic v najlonske mreže. Foto: Tomi Trilar.

**Figure 5:** Capture of wild birds in nylon nets. Photo: Tomi Trilar.



**Slika 6:** Odvzem brisa žrela (A) in brisa kloake (B) prostoživeči ptici. Foto: Tomi Trilar.

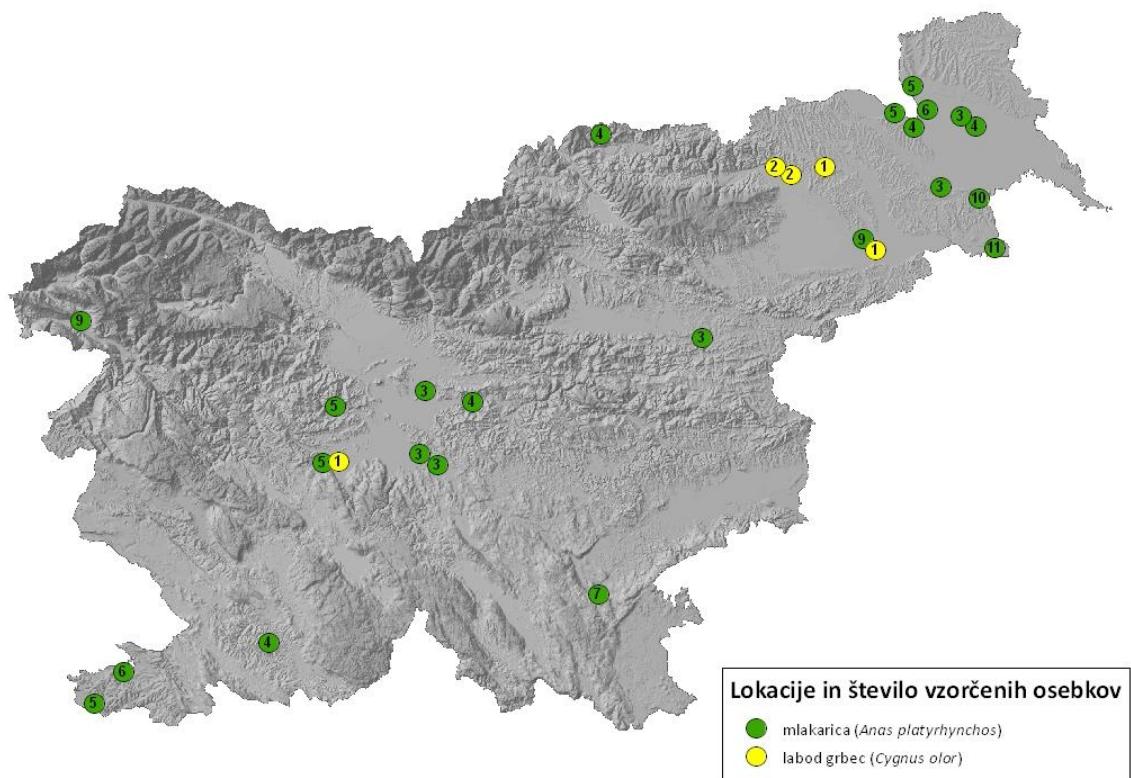
**Figure 6:** Taking the pharyngeal swab (A) and cloacal swab (B) of a wild bird. Photo: Tomi Trilar.

### **3.1.1.2 Vzorci prostoživečih ptic, ki so bili vključeni v program aktivnega nadzora virusa aviarne influence (AI) v Sloveniji**

Vzorce mlakaric (*Anas platyrhynchos*) so odvzeli lovci na območju Slovenije v okviru programa aktivnega nadzora AI, ki ga z letno odredbo predpisuje Veterinarska uprava RS. Lovci so v času lovne dobe (od 1. septembra do 15. januarja) v letih 2009, 2010, 2011 in 2012 odstreljenim mlakaricam odvzeli suhe brise žrela in brise kloake. Brise so poslali v Laboratorij za diagnostiko kužnih bolezni Inštituta za zdravstveno varstvo perutnine na Veterinarski fakulteti v Ljubljani, s spremnim dokumentom, na katerem so navedeni kraj in datum odvzema vzorca. V našo raziskavo smo vključili brise žrela in brise kloake 121 ustreljenih mlakaric (tabela 4) s 23 različnih območij Slovenije (slika 7).

Labode grbce (*Cygnus olor*) smo lovili poleti leta 2009 in spomladji leta 2010 na petih različnih območjih Slovenije (slika 7) v okviru programa aktivnega nadzora AI, ki ga je predpisala Veterinarska uprava RS. Za privabljanje ptic smo uporabili kruh. Labode smo s prijemom za kljun in vrat potegnili k sebi in jih fiksirali v naročju. Sedmim labodom grbcem smo odvzeli bris žrela in bris kloake (tabela 4). Po vzorčenju, določitvi spola in starosti ter namestitvi identifikacijskega obročka smo labode izpustili.

Vzorci mlakaric in labodov grbcev so bili po odvzemu hranjeni v originalni embalaži brisov, ki ni vsebovala transportnega gojišča 2SP. Do prevzema vzorcev v laboratoriju so bili le-ti hranjeni v hladilniku ali hladilni torbi pri 4 °C. Odvzete brise smo v laboratoriju namočili v 2 ml fosfatnega pufra (PBS, angl. *phosphate buffer saline*) in jih stresali na vibracijskem stresalniku minimalno 2 minuti. Po končanem mešanju smo vsebino prelili v 2 ml vijalke (TPP, Švica). Vzorce smo do nadalnjih preiskav hranili pri temperaturi minus 70 °C.



**Slika 7:** Lokacije in število vzorčenih mlakaric (*Anas platyrhynchos*) in labodov grbcev (*Cygnus olor*) na območju Slovenije.

**Figure 7:** Locations and numbers of sampled mallards (*Anas platyrhynchos*) and mute swans (*Cygnus olor*) in Slovenia.

### 3.1.1.3 Vzorci prostoživečih ptic, oskrbljenih v Ambulanti za ptice, male sesalce in plazilce

Prostoživečim pticam, ki so potrebovale nujno veterinarsko oskrbo, smo v letih 2010 in 2011 v Ambulanti za ptice, male sesalce in plazilce po kliničnem pregledu in oskrbi odvzeli brise žrela in brise kloake. V našo preiskavo smo vključili 11 domačih golobov (*Columba livia domestica*), 7 sivih vran (*Corvus cornix*), poljsko vrano (*Corvus frugilegus*), krokarja (*Corvus corax*), srako (*Pica pica*), postovko (*Falco tinnunculus*) in dve kanji (*Buteo buteo*), tabela 4.

Brise žrela in kloake smo takoj po odvzemuh vstavili v vijalke s transportnim gojiščem 2SP in jih do nadaljnjih preiskav hraniли pri temperaturi minus 20 °C.

**Tabela 4:** Sistematska razvrstitev prostoživečih ptic in število vzorčenih ptic, vključenih v našo raziskavo.**Table 4:** Systematic classification of wild birds and the number of birds sampled included in our study.

Red		Vrsta		Število vzorčenih ptic	
Slovensko ime	Latinsko ime	Slovensko ime	Latinsko ime		
plojkokljuni	Anseriformes	labod grbec	<i>Cygnus olor</i>	7	
		mlakarica	<i>Anas platyrhynchos</i>	121	
golobi	Columbiformes	domači golob	<i>Columba livia domestica</i>	11	
ujede	Falconiformes	kanja	<i>Buteo buteo</i>	2	
		postovka	<i>Falco tinnunculus</i>	1	
vpijati	Coraciiformes	vodorec	<i>Alcedo atthis</i>	1	
plezalci	Piciformes	vijeglavka	<i>Jynx torquilla</i>	5	
pevci	Passeriformes	siva pevka	<i>Prunella modularis</i>	1	
		taščica	<i>Erithacus rubecula</i>	10	
		kos	<i>Turdus merula</i>	4	
		cikovt	<i>Turdus philomelos</i>	2	
		bičja trstnica	<i>Acrocephalus schoenobaenus</i>	7	
		močvirška trstnica	<i>Acrocephalus palustris</i>	4	
		srpična trstnica	<i>Acrocephalus scirpaceus</i>	16	
		rumeni vrtnik	<i>Hippolais icterina</i>	8	
		črnoglavka	<i>Sylvia atricapilla</i>	72	
		vrtna penica	<i>Sylvia borin</i>	39	
		rjava penica	<i>Sylvia communis</i>	2	
		grmovščica	<i>Phylloscopus sibilatrix</i>	1	
		vrbjki kovaček	<i>Phylloscopus collybita</i>	5	
		severni kovaček	<i>Phylloscopus trochilus</i>	1	
		črnogлавi muhar	<i>Ficedula hypoleuca</i>	3	
		plavček	<i>Cyanistes caeruleus</i>	8	
		močvirška sinica	<i>Poecile palustris</i>	2	
		rjavi srakoper	<i>Lanius collurio</i>	2	
		sraka	<i>Pica pica</i>	1	
		poljska vrana	<i>Corvus frugilegus</i>	1	
		siva vrana	<i>Corvus cornix</i>	7	
		krokar	<i>Corvus corax</i>	1	
		poljski vrabec	<i>Passer montanus</i>	4	
		zelenec	<i>Carduelis chloris</i>	1	
<b>Σ redov</b>		<b>Σ vrst</b>		<b>Σ ptic</b>	
<b>6</b>		<b>31</b>		<b>350</b>	

### 3.1.2 Odvzem vzorcev pticam v ujetništvu

#### 3.1.2.1 Vzorci sobnih ptic, pregledanih v Ambulanti za ptice, male sesalce in plazilce

Vzorce sobnih ptic smo pridobili v Ambulanti za ptice, male sesalce in plazilce v letih 2010 in 2011. Sobnim pticam smo odvzeli brise žrela in brise kloake med kliničnim pregledom oziroma pri podrobnejšem pregledu ob splošni plinski anesteziji z izofluranom. Posameznim pticam smo ob splošni anesteziji z izofluranom s punkcijo desne vratne vene (lat. *vena jugularis*) odvzeli 0,1 ml krvi (slika 8). Za odvzem krvi smo uporabili inzulinsko brizgo z vgrajeno iglo. V našo raziskavo smo vključili 125 sobnih ptic iz redov papig (Psittaciformes), pevcev (Passeriformes) in kur (Galliformes), tabela 5.

Brise žrela in kloake smo takoj po odvzemu vstavili v vijalke s transportnim gojiščem 2SP in jih do prenosa v laboratorij hrаниli v hladilniku pri 4 °C, medtem ko smo kri takoj po odvzemu prelili v serumske epruvete z gelom (Becton Dickinson Vacutainer®, Nemčija) in jih pustili na sobni temperaturi tri ure. V laboratoriju smo kri centrifugirali 10 minut pri 2000 obratih, da se je ločil serum. Le-tega smo odlili v plastične epruvete (Eppendorf®, Nemčija) z volumnom 0,5 ml. Serume in brise smo do nadaljnjih preiskav hrаниli pri temperaturi minus 20 °C.



**Slika 8:** Odvzem krvi iz vratne vene (A), bris žrela (B) in bris kloake (C) sobni ptici ob izofluranski anesteziji.  
Foto: Marko Zadravec.

**Figure 8:** Collection of jugular vein blood (A), pharyngeal swab (B) and cloacal swab (C) in cage bird under the isoflurane anesthesia. Photo: Marko Zadravec.

**Tabela 5:** Sistematska razvrstitev sobnih ptic in število vzorčenih ptic, vključenih v našo raziskavo.**Table 5:** Systematic classification of cage birds and number of birds sampled included in our study.

Red		Vrsta		Število vzorčenih ptic	
Slovensko ime	Latinsko ime	Slovensko ime	Latinsko ime	Bris žrela in bris kloake	Odvzem krvi
papige	Psittaciformes	skobčevka	<i>Melopsittacus undulatus</i>	44	3
		nimfa	<i>Nymphicus hollandicus</i>	17	1
		kakadu	<i>Cacatua sp.</i>	4	2
		kozica	<i>Cyanoramphus novaezelandiae</i>	1	0
		kraljeva papiga	<i>Alisterus scapularis</i>	1	0
		baraband	<i>Polytelis swainsonii</i>	2	0
		plemenita papiga	<i>Eclectus roratus</i>	1	0
		veliki aleksander	<i>Psittacula eupatria</i>	2	0
		mali aleksander	<i>Psittacula krameri</i>	6	0
		agapornis	<i>Agapornis sp.</i>	12	1
		senegalska papiga	<i>Poicephalus senegalus</i>	1	0
		siva papiga	<i>Psittacus erithacus</i>	9	2
		amazonka	<i>Amazona sp.</i>	7	2
		pionites	<i>Pionites sp.</i>	1	1
		aratinga	<i>Aratinga sp.</i>	3	0
		patagonska papiga	<i>Cyanoliseus patagonus</i>	1	1
pevci	Passeriformes	kanarček	<i>Serinus canaria domestica</i>	6	0
		zebrica	<i>Poephila guttata castanotis</i>	3	0
		riževec	<i>Padda oryzivora</i>	1	0
		indijski kos	<i>Gracula religiosa</i>	2	0
kure	Galliformes	japonska prepelica	<i>Coturnix japonica</i>	1	0
<b>Σ redov</b>			<b>Σ vrst</b>	<b>Σ ptic</b>	<b>Σ ptic</b>
<b>3</b>			<b>21</b>	<b>125</b>	<b>13</b>

### 3.1.2.2 Vzorci ptic iz živalskega vrta in živalskim vrtovom podobnih prostorov

Pticam v živalskem vrtu in v živalskim vrtovom podobnih prostorov (zoo parki) smo vzorce odvzeli v spremstvu veterinarjev in skrbnikov živali v letih 2010 in 2011. Vsem vzorčenim pticam ( $n = 108$ ) smo odvzeli brise žrela in brise kloake, ki smo jih vstavili v vijalke s transportnim gojiščem 2SP in jih do prenosa v laboratorij hranili v hladilni torbi pri  $4^{\circ}\text{C}$ .

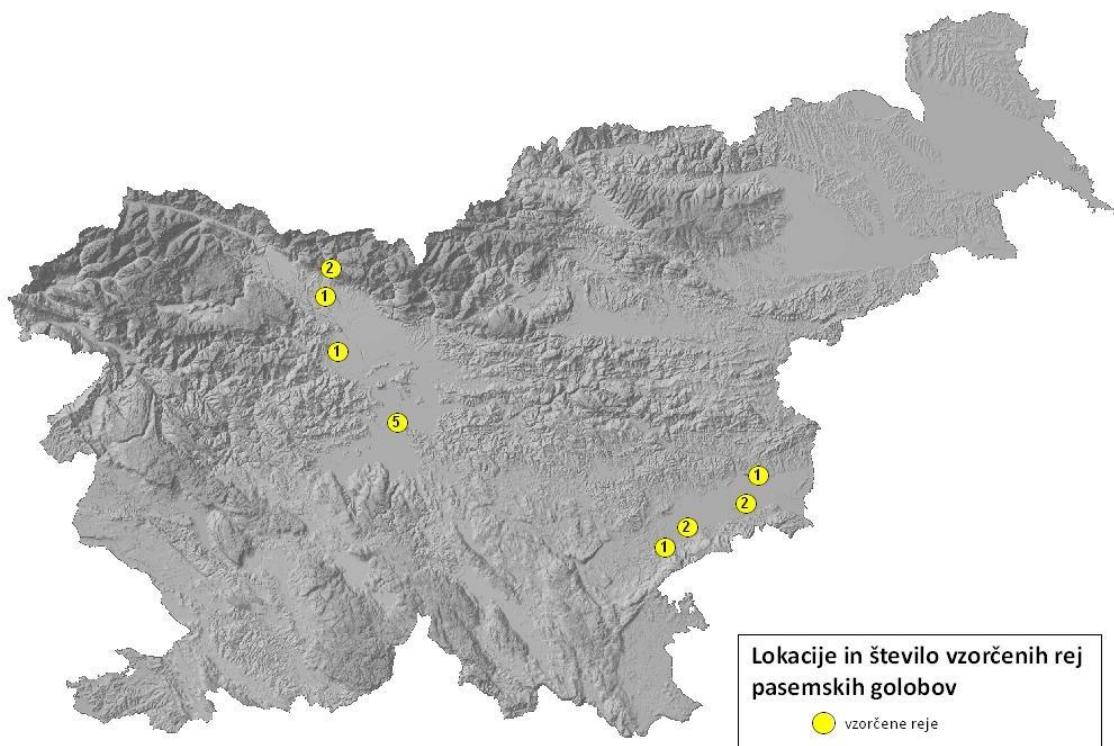
Posameznim pticam ( $n = 70$ ) smo odvzeli tudi kri (tabela 6). Papigam smo odvzeli 0,1 ml krvi s punkcijo vratne vene (lat. *vena jugularis*). Kokošim in pegatkam smo 1,0 ml krvi odvzeli s punkcijo krilne vene (lat. *vena cutanea ulnaris*). Gosem in rožnatim pelikanom smo odvzeli 1,0 ml krvi s punkcijo vene na nogi (lat. *vena metatarsalis media*). Pri odvzemenu krvi iz vratne vene smo uporabili inzulinsko brizgo z vgrajeno iglo. Za odvzem krvi iz krilne vene in vene na nogi smo uporabili 2,5 ml brizgo (Plastipak<sup>®</sup>) in iglo (Luer<sup>®</sup>) z notranjim premerom 0,6 mm, dolžine 25 mm. Kri smo takoj po odvzemenu prelili v serumske epruvete z gelom in jih do prenosa v laboratorij hranili v hladilni torbi pri 4 °C. V laboratoriju smo kri centrifugirali 10 minut pri 2000 obratih. Serume smo odlili v plastične epruvete z volumnom 0,5 ml in jih do nadaljnjih preiskav hranili v hladilniku pri 4 °C.

**Tabela 6:** Sistematska razvrstitev ptic v zoo parkih ter število vzorčenih ptic, vključenih v našo raziskavo.**Table 6:** Systematic classification of birds at zoo parks and number of birds sampled included in our study.

Red		Vrsta		Število vzorčenih ptic		
Slovensko ime	Latinsko ime	Slovensko ime	Latinsko ime	Bris žrela in bris kloake	Odvzem krvi	
papige	Psittaciformes	nimfa	<i>Nymphicus hollandicus</i>	8	6	
		kakadu	<i>Cacatua</i> sp.	3	3	
		veliki aleksander	<i>Psittacula eupatria</i>	1	1	
		ara	<i>Ara</i> sp.	3	3	
golobi	Columbiformes	domači golob	<i>Columba livia domestica</i>	4	0	
veslonožci	Pelecaniformes	rožnati pelikan	<i>Pelecanus onocrotalus</i>	9	9	
kure	Galliformes	kokoš	<i>Gallus gallus domesticus</i>	41	31	
		puran	<i>Meleagris gallopavo</i>	1	0	
		pav	<i>Pavo cristatus</i>	4	0	
		pegatka	<i>Numida meleagris</i>	12	9	
		japonska prepelica	<i>Coturnix japonica</i>	5	0	
		srebrni fazan	<i>Lophura nycthemera nutchemera</i>	1	0	
plojkokljuni	Anseriformes	domača raca	<i>Anas</i> sp.	4	0	
		moškatna bleščavka	<i>Cairina moschata</i>	2	0	
		gos	<i>Anser anser domesticus</i>	10	8	
<b>Σ redov</b>		<b>Σ vrst</b>		<b>Σ ptic</b>	<b>Σ ptic</b>	
<b>5</b>		<b>15</b>		<b>108</b>	<b>70</b>	

### 3.1.2.3 Vzorci pasemskih golobov

Brise žrela in brise kloake smo odvzeli različnim pasemskim golobom na različnih območjih Slovenije v letu 2012. V preiskavo smo vključili 15 gojiteljev pasemskih golobov pismonoš (slika 9). Pri posameznem gojitelju smo vzorčili po 10 golobov. Brise žrela in kloake smo takoj po odvzemu vstavili v vijalke s transportnim gojiščem 2SP. Vzorce smo do prenosa v laboratorij hranili v hladilni torbi pri 4 °C, medtem ko smo jih v laboratoriju do nadalnjih preiskav hranili pri temperaturi minus 20 °C.



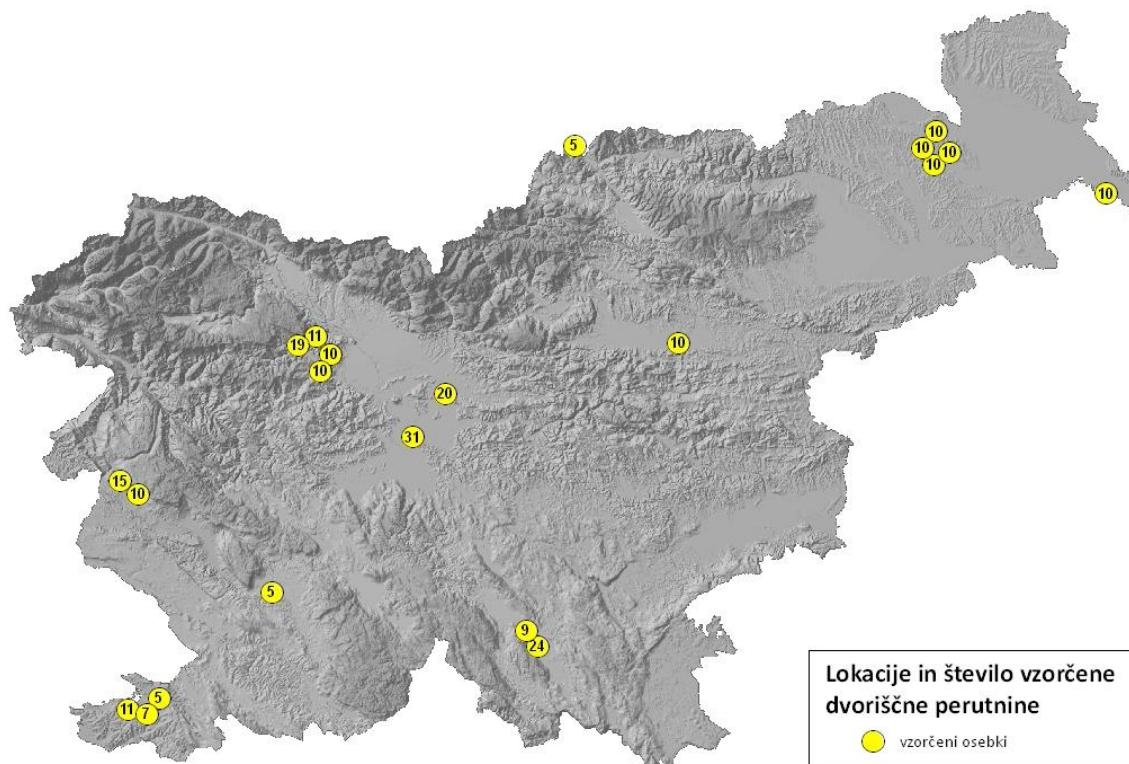
Slika 9: Lokacije in število vzorčenih rej pasemskih golobov na območju Slovenije.

Figure 9: Locations and numbers of sampled flocks of breed pigeons in Slovenia.

### **3.1.2.4 Vzorci dvoriščne perutnine**

Dvoriščni perutnini različnih vrst smo vzorce odvzeli na različnih območjih Slovenije v letih 2009, 2010 in 2011. Na posameznem dvorišču smo odvzeli brise žrela in brise kloake povprečno 10 pticam (slika 10). Perutnini, ki je bila v dobri telesni kondiciji, smo odvzeli tudi 1,0 ml krvi (slika 11). Kokošim smo kri odvzeli s punkcijo krilne vene (lat. *vena cutanea ulnaris*), racam pa s punkcijo vene na nogi (lat. *vena metatarsalis media*). Za odvzem krvi smo uporabili 2,5 ml brizgo in iglo z notranjim premerom 0,6 mm, dolžine 25 mm.

Za našo raziskavo smo odvzeli brise žrela in brise kloake 252 pticam ter kri 50 pticam (tabela 7). Brise žrela in kloake smo takoj po odvzemuh vstavili v vijalke s transportnim gojiščem 2SP, medtem ko smo kri takoj po odvzemuh prelili v serumske epruvete z gelom. Vzorce smo do prenosa v laboratorij hrаниli v hladilni torbi pri 4 °C. V laboratoriju smo kri centrifugirali 10 minut pri 2000 obratih. Serume smo odlili v plastične epruvete z volumnom 0,5 ml. Serume in brise smo do nadalnjih preiskav hrаниli pri temperaturi minus 20 °C.



**Slika 10:** Lokacije in število vzorčene dvoriščne perutnine na območju Slovenije.

**Figure 10:** Locations and numbers of sampled backyard poultry in Slovenia.



**Slika 11:** Odvzem brisa žrela (A), brisa kloake (B) in krvi iz krilne vene (C) pri kokoši. Foto: Tomi Trilar.

**Figure 11:** Collection of pharyngeal swab (A), cloacal swab (B) and blood from the wing vein (C) of a hen.

Photo: Tomi Trilar.

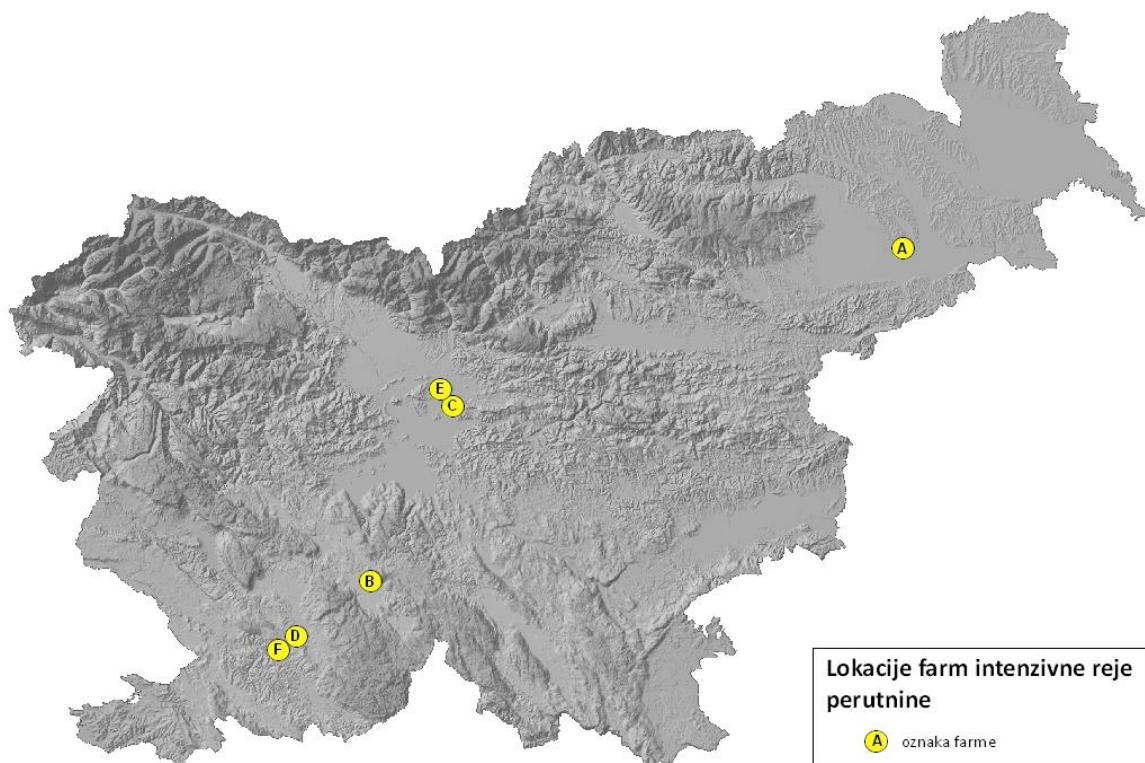
**Tabela 7:** Sistematska razvrstitev dvoriščne perutnine in število vzorčenih ptic, vključenih v našo raziskavo.**Table 7:** Systematic classification of backyard poultry and number of birds sampled included in our study.

Red		Vrsta		Število ptic		
Slovensko ime	Latinsko ime	Slovensko ime	Latinsko ime	Bris žrela in bris kloake	Odvzem krvi	
kure	Galliformes	kokoš	<i>Gallus gallus domesticus</i>	148	40	
		puran	<i>Meleagris gallopavo</i>	15	0	
		pavji puran	<i>Meleagris ocellata</i>	5	0	
		pegatka	<i>Numida meleagris</i>	9	0	
		pav	<i>Pavo cristatus</i>	6	0	
		fazan	<i>Phasianus colchicus</i>	3	0	
		japonska prepelica	<i>Coturnix japonica</i>	10	0	
		kitajska prepelica	<i>Coturnix chinensis</i>	1	0	
plojkokljuni	Anseriformes	domača raca	<i>Anas</i> sp.	31	6	
		čilska žvižgavka	<i>Anas sibilatrix</i>	2	0	
		dolgorepa raca	<i>Anas acuta</i>	2	0	
		mandarinika	<i>Aix galericulata</i>	3	0	
		karolinka nevestica	<i>Aix sponsa</i>	2	0	
		čopasta črnica	<i>Aythya fuligula</i>	2	0	
		marmornata raca	<i>Marmoronetta angustirostris</i>	2	0	
		moškatna bleščavka	<i>Cairina moschata</i>	4	4	
		gos	<i>Anser anser domesticus</i>	7	0	
<b>Σ redov</b>		<b>Σ vrst</b>		<b>Σ ptic</b>	<b>Σ ptic</b>	
<b>2</b>		<b>17</b>		<b>252</b>	<b>50</b>	

### 3.1.2.5 Vzorci perutnine iz intenzivne reje

Vzorce krvi kokoši matičnih jat in piščancev brojlerjev smo pridobili v sklopu letnega kontrolnega programa za ugotavljanje specifičnih protiteles proti *C. psittaci* s 6 farm v letih 2010 in 2011 (slika 12). Pристojni veterinarji so pticam odvzeli 1,0 ml krvi s punkcijo krilne vene (lat. *vena cutanea ulnaris*) in jo poslali na Inštitut za zdravstveno varstvo perutnine skupaj s spremnim dokumentom, na katerem so bili navedeni kraj in datum odvzema vzorca ter starost in kategorija vzorčene perutnine.

Kri smo v laboratoriju centrifugirali 10 minut pri 2000 obratih, da se je ločil serum. Le-tega smo odlili v plastične epruvete prostornine 1,5 ml in ga hranili v hladilniku pri 4 °C do nadalnjih preiskav. Kadar smo v perutninski jati dokazali specifična protitelesa proti *C. psittaci*, smo v isti jati naknadno odvzeli še brise žrela in brise kloake (tabela 8). Brise smo takoj po odvzemu vstavili v transportno gojišče 2SP in jih do prenosa v laboratorij hranili pri 4 °C. V laboratoriju smo brise do nadalnjih preiskav hranili pri temperaturi minus 20 °C.



Slika 12: Lokacije vzorčenih farm intenzivne reje perutnine na območju Slovenije.

Figure 12: Locations of the sampled farms for intensive poultry productions in Slovenia.

**Tabela 8:** Vzorci farm intenzivne reje perutnine, vključenih v našo raziskavo.**Table 8:** Samples of intensive poultry production farms included in our study.

Intenzivna reja perutnine				Število vzorčenih ptic	
Oznaka farme	Kategorija	Starost	Št. pregledanih hlevov	Odvzem krvi	Bris žrela in bris kloake
A	matična jata	22-23 tednov	137	2252	50
	piščanci brojlerji	24-26 dni	2	40	0
B	matična jata	23 tednov	2	40	0
	piščanci brojlerji	19 dni	1	19	0
C	matična jata	22-23 tednov	10	197	0
D	matična jata	22 tednov	16	240	0
E	matična jata	18-24 tednov	6	118	0
F	matična jata	22 tednov	8	80	0
<b>Σ vzorčenih farm</b>			<b>Σ hlevov</b>	<b>Σ ptic</b>	<b>Σ ptic</b>
<b>6</b>			<b>182</b>	<b>2986</b>	<b>50</b>

### 3.1.3 Vzorci ptic, pozitivni na bakterijo *Chlamydia psittaci* ob predhodnih raziskavah v Sloveniji

V naši raziskavi smo testirali različne vrste vzorcev 33 ptic (tabela 9), ki so pozitivno reagirali na *C. psittaci* ob predhodnih raziskavah v Sloveniji. Izhodno kužnino smo, od leta 1993 do leta 2011, hranili pri temperaturi minus 80 °C.

**Tabela 9:** Seznam ptic, ki so bile pozitivne na bakterijo *Chlamydia psittaci* v predhodnih raziskavah.

**Table 9:** List of birds positive for *Chlamydia psittaci* in the previous studies.

Red		Vrsta		Število ptic
Slovensko ime	Latinsko ime	Slovensko ime	Latinsko ime	
papige	Psittaciformes	skobčevka	<i>Melopsittacus undulatus</i>	6
		nimfa	<i>Nymphicus hollandicus</i>	12
		rozela	<i>Platycercus eximius</i>	1
		baraband	<i>Polytelis swainsonii</i>	1
		veliki aleksander	<i>Psittacula eupatria</i>	1
		agapornis	<i>Agapornis</i> sp.	4
		amazonka	<i>Amazona</i> sp.	2
močvirniki	Ciconiiformes	siva čaplja	<i>Ardea cinerea</i>	1
kure	Galiformes	fazan	<i>Phasianus colchicus</i>	1
golobi	Columbiformes	domači golob	<i>Columba livia domestica</i>	4
<b>Σ redov</b>		<b>Σ vrst</b>		<b>Σ ptic</b>
<b>4</b>		<b>10</b>		<b>33</b>

### **3.2 LABORATORIJSKA DIAGNOSTIKA**

#### **3.2.1 Molekularne metode**

Molekularne metode smo izvedli na Inštitutu za zdravstveno varstvo perutnine Veterinarske fakultete v Ljubljani in v laboratoriju ANSES (angl. *French agency for food, environmental and occupational health & safety*) Maisons-Alfort v Franciji. Z molekularnimi metodami smo preiskali brise žrela in brise kloake 1068 ptic.

##### **3.2.1.1 Izolacija celokupne DNA**

Pred postopkom izolacije celokupne DNA smo zamrznjene vzorce v transportnem gojišču odtajali v brezprašni komori (Telstar, Nemčija) in jih stresali z vibracijskim stresalnikom 2 minuti. Suhim brisom smo dodali 2 ml PBS in jih stresali s stresalnikom. Zaradi velikega števila vzorcev pasemskih golobov in perutnine intenzivne reje smo brise združevali. Združili smo največ po pet brisov ptic iz istega objekta. Brise žrela smo združevali ločeno od brisov kloak. To smo naredili tako, da smo v skupno vijalko odpipetirali 200 µL od vsakega izbranega vzorca. Skupni vzorec smo stresali z vibracijskim stresalnikom 2 minuti. Vse ostale vzorce smo uporabili v preiskavi kot posamezne vzorce.

Celokupno DNA smo iz brisov žrela in brisov kloake izolirali s kompletom reagentov QIAamp® DNA Mini kit (Qiagen, Hilden, EU) po navodilu proizvajalca. Za izolacijo smo uporabili 200 µL kužnine. Ob koncu postopka smo izolirano DNA raztopili in sprali s 100 µL dilucijskega pufra in jo do nadalnjih preiskav shranili pri temperaturi minus 20 °C.

##### **3.2.1.2 PCR v realnem času**

Pri pticah smo okužbo z bakterijami iz družine Chlamydiaceae dokazovali z metodo PCR v realnem času, v DNA, izolirani iz brisov žrela in brisov kloake. Z izbrano metodo smo dokazovali odsek gena 23S rRNA, značilen za bakterije iz družine Chlamydiaceae, odsek genov *ompA* in *incA*, značilne za vrsto *C. psittaci*, ter odsek gena 16S rRNA, značilen za atipično kokošjo klamidijo iz družine Chlamydiaceae.

### **3.2.1.2.1 Dokazovanje odseka gena 23S rRNA, značilnega za bakterije iz družine Chlamydiaceae**

Za pomnoževanje odseka gena 23S rRNA, specifičnega za bakterije iz družine Chlamydiaceae, z metodo PCR v realnem času, smo uporabili smiselni začetni oligonukleotid Ch23S-F in protismiselni začetni oligonukleotid Ch23S-R ter sondu Ch23S-p, kot je opisal Ehricht s sodelavci, tabela 10 (Ehricht in sod., 2006).

Za dokaz bakterijske DNA smo uporabili detekcijski sistem, ki temelji na sondi TaqMan®. Sonda Ch23S-p je na 5' koncu označena s fluorescentnim barvilkom FAM (6-karboksi-fluorescin), na 3' koncu pa ima dušilno barvilo TAMRA (6-karboksi-tetrametil-rodamin).

**Tabela 10:** Začetni oligonukleotidi in sonda, njihova nukleotidna zaporedja in velikost produktov, dobljenih z metodo PCR v realnem času.

**Table 10:** Oligonucleotide primers and probe, their nucleotide sequences and amplification size obtained by PCR in real time.

Oznaka	Zaporedje nukleotidov	Dolžina produkta
Ch23S-F	5'-CTG AAA CCA GTA GCT TAT AAG CGG T-3'	110 bp
Ch23S-R	5'-ACC TCG CCG TTT AAC TTA ACT CC-3'	
Ch23S-p	5'-CTC ATC ATG CAA AAG GCA CGC CG-3'	

Za pomnoževanje specifičnega odseka gena smo uporabili reakcijsko mešanico QuantiFast probe PCR s pasivnim referenčnim barvilkom ROX (Qiagen®, Nemčija). Volumen reakcijske mešanice je bil 15 µL in je vseboval:

- 2 µL izolirane DNA,
- 7,5 µL 2x reakcijskega pufra,
- 0,6 µL (0,4 µM) posameznega začetnega oligonukleotida,
- 0,3 µL sonde in
- 4 µL ddH<sub>2</sub>O.

Reakcijsko mešanico smo nanesli v vdolbinice na optični ploščici (96-Well Optical Reaction Plate, Applied Biosystems, ZDA). Ploščico smo prekrili z optično folijo (MicroAmp<sup>TM</sup> Optical Adhesive Film, Applied Biosystems, ZDA) in jo centrifugirali eno minuto v centrifugi Multifuge 1 S-R (Heraeus, Nemčija) pri 1500 obr/min in 4 °C. Po centrifugiranju smo ploščico vstavili v termopomnoževalnik ABI 7300 (Applied Biosystems, ZDA), v katerem je reakcija pomnoževanja v realnem času potekala pod naslednjimi pogoji:

- začetna denaturacija 3 minute pri 95 °C,
- 50 ciklov pomnoževanja v dveh stopnjah (izmenjače denaturacija 5 sekund pri 95 °C in prileganje začetnih oligonukleotidov in sonde ter podaljševanje novonastale verige DNA 30 sekund pri 60 °C).

Rezultate smo analizirali s programom SDS, verzija 1.1 (Applied Biosystems, ZDA). Računalnik med procesom pomnoževanja produkta PCR zbira podatke o fluorescenci in jih na koncu prikaže v obliki grafa. Na osi x je podano število ciklov, na osi y pa intenziteta fluorescenčnega sevanja barvil ( $\Delta Rn$ ). Linija praga reakcije (angl. *threshold*), ki jo določimo v eksponentnem delu logaritemske krivulje, določa število ciklov (Ct) oziroma točko preboja, pri katerem fluorescenčni signal, ki ga povzroči vzorec, preseže linijo praga reakcije. Pri večjem številu molekul DNA v vzorcu fluorescenčni signal prej preseže prag reakcije, kar se odraža z manjšo vrednostjo Ct. Vrednosti Ct so torej obratno sorazmerne s količino tarčnih molekul in na osnovi le-teh lahko vzorce med seboj primerjamo.

Pri določanju vrednosti Ct smo upoštevali avtomatsko nastavitev vrednosti bazne linije in praga reakcije (angl. *threshold 0,2*). Vzorce, pri katerih smo ugotovili specifičen signal pomnoževanja, smo ponovno testirali vsaj v treh zaporednih ponovitvah. Če smo v dveh od treh reakcij ugotovili vrednost Ct, smo vzorec opredelili kot pozitiven. Vzorec, pri katerem smo vrednost Ct določili samo v eni reakciji in v nobeni od nadaljnjih ponovitev, smo opredelili kot negativen.

### 3.2.1.2.2 Dokazovanje odseka genov *ompA* in *incA*, značilnega za bakterijo *Chlamydia psittaci*

Vzorce brisov žrela in brisov kloake, pri katerih smo dokazali navzočnost gena 23S rRNA, značilnega za bakterije iz družine Chlamydiaceae, smo nadalje testirali na nukleinsko kislino *C. psittaci*. Za PCR v realnem času smo uporabili začetne oligonukleotide, specifične za dokaz gena *ompA* *C. psittaci* genotipov A, B, D, E in F, in začetne oligonukleotide za pomnoževanje odseka gena *incA* *C. psittaci* genotipov A, B, C, D, E in F.

Za tarčni gen *ompA* smo uporabili smiseln začetni oligonukleotid CppsOMP1-F in protismiseln začetni oligonukleotid CppsOMP1-R ter sondu CppsOMP1-S, tabela 11 (Pantchev in sod., 2009). Detekcijski sistem temelji na sondi TaqMan®, ki je na 5' koncu označena s fluorescentnim barvilkom FAM (6-karboksi-flurescin), na 3' koncu pa ima dušilno barvilo TAMRA (6-karboksi-tetrametil-rodamin).

Za tarčni gen *incA* smo pri metodi PCR v realnem času uporabljali smiseln začetni oligonukleotid F1-incA-Cpsi in protismiseln začetni oligonukleotid R1-incA-Cpsi ter sondu Cpsi-incA-NM, tabela 11 (Ménard in sod., 2006). Za dokaz genotipa C bakterije *C. psittaci* smo uporabljali detekcijski sistem, ki temelji na sondi TaqMan® MGB. Sonda Cpsi-incA-NM je na 5' koncu označena s fluorescentnim barvilkom FAM (6-karboksi-flurescin), na 3' koncu pa ima dušilno barvilo (NFQ, angl. *non-fluorescent quencher*) in kovalentno vezano proteinsko molekulo MGB, ki omogoča stabilnejšo vezavo sonde na tarčno zaporedje.

**Tabela 11:** Začetni oligonukleotidi in sonda tarčnih genov *ompA* in *incA* bakterije *Chlamydia psittaci*, njihova nukleotidna zaporedja in velikost produktov, dobljenih z metodo PCR v realnem času.

**Table 11:** Oligonucleotide primers and probe of target gene *ompA* and *incA* of the bacterium *Chlamydia psittaci*, their nucleotide sequences and amplification size obtained by PCR in real time.

Tarčni gen	Oznaka	Zaporedje nukleotidov	Dolžina produkta
<i>ompA</i>	CppsOMP1-F	5'-CAC TAT GTG GGA AGG TGC TTC A-3'	76 bp
	CppsOMP1-R	5'-CTG CGC GGA TGC TAA TGG-3'	
	CppsOMP1-S	5'-CGC TAC TTG GTG TGA C-3'	
<i>incA</i>	F1-incA-Cpsi	5'-GCC ATC ATG CTT GTT TCG TTT-3'	74 bp
	R1-incA-Cpsi	5'-CGG CGT GCC ACT TGA GA-3'	
	Cpsi-incA-NM	5'-TCA TTG TCA TTA TGG TGA TTC AGG A-3'	

Postopek priprave reakcijske mešanice in potek reakcije PCR v realnem času ter obdelava in interpretacija rezultatov so enaki postopkom, ki so opisani v poglavju 3.2.1.2.1.

### **3.2.1.2.3 Dokazovanje odseka gena na 16S rRNA, značilnega za atypično kokošjo klamidijo (ACC) iz družine Chlamydiaceae**

Pri vzorcih, ki smo jih pridobili iz populacije kur (Galliformes), in v katerih smo s PCR v realnem času dokazali odsek gena 23S rRNA, značilen za bakterije iz družine Chlamydiaceae, nismo pa dokazali odseka gena, značilnega za *C. psittaci*, smo želeli s PCR v realnem času ugotoviti navzočnost DNA atypične kokošje klamidije iz družine Chlamydiaceae s pomnoževanjem odseka gena 16S rRNA.

V ta namen smo uporabili smiselni začetni oligonukleotid ACC\_Fw in protismiselni začetni oligonukleotid ACC\_Rv ter sondu ACC\_Pr, tabela 12 (Zocevic in sod., 2012). Za dokaz bakterijske DNA smo uporabili detekcijski sistem, ki temelji na sondi TaqMan®. Sonda ACC-Pr je na 5' koncu označena s fluorescentnim barvilm FAM (6-karboksi-flurescin), na 3' koncu pa ima dušilno barvilo TAMRA (6-karboksi-tetrametil-rodamin).

**Tabela 12:** Začetni oligonukleotidi in sonda tarčnega gena, značilnega za atypično kokošjo klamidijo iz družine Chlamydiaceae, njihova nukleotidna zaporedja in velikost produktov, dobljenih z metodo PCR v realnem času.

**Table 12:** Oligonucleotide primers and probe specific for the target gene of atypical chicken Chlamydiaceae from the family Chlamydiaceae, their nucleotide sequences and amplification size obtained by PCR in real time.

Oznaka	Zaporedje nukleotidov	Dolžina produkta
ACC_Fw	5'-CGA ACG AAA TAA CAC TTC GGT GTT G-3'	120 bp
ACC_Rv	5'-ACA TAC CAC ATT CGG TAT TAG CGG T-3'	
ACC_Pr	5'-GTG GCG GAA GGG TTA GTA AT-3'	

Za pomnoževanje specifičnega odseka iz vzorcev brisov perutnine smo uporabili reakcijsko mešanico TaqMan Universal PCR Master Mix s pasivnim referenčnim barvilmom ROX (Applied, Francija). Volumen reakcijske mešanice je bil 20 µL in je vseboval:

- 2 µL izolirane DNA,
- 10 µL 10x reakcijskega pufra,
- 0,5 µL (0,6µM) posameznega začetnega oligonukleotida,
- 2 µL (0,1 µM) sonde,
- ddH<sub>2</sub>O do končnega volumna (20 µL).

Postopek priprave optične ploščice z reakcijsko mešanicijo je enak postopku, opisanem v poglavju 3.2.1.2.1. Pripravljeno ploščico smo vstavili v termopomnoževalnik ABI PRISM 7300 (Applied Biosystems, Francija), v katerem je reakcija pomnoževanja v realnem času potekala pod naslednjimi pogoji:

- začetna denaturacija 10 minut pri 95 °C,
- 50 ciklov pomnoževanja v treh stopnjah (denaturacija 15 sekund pri 95 °C in prileganje začetnih oligonukleotidov in sonde 15 sekund ter podaljševanje novonastalih verig DNA ena minuta pri 60 °C).

Rezultate smo interpretirali po enakem postopku, kot je opisano v poglavju 3.2.1.2.1.

### **3.2.1.3 Genotipizacija bakterije *Chlamydia psittaci* z metodo MLVA**

Za genotipizacijo *C. psittaci* smo izbrali metodo MLVA, pri kateri smo najprej z metodo PCR pomnožili poljubno število lokusov z variabilnim številom tandemskih ponovitev (VNTR, angl. variable number tandem repeat). Z izbrano metodo smo testirali vzorce, pri katerih smo ugotovili nukleinsko kislino bakterije *C. psittaci*. Genotipe (A-F) bakterije *C. psittaci* smo dokazali s pomnoževanjem specifičnih odsekov DNA *C. psittaci*, katerih nukleotidno zaporedje ima visoko stopnjo polimorfizma. V ta namen smo za metodo MLVA uporabili osem smiselnih in protismiselnih začetnih oligonukleotidov, glej tabelo 13 (Laroucau in sod., 2008).

**Tabela 13:** Oznaka osmih specifičnih odsekov VNTR bakterije *Chlamydia psittaci* in njihova nukleotidna zaporedja začetnih oligonukleotidov, dolžina produktov in dolžina ponavljajoče se enote. Povzeto po: Laroucau in sod. (2008).

**Table 13:** Identification of the eight specific VNTR segments of bacterium *Chlamydia psittaci* and their nucleotide sequences of initial oligonucleotides, amplification size and the length of the repeating unit. Adapted from: Laroucau et al. (2008).

VNTR	Smiselni začetni oligonukleotidi	Protismiselni začetni oligonukleotidi	Dolžina produkta (bp)	Dolžina enote (bp)*
ChlaPsi_280	5'-TCA GAT AGA CTA GGT AAT CCT G-3'	5'-CTC CCT CTA CCA CAA TTG CCT A-3'	647	180
ChlaPsi_480	5'-AGT TTG CAA AGG AGC CGC TGC A-3'	5'-CCT TTC TCC ACC TCT TTC TTT C-3'	337	36
ChlaPsi_605	5'-CTA TAA TTC CFC GTT GAT TTG-3'	5'-AAA CTC GTG AAG CTT AAT CCC C-3'	194	42
ChlaPsi_810	5'-TGA AAG GCT ACT CGC AAT ATC-3'	5'-GGC GAT AAA TAC TAT GGA TAC C-3'	519	63
ChlaPsi_222	5'-GCA CTC TCA TAT CCT ATT GAA GTG-3'	5'-GAT GAC AGC GGA ACA ACA TAC A-3'	203	6
ChlaPsi_281	5'-AAG ATA TGC AGG TGA GCC TG-3'	5'-ACA CAG CAC AAG TGA CCC CA-3'	134	18
ChlaPsi_929	5'-CAC GGA CCC CTA AAT TT CTG G-3'	5'-TCC GGG AAC TCA GGA GCA ATA A-3'	151	9
ChlaPsi_1778	5'-GGC ATT CCT GTA ATA TTC ACA CC-3'	5'-GAG GAT GAA GGT AAT GGC TTC G-3'	101	9

\* dolžina ponavljajoče se enote

Za pomnoževanje specifičnih odsekov genskih lokusov VNTR *C. psittaci* smo uporabili reagente HotStar Taq Master Mix Kit (Qiagen®, Nemčija). Pripravili smo 15 µL reakcijske mešanice, ki je vsebovala:

- 2 µL izolirane DNA,
- 1,5 µL 1x reakcijskega pufra,
- 0,1 µL (1 U) DNA polimeraze,
- 0,15 µL (200 µM) dNTP mešanice,
- 1,5 µL (0,3 µM) posameznega začetnega oligonukleotida,
- 9,5 µL ddH<sub>2</sub>O.

Reakcijo PCR smo izvedli na aparaturi PCR (Applied Biosystems, ZDA) z naslednjim programom:

- začetna denaturacija 15 minut pri 95 °C,
- 40 ciklov pomnoževanja v treh stopnjah (denaturacija 30 sekund pri 95 °C, prileganje začetnih oligonukleotidov 30 sekund pri 56 °C in podaljševanje verige 45 sekund pri 72 °C),
- končno podaljševanje 10 minut pri 72 °C.

Uspešnost pomnoževanja in velikost produktov PCR smo analizirali z vodoravno elektroforezo v 4% agaroznem gelu. Gel smo pripravili tako, da smo v stekleno čašo odtehtali 4 g agaroze v prahu (Molecular Biology Certified Agarose, Bio-Rad Laboratories, Hercules, ZDA) in ji dodali 100 ml 0,5x pufra TAE (tris-acetat-EDTA). Raztopino smo premešali in jo v mikrovalovni pečici segreli do vrelišča, da se je agaroza popolnoma raztopila. Nato smo raztopino ohladili na približno 60 °C in jo vlili v model, zatisnjen z gumijasto oblogo na obeh koncih. Dokončno smo raztopino ohladili v kalupu z elektroforeznim glavničkom. Strjen gel smo položili v elektroforezno kadičko in ga prelimili s pufrom TAE. V vdolbinice gela smo nanašali po 9 µL produktov PCR obarvanih z barvilom EZ-Vision® (Interchim, Francija). Velikost produktov PCR smo primerjali z označevalcem molekulske mase 100 bp (DNA ladder, Mbi, Euromedex, Francija). Elektroforeza v gelu je potekala do 5 ur pri sobni temperaturi in električnem toku 100 mA. Kot usmernik električnega toka smo uporabili Power Pack P25 (Biometra, Nemčija). Po končani elektroforezi smo gel pregledali z UV transiluminatorjem (Gel Doc, Bio-Rad, Nemčija). Velikost produkta PCR smo določali glede na progo pozitivne kontrole in po velikosti odsekov DNA označevalca molekulske mase.

Produkte PCR, ki smo jih ločili z gelsko elektroforezo, smo primerjali z že znanimi velikostmi fragmentov pozitivne kontrole (sev Loth bakterije *C. psittaci*, Francija), tabela 14. Za vsak lokus, ki je bil vključen v analizo, smo določili število tandemskih ponovitev. Rezultat je kombinacija številk (številčna koda), ki določa genotip bakterije *C. psittaci* (Laroucau in sod., 2008).

**Tabela 14:** Število tandemskih ponovitev pozitivne kontrole seva Loth bakterije *Chlamydia psittaci* pri posameznem VNTR-ju. Povzeto po: Laroucau in sod. (2008).

**Table 14:** The number of tandem repeats of positive control of the strain Loth of bacterium *Chlamydia psittaci* at each VNTR Adapted from: Laroucau et al. (2008).

Število tandemskih ponovitev seva Loth bakterije <i>Chlamydia psittaci</i>							
ChlaPsi_280	ChlaPsi_480	ChlaPsi_605	ChlaPsi_810	ChlaPsi_222	ChlaPsi_281	ChlaPsi_929	ChlaPsi_1778
3	6	2	4	6	4	3	3

### 3.2.1.4 Določanje nukleotidnega zaporedja

Producptom PCR, ki smo jih pridobili pri dokazovanju gena 23S rRNA, značilnega za bakterije iz družine Chlamydiaceae, smo določili nukleotidno zaporedje po naslednjih korakih:

- dokazovanje produkta PCR v realnem času na agaroznem gelu,
- čiščenje produktov PCR,
- analiza nukleotidnih zaporedij.

Pripravili smo 1,8% agarozni gel. V stekleno čašo smo odtehtali 2,2 g agaroze v prahu (Molecular Biology Certified Agarose, Bio-Rad Laboratories, Hercules, ZDA) in dodali 120 ml 1% pufra TAE (tris-acetat-EDTA). S segrevanjem v mikrovalovni pečici smo raztopino segregli do vrelišča in počakali, da se je agarosa popolnoma raztopila. Raztopino smo ohladili na približno 50 °C in jo vlili v model, zatisnjen z gumijasto oblogo na obeh koncih, vstavili glavnik in počakali, da se je gel strdil. Gel smo skupaj z modelom brez tesnil prenesli v kadičko za elektroforezo, napolnjeno s pufrom TAE. 15 µL produkta PCR smo pomešali s 4 µL nalagalnega pufra (6x DNA loading dye, Fermentas, Litva) in ju nanesli v vdolbinice gela. Poleg vzorcev smo v prvo in zadnjo vdolbinico gela nanesli tudi standardni označevalec velikosti DNA (GeneRuler, 100 bp DNA Ladder, Fermentas, Litva). Ločevanje fragmentov po velikosti je potekalo približno 45 minut na sobni temperaturi pri električni napetosti 120 V in toku 438 mA. Kot usmernik električnega toka smo uporabili Power Pack P25 (Biometra, Nemčija). Gel smo po končani elektroforezi obarvali z raztopino etidijevega bromida (BioRad, ZDA) in ga po 15 minutah barvanja sprali z vodo. Rezultate smo odčitali z UV transiluminatorjem (Gel Doc 1000, Bio-Rad, Nemčija).

Specifične produkte PCR, ki smo jih izrezali iz agaroznega gela, smo očistili s komercialnim kompletem Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, ZDA).

Čiščenje produktov smo izvajali po naslednji shemi:

- izrezanim in stehtanim produktom iz gela smo v 1,5-mililitrsko reagenčno epruveto dodali reagent za vezavo DNA na kremenčeve membrano (angl. *membrane binding solution*) v razmerju 10 µL reagenta na 10 mg izrezanega gela.
- Vzorec smo premešali z vibracijskim mešalnikom in ga nato vstavili v topotni stresalnik z nastavljivo temperaturo (Thermomixer 5436, Eppendorf, Nemčija), da se je popolnoma stopil. Gel smo inkubirali 15 minut pri temperaturi 60 °C in 350 obratih na minuto.
- Vzorec smo po inkubaciji centrifugirali 10 sekund pri 2.000 rpm in ga prenesli na kolono (angl. *minicolumn*), ki smo jo postavili v zbirno epruveto (angl. *collection tube*).
- Vzorec smo inkubirali eno minuto na sobni temperaturi in ga nato centrifugirali v centrifugi (Centrifuge 5417C, Eppendorf, Nemčija) 1 minuto na 14000 rpm.
- Kolono smo vzeli iz zbirne epruvete, odlili tekočino in kolono ponovno vstavili v zbirno epruveto.
- V kolono smo odpipetirali 700 µL raztopine za spiranje membrane (angl. *Membrane Wash Solution*), ki smo jo razredčili s 95% etanolom.
- Vzorec smo centrifugirali eno minuto na 14.000 rpm in nato odlili tekočino iz zbirne epruvete.
- Kolono smo ponovno sprali s 500 µL raztopine za spiranje.
- Vzorec smo centrifugirali 5 minut na 14.000 rpm in ga vzeli iz kolone. Zbirno epruveto smo po centrifugiranju zavrgli.
- Kolono smo postavili v novo sterilno 1,5-mililitrsko reagenčno epruveto in odprto centrifugirali na 2.000 rpm 2 minuti, da je izhlapel preostanek etanola.
- Kolono smo prenesli v novo sterilno 1,5-mililitrsko reagenčno epruveto, dodali 50 µL ddH<sub>2</sub>O in inkubirali eno minuto na sobni temperaturi.
- Po inkubaciji smo vzorec centrifugirali eno minuto na 14.000 rpm, da smo sprali na membrano vezano DNA.
- Po centrifugiranju smo kolono zavrgli, 1,5-mililitrsko epruveto z raztopljenou DNA pa shranili pri temperaturi minus 20 °C.

Tako očiščene produkte PCR smo poslali v nadaljnjo obdelavo v laboratorij Macrogen ([www.macrogen.com](http://www.macrogen.com)), kjer so izvedli sekveniranje po Sangerjevi metodi.

Z brskalnikom Entrez Browser, katerega delovanje omogoča Nacionalni center za informacije s področja biotehnologije (NCBI, angl. *National centre for biotechnology information*), smo pridobili podatke o nukleotidnih zaporedjih referenčnih sevov bakterij iz družine Chlamydiaceae. Izpise sekvenc, pridobljene v naši raziskavi, smo obdelali z računalniškim programom Chromas Lite, verzija 2.01, ki omogoča vizualizacijo, primerjavo in tudi popravke izpisov. Z računalniškim programom BioEdit smo poravnali in primerjali ter izračunali odstotek identičnosti med testnimi sekvencami in sekvenco referenčnih sevov.

Za filogenetske analize smo uporabili metodo povezovanja sosedov (NJ, angl. *Neighbour-joining*) z računalniškim programom MEGA, verzija 5.0.

### **3.2.1.5 Pozitivne in negativne kontrole**

Pri vseh molekularnih metodah smo uporabili pozitivno in negativno kontrolo. Kot negativno kontrolo smo vedno uporabili vodo UltraPure<sup>TM</sup> (Invitrogen, ZDA), ki nam je služila kot kontrola kontaminacije (NTC, angl. *no template control*). Za pozitivne kontrole smo uporabili DNA referenčnega seva Loth bakterije *C. psittaci* (Francija) pri metodah, opisanih v poglavjih 3.2.1.1, 3.2.1.2.1, 3.2.1.2.2, 3.2.1.3 in 3.2.1.4 ter sev 08-1247/3 bakterije *Chlamydia* (Francija) pri metodi, opisani v poglavju 3.2.1.2.3.

### **3.2.2 Dokazovanje specifičnih protiteles proti bakterijam iz rodu *Chlamydia***

Preiskave vzorcev serumov 3119 ptic smo opravili na Inštitutu za zdravstveno varstvo perutnine Veterinarske fakultete v Ljubljani. S serološko metodo posredne imuno-fluorescence (IIF) smo v preiskovanih serumih ugotavljali specifična protiteesa proti bakterijam iz rodu *Chlamydia*.

Z metodo IIF dokazujemo specifična protitelesa IgG v serumu ptic. Specifična protitelesa v serumu se vežejo na antigene, ki so pritrjeni na predmetno stekelce. Nastalemu imunskemu kompleksu v drugi fazi reakcije dodamo označena vrstno specifična protitelesa, ki se vežejo na predhodno nastali kompleks antigen-protitelo. Vrstno specifičen konjugat vsebuje protitelesa, ki so označena z barvilkom FITC (angl. *fluorescein isothiocyanate*). Protitelesa, označena s fluorokromom, imajo lastnost, da absorbirajo svetlobo določene valovne dolžine in oddajajo svetlobo druge valovne dolžine v vidnem delu spektra. Zaradi te lastnosti lahko nastali imunski kompleks opazujemo s fluorescentno svetlobo pod mikroskopom. Metoda IIF je visoko specifična in občutljiva ter sorazmerno hitra, vendar je ocena rezultatov subjektivna, zato je pomembno, da jo izvaja izkušena oseba (Avšič Županc, 2002; Račnik, 2008).

Vrstno specifičen konjugat, ki smo ga uporabljali v naši raziskavi, je bil predhodno validiran za posamezne skupine ptic. Izbrani konjugat je uporaben tudi za sorodne vrste ptic (Dovč, 1998). Odvisno od preiskovane vrste ptic smo smiselno uporabljali anti-kokošji, anti-papagajski ali anti-golobji konjugat.

Za izvedbo metode IIF smo uporabili komplet reagentov (ServiBio, Francija). Kot pozitivno kontrolo smo uporabili kokošji serum, pozitiven na *C. psittaci*. Za negativno kontrolo smo uporabili negativni nacionalni serum kokoši SPF (angl. *specific pathogen free*). Vse serumske vzorce smo presejalno pregledovali pri razredčitvi 1:40 (5 µL seruma, ki smo ga redčili s 195 µL pufra TWEEN). Razredčitve serumov smo pripravili v mikroploščah z vdolbinami v obliki črke U (Plexiglas plates, Disposable plate). Pripravljeno razredčino seruma smo nanesli na predmetna stekelca (Servibio, Francija) in postopek nadaljevali po navodilu proizvajalca. Pripravljene preparate smo istega dne odčitavali s fluorescentnim mikroskopom (Nikon Eclipse E80i) pri 400-kratni povečavi. Ob pozitivni reakciji smo testiranje ponovili v razredčitvah 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640 in 1:1280. Serum smo razredčevali najmanj do prvega negativnega rezultata.

### **3.3 STATISTIČNA ANALIZA**

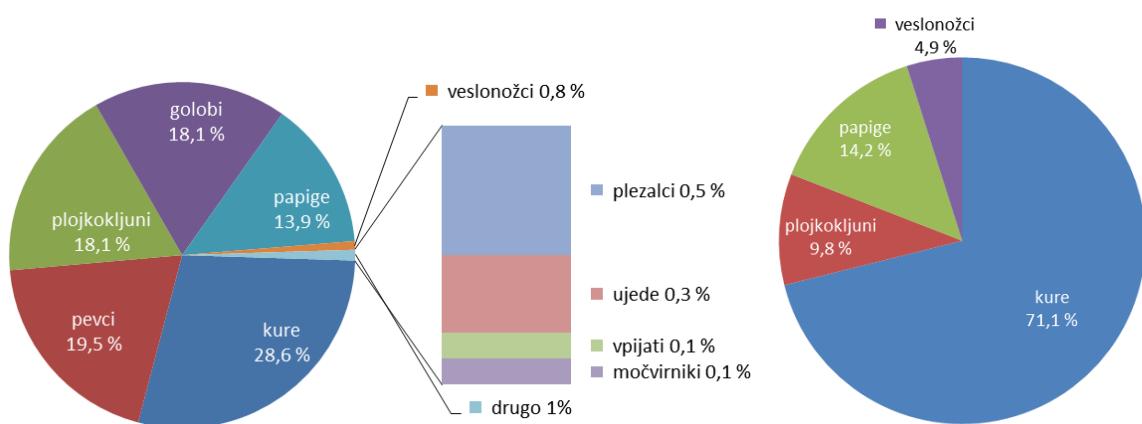
Rezultate, pridobljene z molekularno metodo PCR v realnem času, s katero smo dokazali odsek gena 23S rRNA, značilen za bakterije iz družine Chlamydiaceae, smo statistično obdelali s programom GraphPad Prism 6.0 za Okna (GraphPad Software, San Diego, California, ZDA, 2012).

V statistično analizo smo vključili pozitivne vrednosti Ct tarčne DNA, ki smo jo izolirali iz brisov žrela in brisov kloake pri prostoživečih pticah, sobnih pticah, pasemskeih golobih in dvoriščni perutnini. Dobljene vrednosti Ct iz brisov žrela in brisov kloake smo med seboj primerjali s parametričnim neparnim t-testom. Porazdelitve Ct vrednosti smo ugotavljali s testom D'Agostino & Pearson.

Statistično pomembnost smo določili z vrednostjo p. Razliko smo ovrednotili kot statistično značilno, če je bil p manjši od vnaprej izbrane vrednosti 0,05.

## 4 REZULTATI

V našo raziskavo smo vključili 4004 ptic. Z molekularnimi metodami smo preiskali 1068 ptic, pripadajočih 73 vrstam iz 10 redov, glej sliko 13 (levo). S serološko metodo, posredno imunofluoresenco, smo preiskali 182 hlevov perutnine intenzivne reje kokoši (skupno 2986 serumov) in 133 ptic, razvrščenih v 14 vrst iz 4 redov. Redovi ptic, ki smo jih preiskali s serološkimi in hkrati tudi z molekularnimi metodami, so prikazni na sliki 13 (desno).



**Slika 13:** Grafični prikaz redov ptic, preiskanih z molekularnimi (levo) in serološkimi (desno) metodami na okužbo z bakterijami iz družine Chlamydiaceae.

**Figure 13:** Graphical presentation of bird's orders tested by molecular (left) and serological (right) methods to infection with bacteria from the family Chlamydiaceae.

### 4.1 Prostoživeče ptice

Z molekularnimi metodami smo pregledali brise žrela in brise kloake 350 ptic, pripadajočih 31 vrstam iz 6 redov (tabela 4).

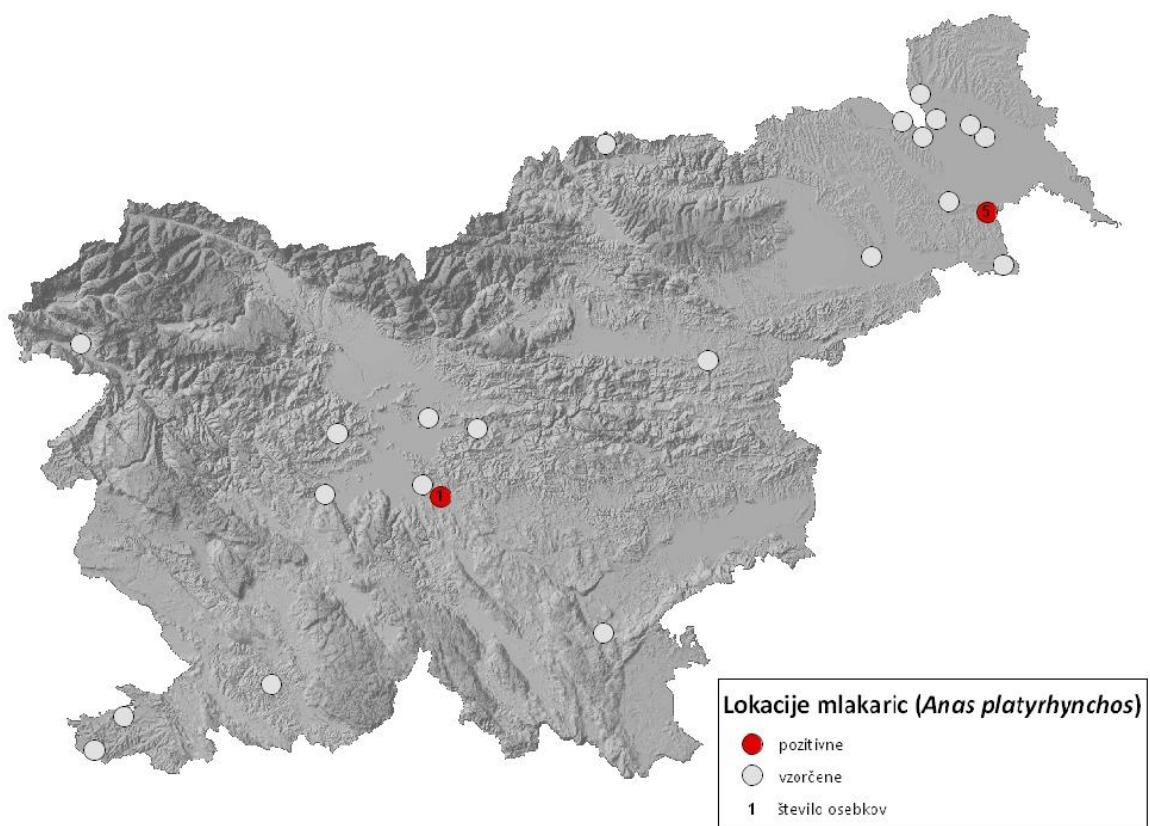
Z metodo PCR v realnem času smo pri 10 (2,9 %) od 350 preiskanih prostoživečih ptic dokazali okužbo z bakterijami iz družine Chlamydiaceae z dokazom odseka gena 23S rRNA. Tarčno nukleinsko kislino smo potrdili pri 6 mlakaricah od 121 pregledanih (5,0 %), enem domačem golobu od 11 pregledanih (9,1 %) in treh sivih vranah od 7 pregledanih (42,9 %) (slika 14). Ostale ptice so bile negativne.



**Slika 14:** Rezultati pomnoževanja DNA, značilne za bakterije iz družine Chlamydiaceae, z metodo PCR v realnem času. Tarčna DNA je bila izolirana iz brisov žrela, odvzetih trem sivim vranam (*Corvus cornix*) z oznakami A1, A31 in A119.

**Figure 14:** Results of DNA amplification specific for bacteria belonging to the family Chlamydiaceae by PCR in real time. Target DNA was isolated from pharyngeal swabs taken from three hooded crows (*Corvus cornix*) with marks A1, A31 and A119.

Deset vzorcev, pri katerih smo dokazali prisotnost gena 23S rRNA, značilnega za bakterije iz družine Chlamydiaceae, smo z metodo PCR v realnem času preiskali na prisotnost tarčne nukleinske kisline, značilne za *C. psittaci*. Odsek gena *ompA*, značilen za *C. psittaci*, smo dokazali v kloakalnem brisu domačega goloba. Odsek gena *incA*, značilen za *C. psittaci*, smo dokazali pri šestih mlakaricah (slika 15), in sicer pri dveh v brisu žrela in kloake ter pri štirih v brisu žrela. Preiskani vzorci treh sivih vran so bili pri dokazovanju genov *ompA* in *incA*, značilnih za bakterijo *C. psittaci*, negativni (tabela 15).



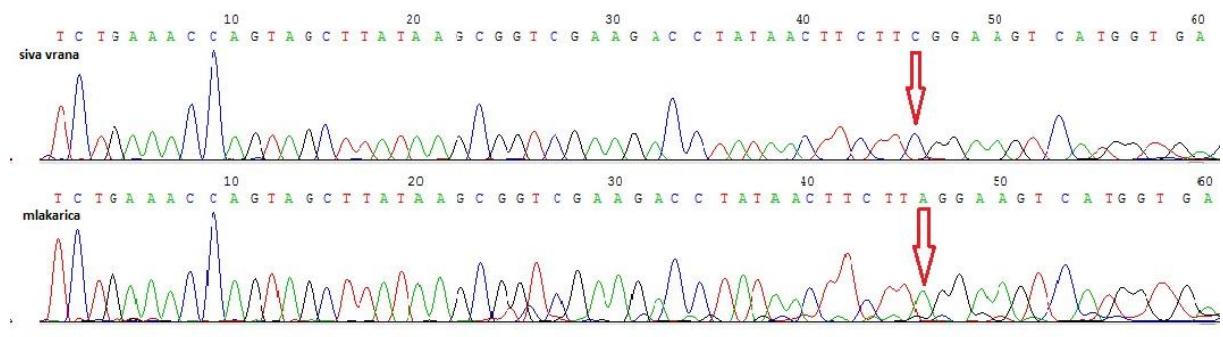
**Slika 15:** Lokacije in število mlakaric (*Anas platyrhynchos*), pozitivnih na odsek gena *incA*, značilen za bakterijo *Chlamydia psittaci*.

**Figure 15:** Locations and numbers of positive mallards (*Anas platyrhynchos*) on *incA* gene region specific for bacterium *Chlamydia psittaci*.

Z metodo MLVA smo uspešno genotipizirali DNA *C. psittaci* šestih mlakaric in enega prostoživečega goloba, pri katerih smo z metodo PCR v realnem času dokazali prisotnost gena, značilnega za *C. psittaci*. Pri vseh šestih mlakaricah smo določili genotip C, pri domačem golobu pa genotip B (tabela 15).

Brisi žrela treh sivih vran, pri katerih smo dokazali prisotnost gena 23S rRNA, značilnega za bakterije iz družine Chlamydiaceae, so bili pri preiskavi z metodo PCR v realnem času negativni tako na *C. psittaci* kot tudi na prisotnost odseka gena na 16S rRNA, značilnega za ACC. Naknadno smo izvedli analizo nukleotidnega zaporedja v odseku gena 23S rRNA, značilnega za bakterije iz družine Chlamydiaceae, pri vzorcih 6 mlakaric, prostoživečem golobu in treh sivih vranah.

Pri analizi nukleotidnega zaporedja DNA izbranih vzorcev smo ugotovili, da se v zaporedju DNA nahaja citozin (C) pri sivih vranah in adenin (A) pri mlakaricah in golobu (slika 16). Identičnost zaporedij nukleotidov, med vzorci mlakaric in goloba z referenčnim sevom bakterije *C. psittaci* 84/55 (CP003790), je bila 100%. Vzorci sivih vran so se od drugih vzorcev prostoživečih ptic v nukleotidnem zaporedju razlikovali v 1%.



**Slika 16:** Primerjava dveh kromatogramov nukleotidnih zaporedij iz vzorca brisa žrela pri prostoživeči sivi vrani (*Corvus cornix*) in mlakarici (*Anas platyrhynchos*). Prikazana sta zapisa z odseka gena 23S rRNA, značilnega za bakterije iz družine Chlamydiaceae. Označeni sta mesti, na katerih se nukleotidni zaporedji med seboj razlikujeta.

**Figure 16:** Comparison of two chromatograms of nucleotide sequences from the pharyngeal swab samples from wild hooded crows (*Corvus cornix*) and mallards (*Anas platyrhynchos*). The format of 23S rRNA gene regions specific for bacteria belonging to the family Chlamydiaceae is shown. Places, where the nucleotide sequences differ are marked.

**Tabela 15:** Pozitivni rezultati molekularnih preiskav pri posamezni prostoživeči ptici.**Table 15:** Positive results of molecular methods in individual wild bird.

Slovensko ime	PCR v realnem času								MLVA <i>C. psittaci</i>		
	Chlamydiaceae (vrednost Ct)		<i>ompA</i> <i>C. psittaci</i> (vrednost Ct)		<i>incA</i> <i>C. psittaci</i> (vrednost Ct)		16S rRNA <i>C. chicken*</i> (vrednost Ct)				
	F	K	F	K	F	K	F	K	številčna koda	profil	genotip
mlakarica	32,78	35,5	ng	ng	37,03	ng	/	/	2 3 2 3 6 3 0 4	8	C
mlakarica	31,02	ng	ng	/	35,22	/	/	/	2 3 2 3 6 3 0 4	8	C
mlakarica	34,14	ng	ng	/	39,08	/	/	/	2 3 2 3 6 3 0 4	8	C
mlakarica	34,4	33,98	ng	ng	37,76	ng	/	/	2 3 2 3 6 3 0 4	8	C
mlakarica	34,12	ng	ng	/	38,62	/	/	/	2 3 2 3 6 3 0 4	8	C
mlakarica	29,77	ng	ng	/	34,07	/	/	/	2 3 2 3 6 3 0 4	8	C
domači golob	ng	30,23	/	34,46	/	/	/	/	2 2 1 4 6 3 3 4	7	B
siva vrana	31,84	ng	ng	/	ng	/	ng	/	/	/	/
siva vrana	32,27	ng	ng	/	ng	/	ng	/	/	/	/
siva vrana	27,93	ng	ng	/	ng	/	ng	/	/	/	/

Legenda: (F) = bris žrela, (K) = bris kloake, (ng) = negativno, (/) = preiskava ni bila izvedena, (\*) = atipična kokošja klamidija.

Legend: (F) = pharyngeal swab, (K) = cloacal swab, (ng) = negative, (/) = investigation was not performed, (\*) = atypical chicken Chlamydiaceae.

## 4.2 Sobne ptice

Skupno smo odvzeli in pregledali brise žrela in brise kloake 125 sobnih ptic 21 različnih vrst, razvrščenih v 3 redove. Med njimi smo 13 papigam odvzeli še kri za serološko preiskavo (tabela 5).

### 4.2.1 Ugotavljanje okužbe ptic z bakterijami iz družine Chlamydiaceae z molekularnimi metodami

Z metodo PCR v realnem času smo vsem sobnim pticam preiskali brise žrela in brise kloake. Odsek gena 23S rRNA, značilen za bakterije iz družine Chlamydiaceae, smo dokazali pri treh (2,4 %) sobnih pticah. Vzorci so bili pozitivni pri eni skobčevki od 44 pregledanih (2,3 %) in dveh agapornisih od 12 pregledanih (16,7 %). Vzorci ostalih preiskanih sobnih ptic so bili negativni.

Vzorce ptic, pri katerih smo dokazali okužbo z bakterijo iz družine Chlamydiaceae, smo prav tako z metodo PCR v realnem času preiskali na prisotnost gena *ompA*, značilnega za *C. psittaci*. Tarčno nukleinsko kislino smo dokazali v kloakalnem brisu skobčevke, v žrelnem in kloakalnem brisu pri enem agapornisu (slika 17) ter v kloakalnem brisu pri drugem agapornisu (tabela 16).

Vzorce kloakalnih brisov, pozitivne na *C. psittaci*, smo genotipizirali z metodo MLVA. Pri skobčevki smo določili *C. psittaci* genotipa A, pri obeh agapornisih pa genotipa B (tabela 16).

Pri analizi nukleotidnega zaporedja na odseku gena 23S rRNA, značilnem za bakterije iz družine Chlamydiaceae, nismo zasledili nobenih neujemanj. Zaporedja nukleotidov DNA iz vzorcev skobčevke in dveh agapornisov so bila 100% identična z nukleotidnim zaporedjem referenčnega seva *C. psittaci* 84/55.



**Slika 17:** Rezultati pomnoževanja DNA, značilno za bakterijo *Chlamydia psittaci*, z metodo PCR v realnem času. Tarčna DNA je bila izolirana iz brisa žrela in brisa kloake agapornisa z oznako A66.

**Figure 17:** Results of DNA amplification specific for bacterium *Chlamydia psittaci* by PCR in real time. Target DNA was isolated from pharyngeal swab and cloacal swab of a lovebird marked A66.

**Tabela 16:** Pozitivni rezultati molekularnih in seroloških preiskav pri posamezni sobni ptici.

**Table 16:** Positive results of molecular and serological testings in a single cage bird.

Slovensko ime	Oznaka vzorca	PCR v realnem času				MLVA <i>C. psittaci</i>			IIF Titer Ab proti <i>Chlamydia</i>	
		Chlamydiaceae (vrednost Ct)		<i>ompA C. psittaci</i> (vrednost Ct)						
		F	K	F	K	številčna koda	profil	genotip		
skobčevka	A130	34,75	27,02	ng	30,25	2 6 2 4 6 4 3 3	12	A	1:40	
agapornis	A 66	30,30	32,97	33,94	33,44	2 5 2 4 6 4 3 3	10	B	/	
agapornis	A 94	ng	30,20	/	33,34	2 5 2 4 6 4 3 3	10	B	/	

Legenda: (F) = bris žrela, (K) = bris kloake, (ng) = negativno, (/) = preiskava ni bila izvedena.

Legend: (F) = pharyngeal swab, (K) = cloacal swab, (ng) = negative, (/) = investigation was not performed.

#### **4.2.2 Ugotavljanje okužbe ptic z bakterijami iz rodu *Chlamydia* z metodo posredne imunofluorescence (IIF)**

Z metodo IIF smo pregledali vzorce serumov 13 papig, pripadajočih osmim različnim vrstam (tabela 5). Specifična protitelesa IgG proti bakterijam iz rodu *Chlamydia* smo dokazali pri eni skobčevki od treh pregledanih. Vrednost titra protiteles je bila 1:40 (tabela 16). Ostali serumi sobnih ptic, preiskani na prisotnost specifičnih protiteles so bili negativni.

#### **4.3 Ptice živalskega vrta in živalskim vrtovom podobnih prostorov (zoo parki)**

Skupno smo v zoo parkih odvzeli in pregledali vzorce 108 ptic, pripadajočih 15 vrstam iz 5 redov. Vsem pticam smo za molekularno ugotavljanje okužbe z bakterijami iz družine Chlamydiaceae odvzeli bris žrela in bris kloake. Vsi preiskani vzorci ptic so bili negativni na preiskavo odseka gena 23S rRNA, značilnega za bakterije iz družine Chlamydiaceae, z metodo PCR v realnem času.

Sedemdesetim pticam smo odvzeli tudi kri (tabela 6). Vsi z metodo IIF preiskani serumi ptic so bili negativni na dokaz specifičnih protiteles proti bakterijam iz rodu *Chlamydia*.

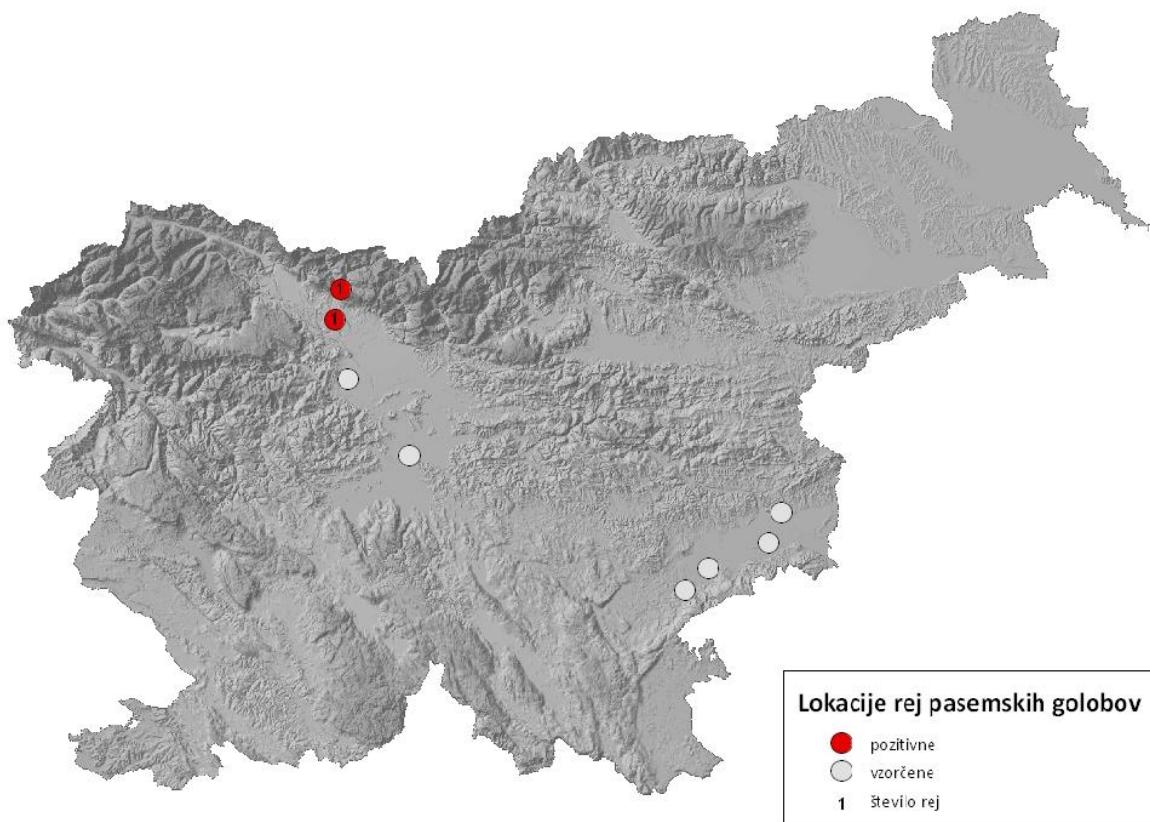
#### **4.4 Pasemski golobi**

V našo raziskavo smo vključili brise žrela in brise kloake 150 pasemskih golobov pri 15 različnih gojiteljih golobov po Sloveniji. Pri vsakem gojitelju smo vzorčili po 10 golobov.

Za molekularno preiskavo smo vzorce pasemskih golobov združevali, kot je opisano v poglavju 3.2.1.1. Pri vsaki rejji smo v skupni vzorec združili po pet brisov žrela in po pet brisov kloake. Med preiskanimi rejami pasemskih golobov smo prisotnost odseka gena, značilnega za bakterije Chlamydiaceae, z metodo PCR v realnem času dokazali pri dveh (13,3 %) gojiteljih golobov. Ostali preiskani vzorci so bili negativni (tabela 17).

V izolirani DNA vzorcev, pri katerih smo dokazali odsek gena 23S rRNA, značilen za bakterije iz družine Chlamydiaceae, smo z metodo PCR v realnem času želeli potrditi gen *ompA*, značilen za bakterijo *C. psittaci*. Tarčni gen smo dokazali v brisih žrela in brisih kloake golobov pri dveh gojiteljih z gorenjskega območja (slika 18). Nadalje smo pozitivne vzorce na *C. psittaci* genotipizirali z metodo MLVA (slika 19). V preiskanih vzorcih smo dokazali *C. psittaci* genotipa B (tabela 17).

Pri poravnavi nukleotidnega zaporedja odseka gena 23S rRNA, značilnega za bakterije iz družine Chlamydiaceae, smo določili 100% identičnost nukleotidnega zaporedja DNA vzorcev pasemskih golobov s primerljivim sevom bakterije *C. psittaci* 84/55.



**Slika 18:** Lokacije in število rej pasemskih golobov, pozitivnih na bakterijo *Chlamydia psittaci*.

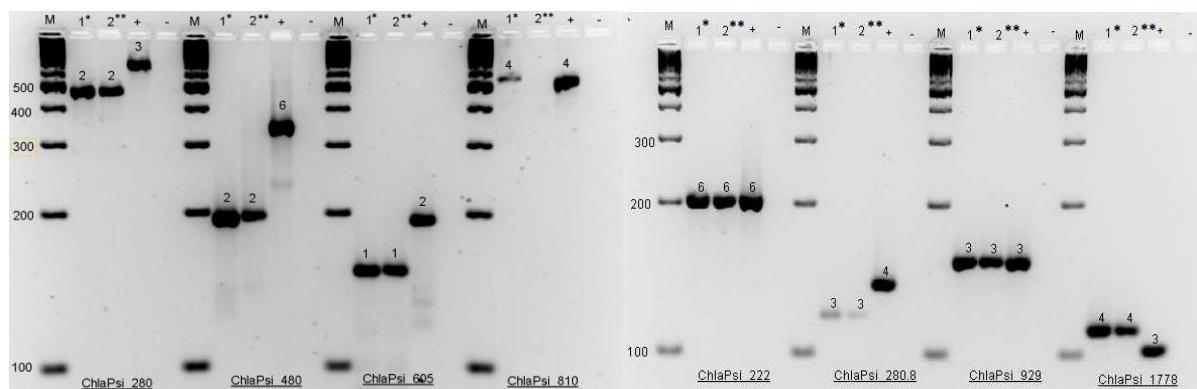
**Figure 18:** Locations and number of flocks of breed pigeons positive to *Chlamydia psittaci*.

**Tabela 17:** Pozitivni rezultati molekularnih preiskav pri posamezni rej pasemskih golobov.**Table 17:** Positive results of molecular tests for each flock of breed pigeons.

Slovensko ime	PCR v realnem času				MLVA <i>C. psittaci</i>		
	Chlamydiaceae (vrednost Ct)		<i>ompA</i> <i>C. psittaci</i> (vrednost Ct)				
	F	K	F	K	številčna koda	profil	genotip
pasemski golobi	ng <sup>(5)</sup>	27,08 <sup>(5)</sup>	/	29,08	2 2 1 4 6 3 3 4	7	B
pasemski golobi	32,15 <sup>(5)</sup>	29,49 <sup>(5)</sup>	37,5	34,01	2 2 1 4 6 3 3 4	7	B

Legenda: (F) = bris žrela, (K) = bris kloake, (ng) = negativno, (/) = preiskava ni bila izvedena, (<sup>(5)</sup>) = v skupni vzorec je združenih pet brisov.

Legend: (F) = pharyngeal swab, (K) = cloacal swab, (ng) = negative, (/) = investigation was not performed, (<sup>(5)</sup>) = sample combined from five swabs.



Legenda: (M) = standardni označevalec DNA velikosti, (1\*) = vzorec iz reje A, (2\*\*) = vzorec iz reje B, (+) = pozitivna kontrola (sev Loth bakterije *Chlamydia psittaci*), (-) = negativna kontrola (voda UltraPure<sup>TM</sup>).

Legend: (M) = standard DNA size marker, (1 \*) = sample of flock A, (2 \*\*) = sample of flock B, (+) = positive control (*Chlamydia psittaci* strain of Loth), (-) = negative control (water UltraPure<sup>TM</sup>).

**Slika 19:** Primer MLVA metode: elektroforetska ločitev produktov pomnoževanja z metodo PCR in določitev tandemskih ponovitev posameznemu lokusu pri vzorcih iz dveh rej pasemskih golobov.

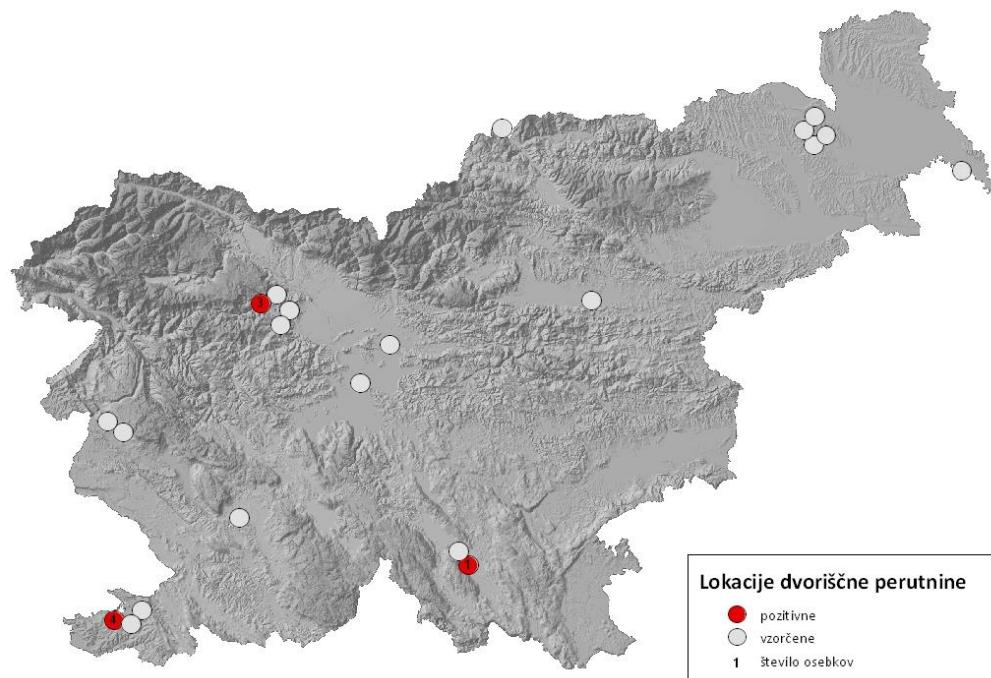
**Figure 19:** Example of MLVA method: electrophoretic separation of the amplification products by PCR assay and the determination of each tandem repeats on individual locus in samples from two flocks of breed pigeons.

## 4.5 Dvoriščna perutnina

Za ugotavljanje okužb dvoriščne perutnine z bakterijami iz družine Chlamydiaceae, smo brise žrela in brise kloake 252 ptic preiskali z molekularnimi metodami ter serume 50 ptic z metodo IIF.

### 4.5.1 Ugotavljanje okužbe ptic z bakterijami iz družine Chlamydiaceae z molekularnimi metodami

Med vsemi preiskanimi pticami smo odsek gena 23S rRNA, značilen za bakterije iz družine Chlamydiaceae, z metodo PCR v realnem času dokazali pri 8 (3,2 %) pticah na treh različnih lokacijah na območju Slovenije (slika 20). Tarčno nukleinsko kislino smo dokazali pri 6 kokoših od 148 pregledanih (4,1 %), enem puranu od 15 pregledanih (6,7 %) in enem fazanu od treh pregledanih (33,3 %). Ostale preiskane ptice so bile negativne.



**Slika 20:** Lokacije dvoriščne perutnine in število osebkov, pozitivnih na bakterije iz družine Chlamydiaceae.

**Figure 20:** Locations of backyard poultry and the number of specimens positive for bacteria of the family Chlamydiaceae.

Z začetnimi nukleotidi, specifičnimi za gen *ompA* *C. psittaci*, smo pomnoževali le tiste molekule DNA, ki so bile z metodo PCR v realnem času pozitivne na odsek gena 23S rRNA, značilen za bakterije iz družine Chlamydiaceae. Pri testiranih vzorcih dvoriščne perutnine nismo dokazali odseka gena *ompA* *C. psittaci*. Nadalje smo z metodo PCR v realnem času pri izbranih vzorcih želeli ugotoviti odsek gena na 16S rRNA, značilen za ACC. Med preiskanimi vzorci 8 ptic smo tarčno nukleinsko kislino dokazali pri 6 kokoših in enem puranu. Preiskani vzorec fazana je bil negativen in smo ga nadalje testirali z metodo PCR v realnem času tudi za gen *incA* *C. psittaci*. Tarčne DNA nismo dokazali (tabela 18).

Pri analiziranju nukleotidnega zaporedja odseka gena 23S rRNA in primerjavi z nukleotidnim zaporedjem seva *C. psittaci* 84/55 smo odkrili razliko na treh mestih pri kokošji in puranji DNA ter na petih mestih pri fazanji DNA (slika 21). Identičnost nukleotidnega zaporedja kokošje in puranje 23S rRNA s sevom *C. psittaci* 84/55 je bila 97,1%. Nukleotidno zaporedje fazanje DNA s primerljivim referenčnim sevom je bilo identično le 95,3%.

	550	560	570	580	590	600	610	620	630	640
Species/Abbrv										
1. <i>C.psittaci</i> NJ11	CTGAAACCAGTAGCTTATAACCGGTCGAAGACCTATAAACCTTCTAGGAAGCTCATGGTTGACGGCGTGCCTTTGCATGATGAGCCAGGGAGTTAAGTTAACGGCGA									
2. D-KP kokoš (2)	CTGAAACCAGTAGCTTATAACCGGTCGAAGACCTATAAACCTTCTCGGAAGCCATGGTTGACGGCGTGCCTTTGCATGATGAGCCAGGGAGTTAAGTTAACGGCGA									
3. D-KR kokoš (1)	CTGAAACCAGTAGCTTATAACCGGTCGAAGACCTATAAACCTTCTCGGAAGCCATGGTTGACGGCGTGCCTTTGCATGATGAGCCAGGGAGTTAAGTTAACGGCGA									
4. D-KP puran (1)	CTGAAACCAGTAGCTTATAACCGGTCGAAGACCTATAAACCTTCTCGGAAGCCATGGTTGACGGCGTGCCTTTGCATGATGAGCCAGGGAGTTAAGTTAACGGCGA									
5. D-KD fazan (1)	CTGAAACCAGTAGCTTATAACCGGTCGAAGACCTATAAACCTTCTCGGAAGCCATGGTTGACGGCGTGCCTTTGCATGATGAGCCAGGGAGTTAAGTTAACGGCGA									

**Slika 21:** Poravnavo nukleotidnih zaporedij v odseku tarčnega gena 23S rRNA, značilnem za bakterije iz družine Chlamydiaceae. Primerjava med sevom bakterije *Chlamydia psittaci* 84/55 (CP003790) in vzorci dvoriščne perutnine: kokoši (dve z območja Kopra in ena iz Kranja), puran (z območja Kopra) in fazan (z območja Kočevja).

**Figure 21:** Aligning of the nucleotid sequences in the region of targe 23S rRNA gene specific for bacteria belonging to the family Chlamydiaceae. Comparison between strain of *Chlamydia psittaci* 84/55 (CP003790) and patterns of backyard poultry: hens (two from the area Koper and one from Kranj), turkey (from the area of Koper) and pheasant (from the area Kočevje).

**Tabela 18:** Pozitivni rezultati molekularnih preiskav pri posamezni ptici dvoriščne perutnine.**Table 18:** Positive results of molecular tests for individual bird from a flock of backyard poultry.

Slovensko ime	Oznaka vzorca	PCR v realnem času							
		Chlamydiaceae (vrednost Ct)		ompA <i>C. psittaci</i> (vrednost Ct)		incA <i>C. psittaci</i> (vrednost Ct)		16S rRNA <i>C. chicken*</i> (vrednost Ct)	
		F	K	F	K	F	K	F	K
kokoš	KP-B1	ng	28,4	/	ng	/	/	/	31,62
kokoš	KP-B2	29,99	24,18	ng	ng	/	/	35,03	27,82
kokoš	KP-B5	ng	27,94	/	ng	/	/	/	32,59
kokoš	KR-22	37,42	35,28	ng	ng	/	/	38,82	38,65
kokoš	KR-25	35,64	35,5	ng	ng	/	/	38,45	37,46
kokoš	KR-32	ng	28,99	/	ng	/	/	/	28,43
puran	KP-B6	35,44	ng	ng	/	/	/	38,55	/
fazan	KO-11	ng	29,3	/	ng	/	ng	/	ng

Legenda: (F) = bris žrela, (K) = bris kloake, (ng) = negativno, (/) = preiskava ni bila izvedena, (\*) = atipična kokošja klamidija.

Legend: (F) = pharyngeal swab, (K) = cloacal swab, (ng) = negative (/) = investigation was not performed, (\*) = atypical chicken Chlamydiaceae.

#### 4.5.2 Ugotavljanje okužbe perutnine z bakterijami iz rodu *Chlamydia* z metodo IIF

Serume 40 kokoši, 6 domačih rac in 4 moškatnih bleščavk smo z metodo IIF preiskali na prisotnost specifičnih IgG protiteles proti bakterijam iz rodu *Chlamydia*. Vsi preiskani serumi so bili negativni.

#### 4.6 Perutnina intenzivne reje

Serume perutnine intenzivne reje smo preiskali z metodo IIF pri kokoših matične jate in piščancih brojlerjih na 6 farmah z različnih območij Slovenije. V posameznem hlevu smo v povprečju s serološkim testom pregledali 15 kokoši. Jati, v kateri smo dokazali okužbo z bakterijo iz rodu *Chlamydia*, smo naknadno odvzeli brise žrela in brise kloake ter jih preiskali z molekularnimi metodami.

#### 4.6.1 Ugotavljanje okužbe perutnine z bakterijami iz rodu *Chlamydia* z metodo IIF

Z metodo IIF smo pregledali vzorce serumov v 179 hlevih kokoši matičnih jat in v treh hlevih piščancev brojlerjev. Specifična protitelesa IgG proti bakteriji iz rodu *Chlamydia* smo dokazali pri kokoših matične jate, starih 23 tednov, na eni farmi (slika 22 in 23). Prevalenca protiteles IgG v posameznem hlevu je bila 70% (hlev A1), 20% (hlev A2), 90% (hlev A3) in 40% (hlev A4).

V dveh hlevih (A2 in A3) smo v serumih kokoši določili višino titra protiteles IgG 1:40 in v dveh hlevih 1:80 (A1 in A4), tabela 19. Ostali vzorci so bili negativni.

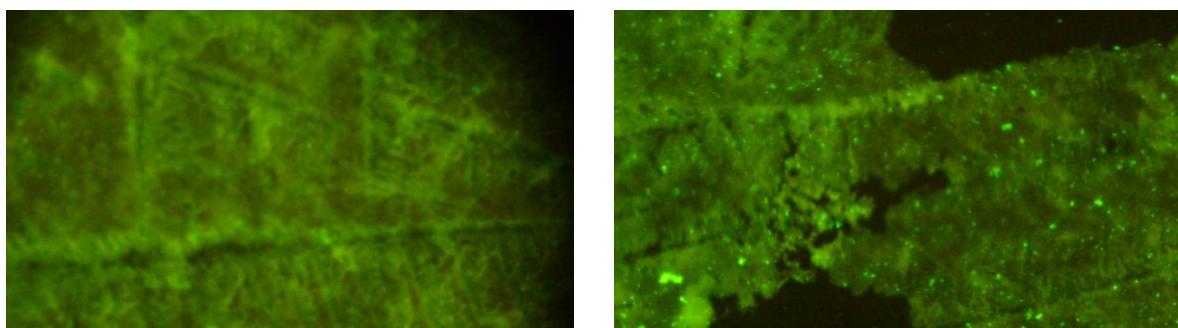
**Tabela 19:** Matična jata kokoši, pri kateri smo s posredno imunofluorescenco dokazali specifična protitelesa proti bakteriji iz rodu *Chlamydia* ter kokošim odvzeli brise žrela in brise kloake.

**Table 19:** Breeder poultry flock, with detected specific antibodies against bacteria of the genus *Chlamydia* by indirect immunofluorescence method and from which the pharyngeal and cloacal swabs were taken.

Intenzivna reja perutnine				IIF		Število vzorčenih ptic (bris žrela in bris kloake)
Oznaka farme	Kategorija	Starost	Oznaka hleva	% pozitivnih	Titer protiteles IgG proti <i>Chlamydia</i>	
A	matična jata	23 tednov	A1	70	1:80	10
			A2	20	1:40	10
			A3	90	1:40	10
			A4	40	1:80	10
			A5	ng	ng	10
<b>Σ</b>		<b>5 hlevov</b>	<b>4 hlevi</b>			<b>50 ptic</b>

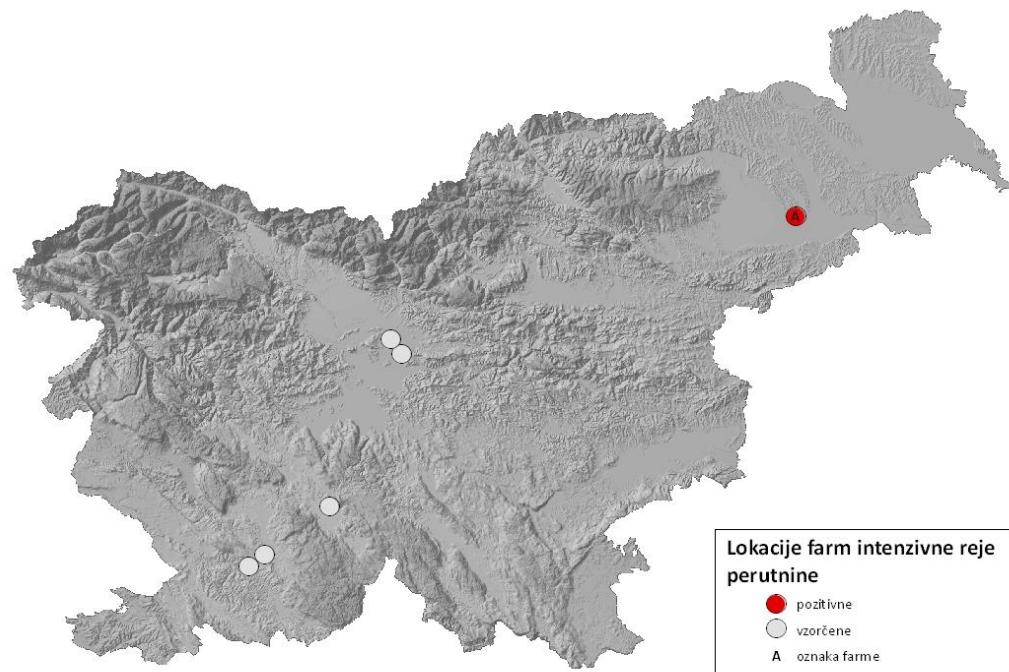
Legenda: (IIF) = posredna imunofluorescensa, (ng) = negativno, (Σ) = vsota.

Legend: (IIF) = indirect immunofluorescence, (ng) = negative, (Σ) = sum.



**Slika 22:** Fotografija posredne imunofluorescence negativnega seruma (levo) in pozitivnega seruma (desno) kokoši proti bakterijam iz rodu *Chlamydia* (povečava 1:400). Foto: Alenka Dovč.

**Figure 22:** Photo of indirect immunofluorescence of negative serum (left) and positive serum (right) of hens against the bacteria of the genus *Chlamydia* (magnification 1:400). Photo: Alenka Dovč.



**Slika 23:** Lokacije farm intenzivne reje perutnine, pozitivnih na specifična protitelesa IgG iz rodu *Chlamydia*.

**Figure 23:** Locations of intensive poultry production farms with a positive specific IgG antibody of the genus *Chlamydia*.

#### 4.6.2 Ugotavljanje okužbe perutnine z bakterijami iz družine Chlamydiaceae z molekularnimi metodami

Kokošim matične jate, pri katerih smo dokazali specifična IgG protitelesa proti klamidijam, smo odvzeli brise žrela in brise kloake. Zaradi velikega števila vzorcev smo brise združevali, kot je opisano v poglavju 3.2.1.1. Združene brise smo obravnavali kot posamezen vzorec. Z metodo PCR v realnem času smo pomnoževali odsek gena 23S rRNA družine Chlamydiaceae. Okužbo smo dokazali v vseh petih pregledanih hlevih (tabela 20).

Pri vzorcih, ki so bili pozitivni na gen družine Chlamydiaceae, smo z metodo PCR v realnem času pomnoževali gen *ompA C. psittaci*. Vsi preiskani vzorci so bili negativni.

Nadalje smo za dokaz gena 16S rRNA, značilnega za ACC, od 27 vzorcev izbrali 19 vzorcev glede na pregled vseh preiskovanih hlevov perutnine. Tarčni gen 16S rRNA ACC smo dokazali v vseh petih preiskanih hlevih matične jate kokoši (tabela 20).

V analizo nukleotidnega zaporedja 23S rRNA smo vključili pet vzorcev. Posamezen vzorec je izviral iz različnega preiskovanega hleva. Pri analizi nukleotidnega zaporedja odseka gena 23S rRNA smo ugotovili, da se pri kokoših v zaporedju nukleotidov pojavljajo razlike na treh mestih v primerjavi z nukleotidnim zaporedjem seva *C. psittaci* 84/55, glej sliko 24. V vseh petih hlevih je bila identičnost nukleotidnega zaporedja med kokošjimi in sevom *C. psittaci* 84/55 97,1%.

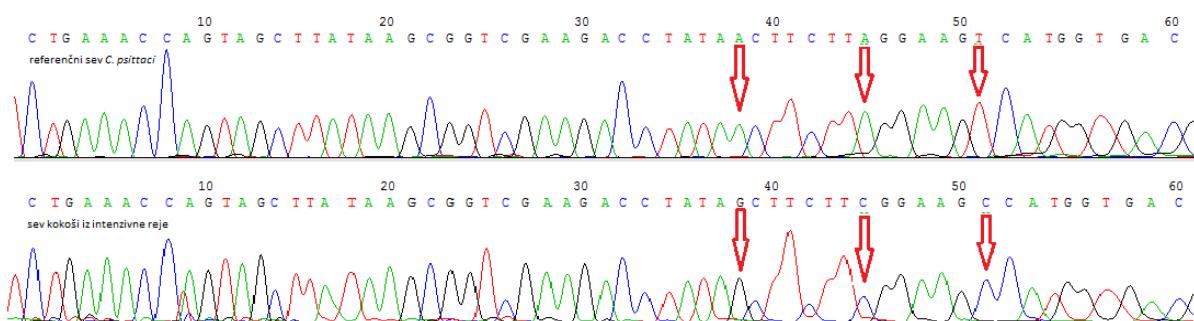
**Tabela 20:** Rezultati molekularnih preiskav pri matični jatah kokoši.

**Table 20:** The results of molecular investigations in breed flocks.

Oznaka hleva	Število preiskanih ptic	PCR v realnem času		
		23S rRNA Chlamydiaceae	<i>ompA</i> <i>C. psittaci</i>	16S rRNA <i>C. chicken</i> *
A1	10	+	ng	+
A2	10	+	ng	+
A3	10	+	ng	+
A4	10	+	ng	+
A5	10	+	ng	+

Legenda: (+) = pozitivno, (ng) = negativno, (\*) = atipična kokošja klamidija.

Legend: (+) = positive, (ng) = negative, (\*) = atypical chicken Chlamydiaceae.



**Slika 24:** Primerjava dveh kromatogramov nukleotidnih zaporedij referenčnega seva bakterije *C. psittaci* s sevom, izoliranim iz vzorca kokoši. Prikazana sta zapisa z odseka gena 23S rRNA, značilnega za bakterije iz družine Chlamydiaceae. Označena so mesta, na katerih se nukleotidna zaporedja med seboj razlikujejo.

**Figure 24:** Comparison of two chromatograms of genome sequences of the reference strain of *C. psittaci* with the strain isolated from a hen sample. The regions of the 23S rRNA gene specific for bacteria belonging to the family Chlamydiaceae are shown. The sites on which the nucleotide sequences differ are marked.

#### 4.7 Vzorci ptic z dokazano okužbo s *Chlamydia psittaci* v predhodnih raziskavah

V naši raziskavi smo ponovno pregledali različne vrste vzorcev ptic, ki so imeli dokazano okužbo s *C. psittaci* v predhodnih raziskavah v Sloveniji. Z molekularnimi metodami smo preiskali vzorce 33 ptic.

Z metodo PCR v realnem času smo pri 23 (69,7 %) pregledanih vzorcih ptic uspeli pomnožiti odsek gena 23S rRNA Chlamydiaceae, in sicer pri štirih skobčevkah od 6 pregledanih (66,7 %), 11 nimfah od 12 (91,8 %), treh agapornisih od 4 (75 %), treh prostozivečih golobih od 4 (75 %), eni amazonki od 2 (50 %) in edinemu testiranemu velikemu aleksandru. Nadalje smo vzorce, pozitivne na gen 23S rRNA družine Chlamydiaceae, testirali z metodo PCR v realnem času na gen *ompA* *C. psittaci*. Okužbo s *C. psittaci* smo dokazali pri vseh preiskanih vzorcih. Z metodo MLVA smo genotipizirali specifičen odsek DNA za gen *ompA* *C. psittaci*. Okužbo z genotipom A smo dokazali pri 11 nimfah, 4 skobčevkah, 3 agapornisih, velikem aleksandru in amazonki. Z genotipom B so bili okuženi 4 prostoziveči golobi (tabela 21).

Pri poravnaji nukleotidnega zaporedja odseka 23S rRNA družine Chlamydiaceae smo določili 100% identičnost z referenčnim sevom bakterije *C. psittaci* 84/55 pri vseh 23 vzorcih.

**Tabela 21:** Pozitivni rezultati molekularnih preiskav vzorcev ptic, ki so bile pozitivne na bakterijo *Chlamydia psittaci* v predhodnih raziskavah v Sloveniji.

**Table 21:** Positive results of molecular investigations of samples of birds positive for *Chlamydia psittaci* in the previous research in Slovenia.

Slovensko ime	Oznaka vzorca	Vzorec	PCR v realnem času		MLVA <i>C. psittaci</i>			Predhodno opravljene diagnostične preiskave		
			Chlamydiaceae (vrednost Ct)	<i>ompA C. psittaci</i> (vrednost Ct)	številčna koda	profil	geno tip	PCR	IIF/DIF	CW
skobčevka	SI-8	organi	26,01	28,28	2 6 2 4 6 4 3 3	12	A	+	+	+
skobčevka	SI-13	jetra	20,66	22,53	2 6 2 4 6 4 3 3	12	A	+	/	/
skobčevka	SI-29	organi	26,22	27,91	2 6 2 4 6 4 3 3	12	A	+	+	/
skobčevka	SI-40	organi	18,57	21,22	2 6 2 4 6 4 3 3	12	A	+	ng	+
nimfa	SI-1	bris kloake	22,73	25,35	2 6 2 4 6 4 3 3	12	A	+	+	+
nimfa	SI-9	embrio-izolat 3	19,17	22,13	2 6 2 4 6 4 3 3	12	A	+	+	+
nimfa	SI-16	srce	17,28	18,7	2 6 2 4 6 4 3 3	12	A	+	/	/
nimfa	SI-22	jetra, vranica	30,51	29,67	2 6 2 4 6 4 3 3	12	A	+	/	+
nimfa	SI-24	zračne vrečke	17,42	19,25	2 6 2 4 6 4 3 3	12	A	+	+	/
nimfa	SI-26	organi	32,99	35,14	2 6 2 4 6 4 3 3	12	A	+	+	/
nimfa	SI-27	vranica	18,65	23,28	2 6 2 4 6 4 3 3	12	A	+	+	/
nimfa	SI-37	organi	29,65	31,76	2 6 2 4 6 4 3 3	12	A	+	+	+
nimfa	SI-31	prebavila	17,99	19,72	2 6 2 4 6 4 3 3	12	A	+	+	/
nimfa	SI-32	organi	36,51	35,61	2 6 2 4 6 4 3 3	12	A	+	+	/
nimfa	SI-38	organi	31,01	34,01	2 6 2 4 6 4 3 3	12	A	+	+	+
vel. aleksander	SI-10	jetra	19,79	22,48	2 6 2 4 6 4 3 3	12	A	+	ng	/
agapornis	SI-21	kri	24,3	25,94	2 6 2 4 6 4 3 3	12	A	+	+	/
agapornis	SI-5	zračne vrečke	21,4	24,01	2 6 2 4 6 4 3 3	12	A	+	+	+
agapornis	SI-18	organi	18,51	22,38	2 6 2 4 6 4 3 3	12	A	+	+	+
amazonka	SI-19	prebavila	16,05	17,83	2 6 2 4 6 4 3 3	12	A	+	/	/
domači golob	SI-6	embrio-izolat	23,08	25,47	2 2 1 4 6 3 3 4	7	B	+	+	+
domači golob	SI-14	embrio-izolat	17,54	19,99	2 2 1 4 6 3 3 4	7	B	+	+	+
domači golob	SI-25	organi	15,31	16,21	2 2 1 4 6 3 3 4	7	B	+	+	+

Legenda: (+) = pozitivno, (ng) = negativno, (/) = preiskava ni bila izvedena, (PCR) = verižna reakcija s polimerazo, (IIF) = posredna imunofluorescenca, (DIF) = neposredna imunofluorescenca, (CW) = hitri imunokromatografski test (Clearview® Chlamydia MF).

Legend: (+) = positive, (ng) = negative, (/) = investigation was not performed, (PCR) = polymerase chain reaction, (IIF) = indirect immunofluorescence, (DIF) = direct immunofluorescence, (CW) = immunochromatographic test (Clearview® Chlamydia MF).

#### **4.8 Filogenetska analiza odseka na genu 23S rRNA, značilnem za bakterije iz družine Chlamydiaceae**

Z metodo PCR v realnem času, pri kateri smo uporabili začetna oligonukleotida Ch23S-F in Ch23S-R, smo uspešno pomnožili 110 bp dolgo območje na bakterijskem genu 23S rRNA družine Chlamydiaceae, pri 46 vzorcih od 50 (92,0 %). Pozitivne produkte smo opazovali z elektroforezo v agaroznem gelu. V analizo nukleotidnega zaporedja smo vključili vseh 46 vzorcev iz naše raziskave in 9 referenčnih sevov bakterij iz družine Chlamydiaceae. Na podlagi poravnav nukleotidnega zaporedja smo izdelali nekoreninjeno filogenetsko drevo po metodi Neighbour-joining s programom MEGA 5.0 (slika 26).

Ugotovili smo, da so sevi klamidij, dokazani v Sloveniji, razvrščeni v tri skupine. Prvo skupino sestavljajo sevi s 100% identičnostjo nukleotidnega zaporedja gena 23S rRNA s sevom *C. psittaci* 84/55. Drugo skupino sestavljajo sevi, katerih identičnost je 100% s sevom bakterije *C. abortus* EBA (U76710). V tretjo skupino pa sodijo sevi, ki so identični sevu bakterije *C. abortus* EBA v 98,1 % in sevu bakterije *C. caviae* GPIC (U68451) v 96,2 %.



Legenda: (SI) = vzorci vključeni v predhodne raziskave, (PG) = reja pasemskega goloba, (SP) = sobne ptice, (PP) = prostoživeče ptice, (D-KP) = dvoriščna perutnina z območja Kopra, (D-KR) = dvoriščna perutnina z območja Kranja, (D-KO) = dvoriščna perutnina z območja Kočevja, (IP) = perutnina intenzivne reje.

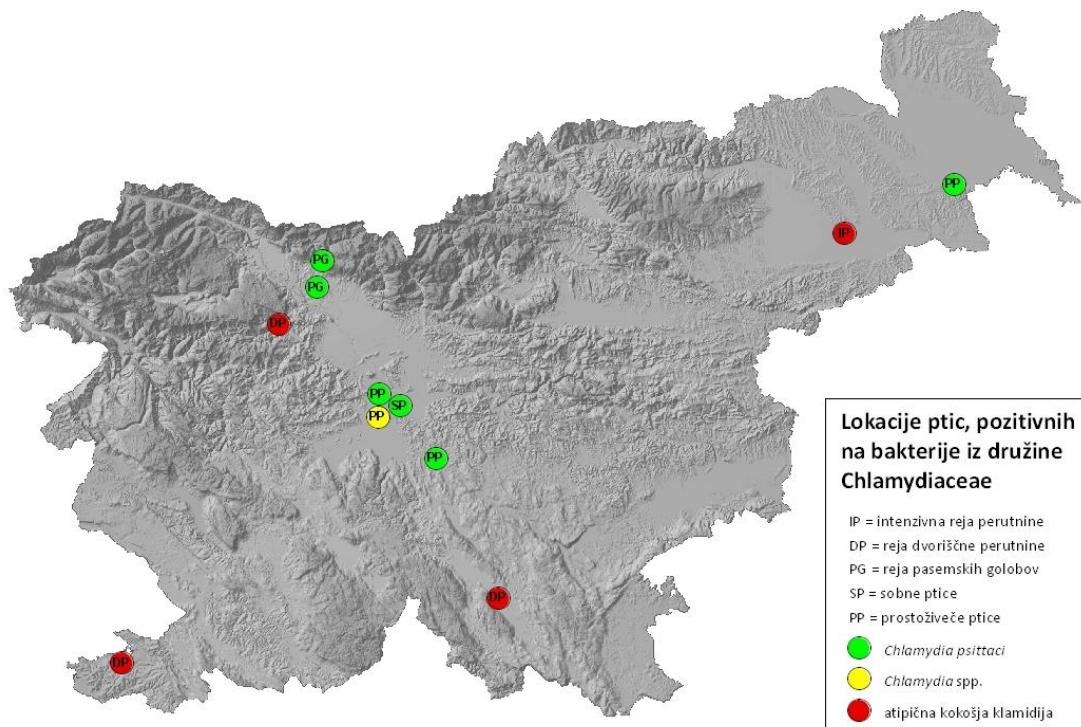
Legend: (SI) = samples included in the previous studies, (PG) = flock of breed pigeons, (SP) = cage birds, (PP) = wild birds, (D-CA) = backyard poultry in the area of Koper, (D-KR) = backyard poultry in the area of Kranj, (D-KO) = backyard poultry in the area of Kočevje, (IP) = poultry of intensive farming.

**Slika 25:** Filogenetsko drevo, izdelano z metodo Neighbour-joining s 1000 samovzorčenji, prikazuje sorodnosti med zaporedji nukleotidov na območju gena 23S rRNA značilnega za bakterije iz družine Chlamydiaceae. V primerjavo so zajeti vzorci naše raziskave ■ in referenčni sevi ■ klamidij. Številke v oklepaju podajajo število identičnih sekvenč pri imenovani vrsti ptice. Horizontalne dolžine vej drevesa odražajo različnost med primerjanimi zaporedji. Merilo je podano pod drevesom. Na razvejtvah so prikazane relativne podpore razvejitev, večje od 80 ter izražene v odstotkih.

**Figure 25:** The phylogenetic tree constructed by the Neighbour-Joining method with 1000 of self-sampling, showing the similarities between the sequences of nucleotides in the 23S rRNA gene specific to bacteria of the family Chlamydiaceae. In comparison the samples of our study ■ and reference strains of *Chlamydia* ■ are included. The number in parentheses gives the number of identical sequences of a known bird species. The horizontal length of the branches reflect the diversity of compared sequences. The criterion is given under the tree. On the branches relative branching supports greater than are shown, and expressed in percentages.

#### 4.9 Ugotovljene okužbe ptic z bakterijami iz družine Chlamydiaceae v Sloveniji

V naši raziskavi smo z molekularnimi metodami in metodo IIF ugotavljali okužbe ptic z bakterijami iz družine Chlamydiaceae. Lokacije ptic, pozitivnih na posamezno klamidijsko vrsto na območju Slovenije, so prikazane na sliki 26. V tabeli 22 so podani rezultati molekularnih preiskav in testa IIF za posamezno preiskano skupino ptic.



**Slika 26:** Lokacije ptic, pozitivnih na bakterije iz družine Chlamydiaceae.

**Figure 26:** Locations of positive birds for bacteria belonging to the family Chlamydiaceae.

**Tabela 22:** Rezultati molekularnih in seroloških preiskav ptic, vključenih v našo raziskavo.**Table 22:** The results of molecular and serological investigations of birds included in our study.

Skupina ptic (No)	Vrsta pozitivne ptice	No	PCR v realnem času No (+)				MLVA (C. p.)	Identičnost DNA za gen 23S rRNA Ch. s <i>C. psittaci</i> 84/55 (izraženo v %)	IIF ( <i>Chlamydia</i> titer protiteles)
			23S rRNA Ch.	ompA C.p.	incA C.p.	16S rRNA ACC			
PP (350)	mlakarica	121	6	0	6	/	C	100	/
	dom. golob	11	1	1	/	/	B	100	/
	siva vrana	7	3	0	0	0	/	99,0	/
SP (125)	skobčevka	44	1	1	/	/	A	100	1:40
	agapornis	12	2	2	/	/	B	100	/
PG (150)	golob	15*	2	2	/	/	B	100	/
DP (252)	kokoš	148	6	0	/	6	/	97,1	ng
	puran	15	1	0	/	1	/	97,1	/
	fazan	3	1	0	0	0	/	95,3	/
IP (50)	kokoš	5**	5	0	/	5	/	97,1	1:80
ZP (108)	ng	ng	0	/	/	/	/	/	0

Legenda: (PP) = prostoživeče ptice, (SP) = sobne ptice, (PG) = pasemske golobe, (DP) = dvoriščna perutnina, (IP) = perutnina intenzivne reje, (ZP) = ptice zоо parkov, (No) = število preiskanih ptic, (No +) = število pozitivnih ptic, (Ch) = Chlamydiaceae, (C.p.) = *Chlamydia psittaci*, (ng) = negativno, (/) = preiska ni bila izvedena, (\*) = število rej, (\*\*) = število hlevov.

Legend: (PP) = wild birds, (SP) = cage birds, (PG) = breed pigeons, (DP) = backyard poultry, (IP) = poultry of intensive farming, (ZP) = birds of zоо parks, (No) = number of investigated birds, (No +) = number of positive birds, (Ch) = Chlamydiaceae, (C.p.) = *Chlamydia psittaci*, (ng) = negative, (/) = investigation was not performed, (\*) = number of flocks, (\*\*) = number of houses.

#### 4. 10 Statistična analiza

S statistično analizo smo želeli ugotoviti značilno razliko med vrednostmi Ct iz brisov žrela in vrednostmi Ct iz brisov kloake ter na podlagi tega določiti primernejšo kužnino za ugotavljanje klamidijskih okužb ptic z molekularnimi metodami.

V statistično analizo smo vključili vrednosti Ct, ki smo jih pridobili z metodo PCR v realnem času za dokaz tarčne DNA za gen 23S rRNA družine Chlamydiaceae (tabela 23). S testom D'Agostin & Pearson smo ugotovili normalno razporeditev analiziranih vzorcev. Z neparnim t-testom smo dokazali statistično značilno razliko ( $p = 0,04$ ) med vrednostmi Ct pozitivnih vzorcev brisov žrela in vrednostmi Ct pozitivnih vzorcev brisov kloake. Povprečna vrednost Ct vzorcev brisov žrela je bila  $32,75 \pm 0,64$  ( $n = 16$ ), medtem ko je bila povprečna vrednost Ct vzorcev brisov kloake  $30,40 \pm 0,9$  ( $n = 15$ ).

**Tabela 23:** Vrednosti Ct vključene v statistično analizo.**Table 23:** Ct values included in the statistical analysis.

Skupina ptic	Vrsta ptice	Ugotavljanje DNA, značilne za bakterije iz družine Chlamydiaceae z metodo PCR v realnem času			
		Število pregledanih	Število pozitivnih	Vrednost Ct	
				Bris žrela	Bris kloake
PP	mlakarica	121	6	32,78	35,50
				34,40	33,98
				31,02	/
				34,14	/
				34,12	/
				29,77	/
	domači golob	11	1	/	30,23
	siva vrana	7	3	31,84	/
				32,27	/
				27,93	/
SP	skobčevka	44	1	34,75	27,02
	agapornis	12	2	30,30	32,97
				/	30,20
				32,15	29,49
PG	pasemske golobe	15	2	/	27,08
				29,99	24,18
DP	kokoš	148	6	37,42	35,28
				35,64	35,50
				/	28,40
				/	27,94
				/	28,99
	puran	15	1	35,44	/
	fazan	3	1	/	29,30
Povprečna vrednost				<b>32,75 ± 0,64</b>	<b>30,40 ± 0,9</b>
<b>Statistično značilna razlika (p &lt; 0,05)</b>				<b>p = 0,04</b>	

Legenda: (PP) = prostoživeče ptice, (SP) = sobne ptice, (PG) = reja pasemske golobe, (DP) = dvoriščna perutnina, (Ct) = število ciklov, (/) = Ct vrednost ni bila ugotovljena.

Legend: (PP) = wild birds, (SP) = cage birds, (PG) = flock of breed pigeons, (DP) = backyard poultry, (Ct) = number of cycles, (/) = Ct value has not been established.

## 5 RAZPRAVA

Bakterije iz družine Chlamydiaceae so pomembni patogeni za živali in ljudi. S kliničnega vidika je za ptice najbolj ključna *C. psittaci*, ki povzroča različna obolenja tudi pri sesalcih in plazilcih. Posebnost *C. psittaci* je, da pri pticah redko povzroči klinično zaznavno okužbo, kar omogoča obstanek in širjenje povzročitelja v populaciji in v okolico (Naglić in sod., 2005).

Začetki proučevanja prisotnosti klamidij pri pticah segajo v leto 1879, ko je Jacob Ritter predvideval, da se bakterija prenese na človeka od okuženih tropskih papig. To je bilo kmalu zatem, ko je Juergensen (leta 1874) prvi pri človeku opisal klinična znamenja značilna za okužbo s *C. psittaci* (Longbottom in Coulter, 2003; Rodolakis in Yousef Mohamad, 2010). Kasnejše raziskave pri pticah so pokazale izredno vrstno pestrost, številčnost in obsežno geografsko razporeditev okuženih ptic s *C. psittaci*. Poleg spoznavanja fenotipskih in genotipskih lastnosti *C. psittaci* ter raznovrstnosti njihovih gostiteljev so tovrstne raziskave pomembne za živali in za človeka tudi z epizootiološkega vidika (Corsaro in Venditti, 2004). Večina dosedanjih raziskav klamidijskih okužb pri pticah temelji na proučevanju *C. psittaci*. Dejansko vrstno pestrost klamidij pri pticah nakazujejo nedavne študije. Celovitejši vpogled v pestrost klamidijskih okužb pri pticah je omogočila šele uporaba ustreznih molekularnih tehnik, ki temeljijo na analizi genov 16S in 23S rRNA (Sachse in sod., 2012; Zocevic in sod., 2012).

V Sloveniji so sistematična proučevanja okužb s *C. psittaci* pri različnih vrstah ptic izvedli v letih od 1991 do 2001 (Dovč, 1998; Dovč in sod., 2005). V raziskavah je diagnostika temeljila predvsem na dokazovanju protiteles proti *C. psittaci* in antiga pri sobnih pticah, golobih in perutnini intenzivne reje. V našo raziskavo smo vključili več različnih skupin ptic, in sicer različne vrste prostoživečih ptic (plojkokljune, golobe, ujede, vpijate, plezalce in pevce) in ptic v ujetništvu (papige, pevce, pasemske golobe, dvoriščno perutnino in perutnino intenzivne reje).

Vzorce ptic smo pridobili na različne načine. Stres in možnost poškodovanja ptic smo s predhodno preverjenimi tehnikami odlova in odvzema vzorcev zmanjšali na minimum. Nobena ptica ni poginila ali bila kako drugače poškodovana zaradi ulova in vzorčenja za našo raziskavo. Prostoživeče ptice pevke in druge ptice manjših vrst smo ulovili z najlonskimi mrežami in jih nato vzorčili po sistemu, ki ga je v Sloveniji vzpostavil Račnik (Račnik, 2008). Labode grbce smo ulovili s pomočjo privabljanja s hrano in jim potem odvzeli vzorce. Vzorce prostoživečih mlakaric smo pridobili od lovcev po odstrelu v času lovne sezone. Ptice, oskrbljenim v Ambulanti za ptice, male sesalce in plazilce, in pticam v zoo parkih smo vzorce odvzeli med kliničnim pregledom. Pasemskim golobom, dvoriščni perutnini in perutnini intenzivne reje na različnih območjih Slovenije smo vzorce odvzeli z neposrednim prijemom ptice. Skupno smo v preiskavo vključili 73 vrst ptic, razvrščenih v 10 redov.

Rezultati preiskav so odvisni od izbrane diagnostične metode in ustreznosti odvzema preiskovanega materiala. Za dokazovanje protiteles proti bakterijam iz rodu *Chlamydia* smo odvzeli kri le pticam v dobri telesni kondiciji. Klinično zdravim pticam lahko za diagnostične preiskave varno odvzamemo 1 % krvi glede na njihovo telesno maso (Campbell in Ellis, 2007).

Za molekularne preiskave smo posamezni ptici odvzeli bris žrela in bris kloake, saj se klamidije iz organizma gostitelja najpogosteje izločajo preko izločkov dihal in prebavil. Ker so klamidije znotrajcelične bakterije, je potrebno pri odvzemuh brisa zajeti tudi epitelne celice (Keše in sod., 1999). Ptice smo vzorce odvzeli pred začetkom morebitne terapije z antibiotikom, saj le-ti zmanjšajo izločanje bakterij iz organizma gostitelja in vplivajo tudi na zmanjšan imunski odziv (Billington, 2005).

Za neposredno dokazovanje okužbe s *C. psittaci* pri živi ptici so ugotovili, da je primernejše kužnino pridobiti z odvzemom brisa žrela kot z odvzemom brisa kloake (Van Loock in sod., 2005). Prav tako je Andersen (1996) v svoji študiji primerjal delež pozitivnih rezultatov izolacije bakterije *C. psittaci* na celični kulturi iz brisov žrela, brisov kloake in iztrebkov okuženih ptic. Ugotovil je, da so pri živih pticah brisi žrela najprimernejša kužnina za dokaz okužbe s *C. psittaci* (Andersen, 1996).

V naši raziskavi pa smo s statistično značilno razliko ( $p < 0,05$ ) pri analizi vrednosti Ct tarčne DNA, značilne za družino Chlamydiaceae, ugotovili, da je za ugotavljanje klamidijskih okužb pri pticah z molekularnimi metodami bris kloake primernejša kužnina od brisa žrela. Iz povprečne vrednosti Ct je razvidno, da so vrednosti nekoliko nižje pri brisih kloake ( $30,40 \pm 0,9$ ) v primerjavi z brisi žrela ( $32,75 \pm 0,64$ ), kar pomeni, da je v preiskovanem vzorcu večja količina tarčne nukleinske kisline. Ker smo med brisi žrela in brisi kloake dokazali šibko statistično značilno razliko ( $p = 0,04$ ), menimo, da je za ugotavljanje klamidijske okužbe pri posamezni ptici pomembno preiskati tako bris žrela kakor tudi bris kloake. Odvzete vzorce je priporočljivo hraniti v transportnem gojišču, še posebej, kadar želimo povzročitelja dokazati z izolacijo bakterije. Če za diagnostiko uporabljam le molekularne metode za dokazovanje klamidijske DNA, pa transportno gojišče za shranjevanje brisov ni nujno potrebno (Marhold in sod., 2009).

Diagnostika *C. psittaci* je težavna, saj jih zaradi znotrajceličnega načina življenja ne moremo gojiti na standardnih gojiščih za bakterije. Razmnožujemo jih lahko v celičnih kulturah, kokošjih embrijih in laboratorijskih živalih. V gostiteljskih celicah ali zunaj njih jih lahko vidimo z mikroskopom šele po specifičnem barvanju. Glavni razlog za manjšo uporabnost klasičnih diagnostičnih metod za ugotavljanje klamidijskih okužb je dolgotrajni postopek. Danes so v ospredju molekularne metode, ki v diagnostiki klamidij predstavljajo neprecenljivo orodje. Omogočajo hitrejšo diagnostiko in manjše možnosti okužb laboratorijskega osebja s klamidijami kot pri direktnem dokazu povzročitelja v tkivnih kulturah (Yang in sod., 2002). Visoko občutljive in specifične metode za dokazovanje klamidijskih okužb so metode PCR (Higuchi in sod., 1993). V naši raziskavi smo za ugotavljanje okužb ptic z bakterijami iz družine Chlamydiaceae uporabljali metodo PCR v realnem času, ob uporabi specifičnih začetnih oligonukleotidov in sond (Ehricht in sod., 2006; Pantchev in sod., 2009). Visoka občutljivost metode je lahko tudi slabost, če je ne izvajamo pod predpisanimi pogoji. Lažno pozitivne rezultate lahko dobimo pri navzkrižnih kontaminacijah med pripravo vzorcev za reakcijo PCR. Da smo tekom raziskave izključili lažno pozitivne vzorce, smo pri vsaki PCR reakciji uporabljali negativne kontrole in vzorce z visokimi vrednostmi Ct ponovno preiskali.

S sekvenčno analizo pomnoženega odseka gena 23S rRNA, specifičnega za bakterije iz družine Chlamydiaceae, so nedavno potrdili okužbe ptic še z drugimi vrstami klamidij (Herrmann in sod., 2000; Lemus in sod., 2010; Sachse in sod., 2012). Zato smo izvedli analizo nukleotidnega zaporedja na omenjenem odseku gena pri naših vzorcih. Za genotipizacijo *C. psittaci* smo izbrali metodo MLVA. Metoda je enostavna in zagotavlja dobro ločljivost med genotipi bakterije *C. psittaci* (Laroucau in sod., 2008).

S serološkim testiranjem smo okužbe ptic s klamidijami dokazovali tudi posredno. Za dokazovanje specifičnih IgG protiteles proti bakterijam iz rodu *Chlamydia* v serumu ptic smo uporabili metodo IIF. Metoda je hitra, visoko specifična in občutljiva (Dovč, 1998). Ker je ocena rezultatov subjektivna, je pomembno, da metodo izvaja oseba z izkušnjami (Dovč, 1998; Keše in sod., 2002; Avšič Županc, 2002; Račnik, 2008). Dokaz specifičnih protiteles lahko nakazuje na okužbo s klamidijami v preteklosti. Za boljšo interpretacijo rezultatov seroloških metod se priporoča testiranje parnih serumov iste živali oziroma nadgradnja serološke diagnostike z molekularnimi preiskavami.

Zaradi večje preglednosti in lažje interpretacije rezultatov smo preiskane ptice razvrstili na prostoživeče ptice in ptice v ujetništvu.

### **5.1. Prostoživeče ptice**

V literaturi zasledimo, da prostoživeče ptice prenašajo mnoge virusne, bakterijske, glivične ter parazitarne povzročitelje bolezni in so lahko vir okužb za druge prostoživeče živali ter domače živali in človeka (Račnik, 2008). Ptice so razvile izjemno učinkovit način premagovanja velikih razdalj in med vretenčarji predstavljajo najbolj mobilno skupino organizmov. Selitve v ekologiji pomenijo množične, usmerjene in usklajene premike organizmov. Vrste, ki se selijo, se prej ali slej vračajo na izhodiščno točko. Zaradi velikih razdalj, ki jih ptice preletijo, so selivci pomemben ekološki most med oddaljenimi kraji (Vrezec in sod., 2005). Selitev ptic in možnost premagovanja velikih razdalj z letom je izjemen biološki fenomen, a hkrati pomemben epizootiološki dejavnik.

Ptice se med selitvijo zaradi telesne izčrpanosti ustavlajo. Med posameznimi postanki se združujejo v skupine, v katerih se srečujejo z različnimi vrstami ptic. Nekatere med selivkami so zaradi velikega telesnega napora in pomanjkanje hrane oslabele in shujšane, kar dodatno oslabi imunski sistem. Ob posameznih postankih med selitvijo in na koncu selitve je možnost prenosa povzročiteljev bolezni med pticami zelo velika (Weber in Stilianakis, 2007). Na možnost prenosa povzročitelja bolezni med pticami najpogosteje vplivajo: populacijska gostota ptic, raznolikost ptičjih vrst, vrstna dovetnost in občutljivost ptice na povzročitelja bolezni, interakcije med različnimi vrstami ptic in pogoji v okolju (Jourdain in sod., 2007; Račnik, 2008).

V splošnem se evropske selivke selijo po štirih selitvenih poteh. Slovenija ima glede tega poseben zemljepisni položaj, saj leži na križišču kar treh selilnih poti, to pa se odraža tako pri številu kakor pestrosti ptičjih vrst. V Sloveniji imamo registriranih 388 vrst ptic, od tega se jih 291 pojavlja bolj ali manj redno. Različne vrste ptic pri nas gnezdio, prezimujejo ali se začasno ustavijo na svoji selitveni poti. Vrst stalnic, ki se ne selijo in skozi leto ostanejo v bližini gnezdišč ali se pozimi klatijo po bližnji okolini, je pri nas 21 %. Ostale vrste prostoživečih ptic so selivke. Selitveno potovanje ptic se v enem letu odvije dvakrat. Spomladi, ko se ptice iz južnih krajev vračajo v severna gnezdišča, in jeseni, ko zopet letijo proti jugu na prezimovališča. Na splošno se spomladanska selitev začne februarja, ko se ptice odpravijo iz prezimovališč, враčati pa se nekatere vrste začnejo že v juliju. Slovenijo selitveni val zajame z zamikom; pri nas se odvija od konca marca do začetka junija z vrhom selitve v začetku aprila. Jesenska selitev traja približno štiri mesece od konca avgusta do začetka novembra (Vrezec in sod., 2005).

V našo raziskavo smo vključili 350 prostoživečih ptic, pripadajočim 31 različnih vrstam iz šestih redov: pevci (57,7 %), plojkokljuni (36,6 %), golobi (3,1 %), plezalci (1,4 %), ujede (0,9 %) in vpijati (0,3 %). Z molekularnimi metodami smo okužbo s klamidijami ugotovili pri 10 prostoživečih pticah (2,9 %), in sicer pri 6 mlakaricah od 121 (5,0 %), treh sivih vranah od 7 (42,9 %) in enem domačem golobu od 11 (9,1 %).

Z metodo PCR v realnem času smo pri posamezni ptici pomnoževali odsek gena 23S rRNA, značilnega za bakterije iz družine Chlamydiaceae. Pri vseh šestih na klamidijo pozitivnih mlakaricah smo prisotnost tarčne nukleinske kisline dokazali v brisu žrela, pri dveh pa tudi v brisu kloake. Nadalje smo diagnostično preiskavo pozitivnih vzorcev izvedli z metodo PCR v realnem času ob uporabi začetnih oligonukleotidov in sonde, s katerimi dokazujemo odsek genov *ompA* in *incA*, specifičnega za *C. psittaci*. Pri dokazovanju tarčne nukleinske kisline na genu *ompA* so bili vsi preiskovani vzorci negativni, medtem ko smo tarčni gen *incA* dokazali vsem šestim mlakaricam le v brisu žrela. To pojasnjujemo z dejstvom, da na občutljivost in specifičnost molekularnih metod vplivajo različni dejavniki. Najpomembnejši med njimi so: vrsta preiskovanega vzorca, količina bakterij v kužnini, način shranjevanja vzorca, metoda izolacije DNA, izbor začetnih oligonukleotidov in izbor diagnostične PCR metode (Berg in sod., 2003). Na rezultate lahko vpliva tudi večkratno zamrzovanje in odtaljevanje izolirane DNA, saj s tem povečamo možnost propadanja celokupne DNA v vzorcu, kar se odraža pri občutljivosti PCR metod (Tong in Sillis, 1993). Vzorci kloakalnih brisov in iztrebkov lahko vsebujejo visoke koncentracije inhibitorjev reakcije PCR kot so na primer pigmenti in sečna kislina. Lahko pa je v to-vrstnih vzorcih primarno že prisotna manjša količina tarčne nukleinske kisline (Pantchev in sod., 2009).

Prav tako smo z analizo nukleotidnega zaporedja odseka gena 23S rRNA družine Chlamydiaceae pri petih mlakaricah dokazali 100% identičnost s sevom *C. psittaci* 84/55. Nukleotidnega zaporedja zaradi neuspešnega pomnoževanja tarčnega odseka nismo uspeli določiti v vzorcu ene mlakarice. Pri vseh šestih mlakaricah smo z metodo MLVA dokazali okužbo s *C. psittaci* genotipa C. Pri plojkokljunih pticah so okužbe s *C. psittaci* možne z genotipom A, B, C in E/B, najpogosteje je bila okužba dokazana z genotipom C, kar je primerljivo z našimi rezultati (Geens in sod., 2005a). V letu 2007 so okužbo s *C. psittaci* pri mlakaricah ugotavljali v treh evropskih državah. Z metodo PCR so preiskali brise kloake oziroma iztrebke 103 mlakaric, in sicer vzorčenih v Sloveniji ( $n = 52$ ), Bosni in Hercegovini ( $n = 40$ ) in Makedoniji ( $n = 11$ ). Okužbo s *C. psittaci* so dokazali pri treh mlakaricah (2,9 %); pri eni iz Slovenije in dveh iz Bosne in Hercegovine (Dovč in sod., 2009).

Z našo raziskavo smo sicer ugotovili nekoliko višjo prevalenco okuženosti mlakaric s *C. psittaci*, verjetno zato, ker smo pri posamezni ptici preiskali bris žrela in bris kloake.

Zweifel in sodelavci (2009) so v Švici na okužbo s klamidijami pregledali 237 kloakalnih brisov plojkokljunov. Z metodo PCR v realnem času so nukleinsko kislino značilno za bakterije iz družine Chlamydiaceae, dokazali pri 19 pticah (8,0 %), in sicer pri 12 čopastih črnicah (*Aythya fuligula*) in 7 sivkah (*Aythya ferina*). Z nadaljnjiimi preiskavami okužbe s *C. psittaci* ali z drugo vrsto klamidij niso uspeli potrditi (Zweifel in sod., 2009). V našo raziskavo smo iz reda plojkokljunov vključili 121 mlakaric in 7 labodov grbcev. Pri slednjih klamidijskih okužb z metodo PCR v realnem času nismo dokazali. V literaturi redko zasledimo raziskave, ki bi ugotavljale klamidijske okužbe pri labodih. Pri labodu grbcu so do sedaj potrdili okužbo s *C. psittaci* serotipa C (Vanrompay in sod., 1993).

Pri prostoživečih golobih je najpogosteje dokazana klamidijska okužba s *C. psittaci* z genotipom B, kar je primerljivo z našimi rezultati. V naši raziskavi smo pregledali 11 prostoživečih golobov, ki so bili oskrbljeni v Ambulanti za ptice, male sesalce in plazilce. Pri enem golobu (9,1 %) smo z metodo PCR v realnem času dokazali okužbo z DNA bakterije *C. psittaci* v kloakalnem brisu. Okužbo s *C. psittaci* smo pri istem golobu potrdili še z analizo nukleotidnega zaporedja odseka gena 23S rRNA, značilnega za bakterije iz družine Chlamydiaceae. Z metodo MLVA smo dokazali okužbo s *C. psittaci* z genotipom B, ki je pri golobih tudi najpogosteje ugotovljen. Podatki v literaturi navajajo okužbe tudi z genotipi A, D, E in E/B (Dickx in sod., 2010). Prevalenca okužb s *C. psittaci* pri prostoživečih golobih se v študijah razlikuje, kar je predvsem odvisno od vrste vzorca, izbrane diagnostične metode, geografskega položaja in letnega časa vzorčenja. S serološkimi preiskavami so ugotovili prevalenco okužb s *C. psittaci* od 12,5% do 95,6%, z uporabo molekularnih metod pa od 3,4% do 52,6% (Dickx in sod., 2010). S serološkimi metodami lahko dokažemo tako aktivne okužbe ptic s *C. psittaci* kakor tudi okužbe iz preteklosti. Nasprotno pa z dokazom nukleinske kisline ugotovimo samo prisotnost patogena v kužnini. Z metodami PCR so okužbo s *C. psittaci* pri prostoživečih golobih dokazali v različnih evropskih mestih: 53 % v Madridu v letih 2006 in 2007 (Vázquez in sod., 2010), 50 % v Parizu v letih od 1999 do 2003 (Laroucau in sod., 2005) in 8 % v Amsterdamu v letu 2005 (Hedema in sod., 2005).

V Ljubljani je bila v letih 1991 in 1992 pri prostoživečih golobih s serološkimi testi ugotovljena 66,7% prevalenca protiteles proti *C. psittaci* (Dovč, 1998), v letu 2000 pa je bila prevalenca 23,7% (Dovč in sod., 2004). V letu 2008 so v Sloveniji z metodo vgnezditvene PCR reakcije pregledali kloakalne brise 86 prostoživečih golobov. V preiskovanih vzorcih so tarčno DNA za *C. psittaci* dokazali pri 7 golobih (8,1 %), (Verbančič, 2008), kar je primerljivo z našim rezultatom (9,1 %).

V nedavnih raziskavah so pri prostoživečih golobih z molekularnimi metodami dokazali okužbo tudi s *C. abortus*, *C. pecorum*, *C. trachomatis* in z bakterijo, ki je filogenetsko najbolj sorodna bakteriji ACC (Gasparini in sod., 2011; Sachse in sod., 2012).

Prenos klamidijskih okužb s prostoživečih golobov na pasemske golobe je pogost, saj težko nadziramo in preprečimo njihove medsebojne kontakte (Dovč, 1998). Med pasemskih golobi ( $n = 188$ ), ki smo jih vključili v našo raziskavo, smo okužbo s *C. psittaci* dokazali v dveh rejah od 15 (13,3 %) in pri treh golobih, pri katerih so okužbo s klamidijami že dokazali v predhodnih preiskavah. Z metodo MLVA smo dokazali okužbo s *C. psittaci* z genotipom B. Ostali vzorci pasemskih golobov, preiskanih na okužbo s klamidijami, so bili negativni. Naši rezultati so primerljivi s prevalenco okužbe pri pasemskih golobih, ki je bila predhodno ugotovljena v Sloveniji z metodo IIF. V letih od 1991 do 1997 so ugotovili klamidijska protitelesa IgG pri 29,9 % pasemskih golobov (Dovč, 1998). V Belgiji so leta 2008 z metodami PCR pregledali 32 rej pasemskih golobov in okužbo s *C. psittaci* dokazali pri 13 rejah (40,6 %). Pri štirih rejah (12,5 %) so dokazali prenos povzročitelja na človeka in sicer z genotipom D (Dickx in sod., 2010). Ugotovljeno visoko prevalenco klamidijske okužbe pri pasemskih golobih v njihovi raziskavi utemeljujemo z dejstvom, da preiskanih rej niso izbrali naključno, kot smo jih mi za našo raziskavo.

Med prostoživečimi pevci so klamidijske okužbe pogosto ugotovljene pri vrstah, ki so v neposredni bližini domovanj ljudi, najverjetneje zaradi pogostejše klinične obravnave teh ptic (Holzinger-Umlauf in sod., 1997). Tudi v naši raziskavi smo med 24 preiskanimi vrstami prostoživečih pevcev ugotovili okužbo s klamidijo pri sivi vrani, ki je v Sloveniji v zadnjem obdobju uspešno poselila urbano okolje (MKGP, 2011).

V našo raziskavo smo vključili 7 sivih vran, med katerimi smo pri treh z metodo PCR v realnem času dokazali tarčni gen bakterije iz družine Chlamydiaceae. Nadalje smo z metodo PCR v realnem času izključili okužbo s *C. psittaci* in okužbo z atipično kokošjo klamidijo. Z analizo nukleotidnega zaporedja odseka gena 23S rRNA družine Chlamydiaceae smo pri vseh treh vranah ugotovili 100% identičnost s sevom bakterije *C. abortus* EBA (U76710). Na podlagi dejstva, da smo med seboj primerjali le kratek nukleotidni segment (dolžine 106 baznih parov), bi bilo smotrno okužbo potrditi še z drugimi molekularnimi metodami. V literaturi so objave o dokazanih okužbah prostoživečih ptic s *C. abortus* redke. Leta 2000 so to okužbo objavili pri rjavi govnački (*Stercorarius antarcticus*), (Herrmann in sod., 2000). Nedavno so povzročitelja potrdili pri ujedah v Španiji (Lemus in sod., 2010) in enem prostoživečem golobu v Nemčiji (Sachse in sod., 2012). Naravni gostitelji *C. abortus* so drobnica, govedo, konji in prašiči, pri katerih povzroča splave. Je tudi zoonoza (Pannekoek in sod., 2010).

V Švici so s PCR v realnem času od 527 pregledanih prostoživečih ptic pevk okužbo z bakterijo iz družine Chlamydiaceae dokazali le pri eni ptici (0,2 %), katere vrste niso določili (Zweifel in sod., 2009). Prav tako so v Italiji z molekularno diagnostiko potrdili okužbo z bakterijo iz družine Chlamydiaceae pri dveh srakah (Rizzo in sod., 2012). Na Hrvaškem so pri pregledu 95 ptic pevk, pripadajočih štirim vrstam: poljska vrana ( $n = 88$ ), kavka ( $n = 3$ ), domači vrabec ( $n = 3$ ) in škorec ( $n = 1$ ), okužb s klamidijami niso potrdili (Vlahović in sod., 2004; Vlahović in sod., 2010). Prav tako okužb s klamidijami niso potrdili v Sloveniji leta 2007, ko so pregledali 90 pevcev, razvrščenih v 16 vrst (Dovč in sod., 2009). Na visoko prevalenco subkliničnih okužb pri prostoživečih pevcih z bakterijami iz rodu *Chlamydia* kažejo le posamezne študije (Colvile in sod., 2012). V Nemčiji so Holzinger in sodelavci (1997) klamidijsko okužbo z izolacijo na celični kulturi iz brisov žrela in brisov kloake dokazali pri 54 % od 399 pregledanih sinic, med njimi najpogosteje pri plavčkih (70 %), velikih sinicah (53 %) in močvirskih sinicah (38 %), (Holzinger-Umlauf in sod., 1997). V našo raziskavo smo iz družine sinic (*Paridae*) vključili dve vrsti: plavček ( $n = 8$ ) in močvirsko sinico ( $n = 2$ ), pri katerih v brisih žrela in brisih kloake okužbe s klamidijami nismo dokazali.

Prav tako z molekularnimi metodami nismo dokazali iskane nukleinske kisline, značilne za bakterije iz družine Chlamydiaceae, pri pticah iz redov ujed, vpijatov in plezalcev. Na podlagi podatkov iz literature menimo, da okužb pri teh pticah nismo uspeli ugotoviti predvsem zaradi nizkega števila preiskanih ptic, vključenih v našo raziskavo. Med ujedami so na Švedskem v letih 2006 in 2007 odvzeli kloakalne brise 191 belorepcem (*Haliaeetus albicilla*) in 108 sokolom selcem (*Falco peregrinus*) in jih z molekularnimi metodami pregledali na okužbo z bakterijo iz družine Chlamydiaceae. Bakterijo *C. psittaci* so dokazali pri štirih pticah od 299 pregledanih (1,3 %) in sicer pri dveh belorepcih in dveh sokolih selcih (Blomqvist in sod., 2012). V Španiji so na območju ekstenzivne reje ovac in goveda med 44 prostoživečimi postovkami (*Falco tinnunculus*) in 47 prostoživečimi južnimi postovkami (*Falco naumanni*) z molekularnimi in serološkimi metodami dokazali okužbo s *C. psittaci*, pa tudi s *C. abortus*, *C. muridarum* ter s *C. suis*. Prenos klamidijskih okužb s sesalcev na ptice v literaturi redko zasledimo. V omenjeni študiji domnevajo, da so se ujede s *C. abortus* okužile ob zaužitju okuženih ovac, s *C. muridarum* z zaužitjem okuženih glodavcev, medtem ko za okužbo s *C. suis* nimajo jasne razlage, saj bakterija praviloma povzroča okužbe le pri prašičih v intenzivni rejji. S to raziskavo so pri prostoživečih pticah prvič potrdili okužbo s *C. muridarum* in *C. suis* (Lemus in sod., 2010).

Pri vpijatih v literaturi zasledimo okužbo z bakterijo iz rodu *Chlamydia* le pri zlatovranki iz leta 1974 (Kaleta in Taday, 2003), medtem ko pri plezalcih navajajo okužbe z bakterijami iz rodu *Chlamydia* pri velikem detlu (*Dendrocopos major*), srednjem detlu (*Dendrocopus medius*), zeleni žolni (*Picus viridis*) in severnoamerški žolni vrste *Colaptes auratus* (Kaleta in Taday, 2003). V našo raziskavo smo iz reda vpijatov vključili le enega vodomca, iz reda plezalcev pa pet vijeglavk.

Za boljše razumevanje epidemiologije klamidijskih okužb pri prostoživečih pticah je pomembno poznavanje ekologije ptic. Živiljenjsko okolje ptic velikokrat predstavlja ključni dejavnik pri prenosu patogenov. Tudi vrsta hrane in način prehranjevanja posameznih vrst ptic lahko vpliva na pogostost okužb. Vsejede in mesojede ptice ter ptice, ki se hranijo z mrhovino, so pogosteje nosilci različnih vrst povzročiteljev bolezni kot ostale ptice (Hubalek in sod., 1995; Račnik, 2008).

Prostoživeče ptice, predvsem golobi, ki so razširjeni v kulturni krajni predstavljajo pomemben dejavnik pri prenosu klamidijskih okužb na domače živali in tudi na človeka (Harkinezhad in sod., 2009a).

## 5.2 Ptice v ujetništvu

Za ptice v ujetništvu je značilno, da so vzrejene v zaprtih, omejenih prostorih in niso vzete iz narave. Ugotavljanje okužb s klamidijami pri pticah v ujetništvu je pomembno predvsem zaradi možnega prenosa na ljudi, saj je človek s to vrstnimi pticami pogosto v tesnem kontaktu. V raziskavo smo vključili sobne ptice, ptice zoo parkov, pasemske golobe, dvoriščno perutnino in perutnino v intenzivni reji.

### 5.2.1 Perutnina

Dvoriščna perutnina in perutnina v intenzivni reji je najpogosteje gojena za proizvodnjo mesa in konzumnih jajc, posamezniki pa dvoriščno perutnino gojijo tudi zgolj ljubiteljsko. V našo preiskavo smo vključili 252 ptic dvoriščne perutnine, pripadajočih vrstam iz redu plojkokljunov in kur, in 6 farm kokoši intenzivne reje ter 89 ptic okrasne perutnine iz zoo parkov, pripadajočih vrstam iz redu veslonožcev, plojkokljunov in kur.

Pri perutnini v intenzivni reji smo klamidijske okužbe najprej ugotavliali s presejalnim testiranjem serumov kokoši z metodo IIF. Serološko smo preiskali 182 hlevov in sicer 179 hlevov kokoši matične jate in tri hlevi piščancev brojlerjev. V posameznem hlevu smo preiskali od 10 do 20 kokoši. Protitelesa IgG proti bakterijam iz rodu *Chlamydia* smo potrdili na eni farmi (16,7 %), in sicer v štirih hlevih kokoši matične jate (2,2 %) v najvišjim titrom 1:80. Nedavno so s serološko metodo ELISA preiskali jate kokoši v intenzivni reji tudi v Belgiji (30 farm) in v Franciji (10 farm). V Belgiji so okužbo s *C. psittaci* dokazali pri 96 % piščancev brojlerjev, 93 % kokoši matičnih jat ter 90 % kokoši nesnic, v Franciji pa pri 91 % piščancev brojlerjev (Yin in sod., 2012). V primerjavi z njihovimi rezultati je prevalenca klamidijskih protiteles v naši raziskavi zelo nizka, a je primerljiva z rezultati predhodne preiskave v Sloveniji. V letih od 1994 do 1997 so pri kokoših intenzivne reje v Sloveniji z metodo IIF dokazali 6,6% prevalenco klamidijskih protiteles v titru 1:40 in 1:80 (Dovč, 1998).

Pri dvoriščni perutnini smo z metodo IIF preiskali serume 40 kokoši, 6 domačih rac in štirih moškatnih bleščavk. Okužbe s klamidijami pri njih nismo ugotovili. V zoo parkih smo kri za serološke preiskave odvzeli 9 rožnatim pelikanom, 31 kokošim in 8 gosem. Vsi preiskani vzorci so bili na okužbo s klamidijami negativni.

Kokošim matične jate, pri katerih smo dokazali klamidijska protitelesa, smo za molekularno preiskavo v petih hlevih naknadno odvzeli še brise žrela in brise kloake. Vzorce brisov 50 kokoši intenzivne reje, 252 ptic perutnine dvoriščne reje in 89 ptic okrasne perutnine iz zoo parkov smo preiskali z metodo PCR v realnem času za dokaz okužbe z bakterijo iz družine Chlamydiaceae. Pozitivne reakcije smo potrdili v vseh petih hlevih kokoši matične jate in na dvoriščni perutnini pri šestih kokoših od 148 (4,1 %), enem puranu od 15 (6,7 %) in enem fazanu od treh (0,3 %). V naslednjem koraku smo pozitivne vzorce testirali še s PCR v realnem času za dokaz okužb s *C. psittaci*, vendar okužb nismo dokazali. Nadalje smo z metodo PCR v realnem času dokazali ACC pri vseh petih preiskanih hlevih kokoši v intenzivni reji in pri 6 kokoših (tri z območja Gorenjske in tri z območja Primorske) ter pri puranu (z območja Primorske) dvoriščne reje. Pri fazanu nismo dokazali okužbe s *C. psittaci* niti z ACC.

Z analizo nukleotidnih zaporedij na odseku gena 23S rRNA družine Chlamydiaceae smo pri kokoših iz petih hlevov intenzivne reje, pri puranu in kokoših dvoriščne perutnine ugotovili 97,1% identičnost z nukleotidnim zaporedjem seva *C. psittaci* 84/55. Identičnost nukleotidnega zaporedja fazanje 23S rRNA s sevom *C. psittaci* 84/55 je bila 95,3%. Pri poravnavi nukleotidnega zaporedja vzorca fazana smo ugotovili pet razlik v primerjavi s sevom *C. psittaci* 84/55 in dve razlike v primerjavi z vzorci kokoši ter purana. Na podlagi nukleotidne raznolikosti med vzorci fazana in kokoši sklepamo, da zaradi tega okužbe z ACC v vzorcu fazana nismo uspeli potrditi. Na podlagi rezultatov smo ugotovili, da je prevalenca okuženosti s klamidijami med dvoriščno perutnino v Sloveniji 3,2% (8 pozitivnih od 252 pregledanih). Pri dvoriščni perutnini smo dokazali okužbe z atipičnimi klamidijami. Prav tako smo okužbo z ACC dokazali na eni farmi intenzivne reje kokoši od šestih pregledanih (16,7 %).

V skladu z do sedaj poznanimi podatki v literaturi so okužbo z ACC potrdili le v intenzivni reji kokoši in puranov, in sicer še v Franciji, Grčiji, na Hrvaškem in na Kitajskem (Zocevic in sod., 2012). Za okužbo z bakterijo ACC pri perutnini je značilno, da poteka brez kliničnih znakov, kar je primerljivo z našimi ugotovitvami. Kokoši v intenzivni reji, pri katerih smo dokazali klamidijska protitelesa, so bile brez kliničnih znakov. Pomembno je tudi dejstvo, da so za atypično pljučnico obolevali delavci na farmah intenzivne reje kokoši, na katerih so pri kokoših potrdili okužbo z ACC. Na podlagi tega domnevajo, da ima se lahko okužba z ACC prenese s kokoši na človeka (Laroucau in sod., 2009; Zocevic in sod., 2012). Nedavno so v Franciji okužbo z izolatom, zelo podobnim bakteriji ACC, dokazali tudi pri prostoživečih golobih (Gasparini in sod., 2011). V literaturi do sedaj nismo zasledili podatkov o dokazu okužb z ACC pri dvoriščni perutnini.

Fazan, pri katerem smo dokazali klamidijsko okužbo, je bil brez kliničnih znakov, kakor tudi fazani, pri katerih so v Sloveniji med leti 1991 in 1997 z metodo IIF dokazali 28,2% prevalenco protiteles IgG proti bakterijam iz rodu *Chlamydia* v titru  $\leq 1:160$  (Dovč, 1998).

Menimo, da pri perutnini v zoo parkih nismo ugotovili okužbe s klamidijami predvsem zaradi rednega higienškega in veterinarskega nadzora. Tudi v literaturi redko zasledimo objave o, s klamidijami okuženih pticah, ki so bile pregledane v zoo parkih (McElnea in Cross, 1999). Prav tako redko zasledimo objavljene podatke o ugotavljanju okužb s klamidijami pri rožnatih pelikanih. V Južni Afriki so brise žrela in brise kloake odvzeli 50 rožnatim pelikanom v ujetništvu, vendar pri njih z molekularnimi metodami niso dokazali okužbe s *C. psittaci* (Machado, 2009).

### 5.2.2 Papige in pevci

Med ljubiteljsko gojenimi sobnimi pticami so okužbe s klamidijami najpogosteje dokazali pri papigah in pevcih. Na podlagi številnih študij so ugotovili, da papige v ujetništvu predstavljajo glavni vir okužb s *C. psittaci* za druge vrste ptic, živali in tudi človeka (Harkinezhad in sod., 2009b).

V našo raziskavo smo vključili 17 vrst papig. Vzorce smo odvzeli 112 sobnim papigam in 15 papigam v zoo parkih. Vsem pticam smo z molekularnimi metodami preiskali brise žrela in brise kloake, medtem ko smo za serološko preiskavo kri odvzeli 28 papigam. Okužbe papig s klamidijami iz zoo parkov nismo dokazali niti s serološkimi niti z molekularnimi metodami.

Z metodo PCR v realnem času smo dokazali okužbo z bakterijo iz družine Chlamydiaceae, in sicer s *C. psittaci* pri eni skobčevki od 44 (2,3 %) in pri dveh agapornisih od 12 (16,7 %). Pozitivne vzorce smo nadalje genotipizirali z metodo MLVA in dokazali okužbo s *C. psittaci* genotipa A pri skobčevki in okužbo z genotipom B pri obeh agapornisih, kar je primerljivo z objavljenimi podatki. Pri papigah so okužbe s *C. psittaci* dokazali z genotipi A, B, E (Mitchell in sod., 2009), E/B (Harkinezhad in sod., 2007) in F (Geens in sod., 2005a). Med njimi je najpogosteje dokazan genotip A (Geens in sod., 2005a).

V raziskavo smo vključili tudi vzorce papig, pri katerih so v predhodnih preiskavah z različnimi diagnostičnimi metodami dokazali okužbo s *C. psittaci*. Z MLVA smo v vzorcih 20 papig različnih vrst (nimfa, skobčevka, agapornis, veliki aleksander in amazonka) ugotovili okužbo s *C. psittaci* genotipa A. V naši raziskavi smo s testom PCR prvič dokazali okužbo z genotipom B pri agapornisu v Sloveniji. V literaturi smo zasledili podatke o okužbi agapornisov s *C. psittaci* genotipa A (Laroucau in sod., 2008) in genotipa E/B (Geens in sod., 2005b). Da bi izključili možnost okužbe agapornisov z genotipom E/B, bi bilo potrebno določiti še nukleotidno zaporedje na genu *ompA*, značilno za bakterijo *C. psittaci*.

Pri skobčevki smo 23S rRNA bakterije iz družine Chlamydiaceae potrdili v brisu žrela in kloake, medtem ko smo dokazali DNA *C. psittaci* le v brisu kloake. Na podlagi rezultatov sklepamo, da je bila količina DNA *C. psittaci* v brisu žrela pod mejo občutljivosti metode PCR v realnem času. Pri agapornisu s kliničnimi znaki apatičnosti, shujšanosti in otipljivo maso v trebušni votlini smo z molekularno diagnostiko potrdili tarčno DNA za bakterije iz družine Chlamydiaceae in *C. psittaci* v brisu žrela in kloake, medtem ko smo pri agapornisu brez kliničnih znakov potrdili *C. psittaci* le v kloakalnem brisu. Način izločanja bakterije v okolico je odvisen predvsem od načina okužbe (aerosolno ali zaužitje kontaminirane hrane) in patogenosti *C. psittaci* (Vanrompay in sod., 2007).

Na podlagi anamnestičnih podatkov lastnikov papig smo ugotovili, da sta bila okužena agapornisa v medsebojnem kontaktu že pred našo raziskavo (Marhold in sod., 2012).

S serološko metodo IIF smo dokazali protitelesa IgG v titru 1:40 proti bakteriji iz rodu *Chlamydia* pri eni skobčevki, pri kateri smo klamidijsko okužbo potrdili tudi z molekularno metodo. Za papige s titri do vrednosti 1:160 je značilno, da redko razvijejo klinične znake okužbe s *C. psittaci*. V našem primeru smo ob kliničnem pregledu skobčevke ugotovili shujšanost in apatičnost. Drugih kliničnih znakov, bolj značilnih za okužbo s klamidijami, nismo potrdili (Marhold in sod., 2012). Klinični znaki papig, okuženih s *C. psittaci*, so podobni znakom splošne sistemske okužbe. Pri oboleli ptici pogosto opazimo apatičnost, shujšanost, našopirjenost, vnetje očesne veznice s seroznim izcedkom, nosni izcedek in vodene zeleno rumene iztrebke (Smith in Campbell, 2010). Ker klinični znaki obolenja s *C. psittaci* niso patognomonični in izločanje patogena v okolico predstavlja visoko tveganje okužbe za ljudi, je laboratorijska diagnostika še posebej pomembna.

V Belgiji so v raziskavo ugotavljanja okužb papig s *C. psittaci* vključili 20 sivih papig, 16 ar in ljudi, ki so bili v tesnem kontaktu s preiskanimi pticami. Pri petih sivih papigah so opazili znake hujšanja, apatičnosti, našopirjenosti in občasno oteženo dihanje. Okužbo s *C. psittaci* so potrdili z vgnezditveno PCR metodo pri vseh petih sivih papigah s kliničnimi znaki ter v brisih žrela pri oskrbnikih ptic. V času odvzema vzorcev kloakalnih brisov in zdravljenja ptic so okužbo s *C. psittaci* potrdili tudi pri dveh veterinarskih delavcih z dokazom povišanega titra specifičnih protiteles (Harkinezhad in sod., 2007).

V Sloveniji so s sistematičnim spremeljanjem okužb s klamidijami pri papigah, v letih od 1991 do 1997 ugotovili protitelesa IgG proti *C. psittaci* pri 4,5 % skobčevk, 16,4 % nimf in srednje velikih papig ter pri 28,4 % papig velikih vrst (Dovč, 1998). Prenos okužbe s *C. psittaci* s papig na ljudi so dokazali pri sistematičnem spremeljanju klamidijskih okužb v reji skobčevk. Z metodo DIF so okužbo potrdili pri 7 pticah od 46 pregledanih (14,6 %) (Dovč in sod., 2007).

Možen razlog za nizko prevalenco (2,4 %) okužb papig s *C. psittaci* v naši raziskavi je, da smo vzorce odvzeli naključno izbranim pticam in je bila večina pregledanih ptic brez kliničnih znakov (Marhold in sod., 2012). Naši rezultati prevalence okužb so primerljivi z ugotovljeno prevalence okužb s klamidijami v predhodnih seroloških raziskavah (6,2 %) v Sloveniji pri papigah (Dovč in sod., 2005).

Za pevce v ujetništvu je značilno, da so manj dovetni za okužbe s klamidijami v primerjavi s papigami. Praviloma se ptice pevke v ujetništvu s *C. psittaci* okužijo od papig (Rodolakis in Yousef Mohamad 2010). Pri tipizaciji *C. psittaci* so okužbo pri pticah pevkah v ujetništvu najpogosteje ugotovili s tipom A (Laroucau in sod., 2008) in tipom B (Vanrompay in sod., 1993).

V našo raziskavo smo vključili 12 ptic pevk, štirih različnih vrst: kanarček ( $n = 6$ ), zebrica ( $n = 3$ ), rijevec ( $n = 1$ ) in indijski kos ( $n = 2$ ). Ob kliničnem pregledu smo jim odvzeli bris žrela in bris kloake. Z metodo PCR v realnem času smo v vzorcih dokazovali DNA bakterije iz družine Chlamydiaceae. Vsi preiskani vzorci so bili negativni. V Sloveniji so v letih od 1991 do 2001 s serološkimi metodami dokazali nizko prevalenco (0,8 %) okužb s klamidijami pri kanarčkih (Dovč in sod., 2005). Na splošno v literaturi zasledimo malo podatkov o klamidijskih okužbah pri pevcih v ujetništvu. Za okužene ptice je značilno, da redko razvijejo klinične znaake. Zaradi možnega izločanja povzročitelja v okolico ob latentni okužbi predstavljajo visoko tveganje prenosa povzročitelja okužbe na druge ptice in človeka (Circella in sod., 2011).

### 5.3 Bakterije iz družine Chlamydiaceae pri pticah v Sloveniji nekoč in danes

Obsežnejšo sistematicno raziskavo okužb ptic s klamidijami so v Sloveniji izvedli v letih od 1991 do 1997. V preiskavo so vključili sobne ptice, pasemske golobe, prostoživeče domače golobe in perutnino v intenzivni rej. Okužbo ptic s *C. psittaci* so ugotavljali z metodo IIF in DIF. Specifična protitelesa proti *C. psittaci* so dokazali pri vseh preiskovanih skupinah ptic. Okužb z drugimi vrstami klamidij niso ugotavljali (Dovč, 1998).

V naši raziskavi smo z molekularnimi metodami ugotovili, da so prostoživeče ptice in ptice v ujetništvu okužene z različnimi vrstami bakterij iz družine Chlamydiaceae. Okužbe smo dokazovali z metodo PCR v realnem času, MLVA in analizo nukleotidnega zaporedja na odseku gena 23S rRNA družine Chlamydiaceae. Pri prostoživečih pticah smo dokazali okužbo s *C. psittaci* genotipa B, *C. psittaci* genotipa C in *C. abortus*, medtem ko smo pri pticah v ujetništvu dokazali okužbo s *C. psittaci* genotipa A, *C. psittaci* genotipa B, ACC in bakterijo, ki je z izbranimi diagnostičnimi metodami nismo uspeli 100% identificirati. Naše filogenetsko drevo, narisano na osnovi razlik v nukleotidnem zaporedju 23S rRNA, prikazuje filogenetske povezave med analiziranimi vzorci raziskave in referenčnimi sevi bakterij iz družine Chlamydiaceae. Za bakterijo, ki je nismo uspeli vrstno opredelit, smo z analizo nukleotidnega zaporedja ugotovili najbližjo sorodnost z referenčnim sevom *C. caviae* GPIC, in sicer z 96,2% identičnostjo.

Med prostoživečimi pticami smo okužbo s klamidijami dokazali pri mlakaricah, domačem golobu in, prvič v Sloveniji, pri sivih vranah. Prav tako smo prvič v Sloveniji dokazali okužbo z ACC pri dvoriščni perutnini na različnih območjih države in pri perutnini v intenzivni reji. V Sloveniji smo prvič dokazali okužbo s *C. psittaci* genotipa B pri agapornisu.

Pri perutnini intenzivne reje, pri kateri smo z molekularnimi preiskavami dokazali okužbo z ACC, smo predhodno okužbo z bakterijo iz rodu *Chlamydia* ugotovili s posredno metodo IIF.

Za spremljanje epidemiologije okužb s klamidijami pri pticah je priporočljivo uporabljati različne diagnostične metode, ki se med seboj dopolnjujejo. Za dokaz izvora in prenosa klamidijskih okužb pri različnih vrstah ptic, bi bile potrebne načrtne, usmerjene in dolgotrajne raziskave pri prostoživečih pticah in pticah v ujetništvu.

## 6 ZAKLJUČKI

Na podlagi rezultatov naše raziskave smo prišli do naslednjih zaključkov.

- 1) V Sloveniji smo okužbe s klamidijami pri pticah potrdili v pomurski, gorenjski, osrednjeslovenski, dolenjski in primorski regiji. Z molekularnimi metodami smo pri pticah v Sloveniji dokazali okužbe z različnimi vrstami bakterij iz družine Chlamydiaceae:
  - *Chlamydia psittaci* pri prostoživečih pticah, sobnih pticah in pasemskih golobih;
  - *Chlamydia abortus* pri prostoživečih sivih vranah;
  - atipično kokošjo klamidijo pri dvoriščni perutnini in kokoših v intenzivni rej.
- 2) Z metodo MLVA smo potrdili okužbe ptic z različnimi genotipi bakterije *Chlamydia psittaci*. Dokazali smo okužbo z:
  - *genotipom A pri papigah,*
  - *genotipom B pri papigah in golobih ter*
  - *genotipom C pri mlakaricah.*

V Sloveniji smo prvič ugotovili okužbo pri agapornisu z genotipom B *Chlamydia psittaci*.

- 3) S primerjavo rezultatov genotipizacije bakterije *Chlamydia psittaci* med vzorci, odvzetimi za našo raziskavo, in vzorci, dobljenimi ob predhodnih raziskavah, smo ugotovili razliko le pri papigi vrste agapornis. Pri papigah smo prvič dokazali genotip B. Do sedaj je bil v Sloveniji potrjen samo genotip A.
- 4) Dokazali smo statistično značilno razliko ( $p < 0,05$ ) med vrednostmi Ct brisov žrela in brisov kloake, dobljenimi z metodo PCR v realnem času pri ugotavljanju odseka gena 23S rRNA, značilnega za bakterije iz družine Chlamydiaceae. Z izračuni smo dobili p vrednost 0,04. Iz rezultatov lahko povzamemo, da je bris kloake primernejša kužnina kot bris žrela.

- 5) Za ugotavljanje okužb s klamidijami pri pticah je pomembna uporaba molekularnih in seroloških metod. Metodi se medsebojno dopolnjujeta. Prednost molekularnih preiskav pred serološkimi je v neinvazivnem načinu odvzema vzorcev, visoki občutljivosti in specifičnosti ter objektivni oceni rezultatov.
- 6) V Sloveniji smo prvič dokazali okužbo z atipično kokošjo klamidijo pri dvoriščni perutnini in perutnini v intenzivni reji ter okužbo s *Chlamydia abortus* pri prostoživeči sivi vrani.
- 7) Pri potrditvi atypične kokošje klamidije smo pri kokoših v intenzivni reji uspeli dokazati imunski odziv in prisotnost specifičnih protiteles IgG v nizkem titru, česar v dosedanji literaturi nismo zasledili.

## 7 POVZETEK

Klamidije so bakterije iz družine Chlamydiaceae, ki povzročajo številna obolenja pri živalih in človeku. Pri ljudeh so klamidije najbolj poznane kot povzročiteljice spolno prenosljivih okužb in trahome (*C. trachomatis*) ter obolenja dihal (*C. pneumoniae*). Pri živalih pogosto povzročajo vnetje očesnih veznic, obolenja dihal in prebavil (*C. psittaci*, *C. felis*, *C. pneumoniae*, *C. muridarum*, *C. pecorum*, *C. suis*, *C. caviae*) ter splav (*C. abortus*). Med njimi je najpomembnejša povzročiteljica zoonoz *C. psittaci*. Naravni gostitelji te bakterije so ptice. Pri pticah so nedavno dokazali okužbe še z drugimi vrstami klamidij: *C. trachomatis*, *C. abortus*, *C. muridarum*, *C. pecorum*, *C. suis* in z atipičnimi vrstami klamidij.

V raziskavi smo ugotavljali bakterije iz družine Chlamydiaceae pri pticah v Sloveniji. V študijo smo vključili 73 različnih vrst ptic iz 10 redov. Vzorce smo odvzeli v letih od 2008 do 2012 prostoživečim pticam ( $n = 350$ ), sobnim pticam ( $n = 125$ ), pticam v živalskem vrtu in v živalskim vrtovom podobnih prostorih ( $n = 108$ ), pasemskim golobom ( $n = 150$ ), dvoriščni perutnini ( $n = 252$ ) in perutnini v intenzivni reji ( $n = 2986$ ). Pregledali smo tudi vzorce 33 ptic, pri katerih so v predhodnih preiskavah dokazali okužbo z bakterijo *C. psittaci*.

Z molekularnimi metodami smo preiskali brise žrela in brise kloake 1068 ptic, katerih vzorce smo pridobili v sklopu naše raziskave in 33 različnih vzorcev ptic, ki so bili hranijeni od predhodnih raziskav. Z metodo PCR v realnem času smo v vzorcih dokazovali odsek gena 23S rRNA bakterij iz družine Chlamydiaceae. Serume 3119 ptic smo z metodo posredne imunofluorescence (IIF) preiskali na prisotnost protiteles proti bakteriji iz rodu *Chlamydia*.

Izmed 350 pregledanih prostoživečih ptic, smo okužbo z bakterijami iz družine Chlamydiaceae dokazali pri 10 pticah (2,9 %), in sicer pri 6 mlakaricah od 121 (5,0 %), enem domačem golobu od 11 (9,1 %) in treh sivih vranah od 7 (42,9 %). Odsek gena za *C. psittaci* smo potrdili pri mlakaricah in domačem golobu. Z metodo MLVA smo določili genotip B pri domačem golobu ( $n = 1$ ) in genotip C pri mlakaricah ( $n = 6$ ). Z analizo nukleotidnega zaporedja smo pri treh sivih vranah ugotovili 100% identičnost s sevom *C. abortus* EBA.

V letih 2010 in 2011 smo 125 naključno izbranim sobnim pticam odvzeli brise žrela in brise kloake ter 13 med njimi tudi kri. Bakterijo *C. psittaci* smo potrdili pri treh papigah (2,4 %), in sicer pri eni skobčevki od 44 (2,3 %) in dveh agapornisih od 12 (16,7 %). Z metodo MLVA smo določili okužbo z genotipom A pri skobčevki in z genotipom B pri obeh agapornisih. Okužbo s *C. psittaci* smo pri vseh treh papigah potrdili še z analizo nukleotidnega zaporedja. Hkrati smo pri eni od pozitivnih papig potrdili tudi specifična protitelesa proti *C. psittaci*.

V živalskem vrtu in živalskim vrtovom podobnih prostorih smo preiskali 108 ptic, 70 smo odvzeli tudi kri. Vsi preiskani vzorci so bili negativni na okužbo z bakterijami iz družine Chlamydiaceae.

V preiskavo smo vključili 150 pasemskih golobov iz 15 rej na različnih lokacijah Slovenije. Tarčno DNA, značilno za klamidije, smo dokazali v dveh rejah (13,3 %). V obeh primerih smo dokazali okužbo s *C. psittaci* genotipa B.

Pri dvoriščni perutnini smo brise žrela in brise kloake odvzeli na različnih območjih Slovenije. Skupno smo pregledali 252 ptic, pripadajočih 17 vrstam iz dveh redov. Med njimi smo 50 pticam odvzeli tudi kri za dokaz specifičnih protiteles proti klamidijam. Vsi preiskovani serumi so bili negativni. Tarčno DNA, značilno za bakterije iz družine Chlamydiaceae, smo dokazali pri 8 pticah (3,2 %), in sicer pri 6 kokoših od 148 (4,1 %), enim puranu od 15 (6,7 %) in enim fazanu od treh (33,3 %). Vse pozitivne vzorce smo z metodo PCR v realnem času testirali na okužbo z atipično kokošjo klamidijo. Okužbo z ACC smo dokazali pri 6 kokoših in enim puranu, medtem ko tarčnega gena za ACC v vzorcu fazana nismo potrdili. Pri analiziranju nukleotidnega zaporedja odseka gena 23S rRNA družine Chlamydiaceae smo pri kokoših in puranu ugotovili 97,1% nukleotidno identičnost z referenčnim sevom *C. psittaci* 84/55. Identičnost med nukleotidnim zaporedjem tarčne DNA pri fazanu in nukleotidnim zaporedjem seva *C. psittaci* 84/55 je bila 95,3%.

V sklopu intenzivne reje perutnine smo preiskali šest farm, kjer smo serološko pregledali 182 hlevov. Z metodo IIF smo specifična protitelesa IgG proti bakteriji iz rodu *Chlamydia* dokazali na eni farmi (16,7 %), in sicer v štirih hlevih od 139 pregledanih (2,9 %). Serološko pozitivna je bila matična jata kokoši, vseljena v pet objektov ene farme.

Kokošim smo odvzeli brise žrela in brise kloake ter v vseh petih hlevih dokazali okužbo z ACC. S primerjavo nukleotidnega zaporedja kokošje DNA z nukleotidnim zaporedjem referenčnega seva *C. psittaci* 84/55, smo ugotovili 97,1% identičnost.

V našo raziskavo smo vključili tudi vzorce 33 ptic, pri katerih so v predhodnih preiskavah dokazali okužbo z bakterijo *C. psittaci*. Vzorce smo preiskali z metodo PCR v realnem času in dokazali tarčno DNA, značilno za *C. psittaci*, pri 23 vzorcih (69,7 %). Ostali vzorci so bili negativni. Z metodo MLVA smo določili okužbo z genotipom A pri skobčevkah (n = 4), nimfah (n = 11), velikem aleksandru (n = 1), agapornisih (n = 3) in amazonki (n = 1) ter z genotipom B pri domačem golobu (n = 3).

Obsežna študija, ki smo jo opravili, je potrdila, da so ptice v Sloveniji okužene z različnimi vrstami bakterij iz družine Chlamydiaceae: *C. psittaci*, *C. abortus* in ACC. Pri okužbah s *C. psittaci* smo določili različne genotipe bakterije. Genotip A smo dokazali pri papigah, genotip B pri papigi vrste agapornis in golobih ter genotip C pri mlakaricah. V Sloveniji smo prvič dokazali okužbo ptic s *C. abortus* in atipično kokošjo klamidijo ter okužbo agapornisa s *C. psittaci* genotipa B. Okužbo s klamidijami smo dokazali pri prostoživečih pticah, sobnih pticah, pasemskih golobih, dvoriščni perutnini in perutnini v intenzivni reji.

## 8 SUMMARY

Chlamydias are bacteria from the family Chlamydiaceae, which cause numerous diseases in animals and man. They are mostly known as the cause of sexually transmitted infections and trachoma (*C. trachomatis*) and respiratory diseases (*C. pneumoniae*) in humans. In animals they are often causing conjunctivitis, respiratory diseases and gastrointestinal diseases (*C. psittaci*, *C. felis*, *C. pneumoniae*, *C. muridarum*, *C. pecorum*, *C. suis*, *C. caviae*) and abortion (*C. abortus*). The most important zoonotic pathogenic agent among them is *C. psittaci*. Natural hosts of this bacterium are birds. Recently, infections with other species of *Chlamydia*: *C. trachomatis*, *C. abortus*, *C. muridarum*, *C. pecorum*, *C. suis* and atypical types of Chlamydiaceae, were detected in birds.

In the study, infections of birds with bacteria from the family Chlamydiaceae were investigated in Slovenia. Seventy-three different species of birds from 10 orders were included in the research. Samples were taken from wild birds ( $n = 350$ ), cage birds ( $n = 125$ ), birds in the zoo and zoos in similar areas ( $n = 108$ ), breed pigeons ( $n = 150$ ), backyard poultry ( $n = 252$ ) and in the intensive poultry ( $n = 2986$ ) between 2008 and 2012. In addition, different samples of *C. psittaci* positive birds ( $n = 33$ ) from previous studies were also examined.

Pharyngeal and cloacal swabs of 1068 birds, obtained in present study and 33 different samples of birds originated from the previous studies, were tested by molecular methods. Real-time PCR method was used for the detection of the 23S rRNA gene of bacteria from the family Chlamydiaceae. Sera of 3119 birds were examined for the antibodies against the bacteria of *Chlamydia* genus by indirect immunofluorescence (IIF) method.

In wild birds infection with bacteria from the Chlamydiaceae family was detected in 10 birds (2.9%) out of 350 tested birds. Positive birds were: 6 out of 121 mallards (5.0%), one of 11 tested feral pigeons (9.1%) and three of 7 hooded crows (42.9%). In mallards and feral pigeon *C. psittaci* was detected by real-time PCR method. The *C. psittaci* genotype B in feral pigeon ( $n = 1$ ) and genotype C in the mallards ( $n = 6$ ) were typed by MLVA method.

Infection with *C. psittaci* was also confirmed by sequence analysis on the 23S rRNA gene segment specific for bacteria belonging to the family Chlamydiaceae. The alignment and sequence analysis of hooded crows samples on that section gene showed 100% identical with the comparable reference strain of *C. abortus* EBA.

In 2010 and 2011, pharyngeal and cloacal swabs were taken from 125 randomly selected cage birds. Blood samples were also collected from 13 of them. The bacterium *C. psittaci* was detected in three parrots (2.4%), one (2.3%) out of 44 budgerigars and in two (16.7%) among 12 lovebirds. Infection with genotype A in the budgerigar and with genotype B in the two lovebirds was detected by MLVA method. The infection with *C. psittaci* was confirmed in all three parrots by sequence analysis. The IIF method confirmed the presence of antibodies against bacteria of *Chlamydia* genus in the *C. psittaci* positive budgerigar as detected by the molecular method.

At the zoo and similar facilities the pharyngeal and cloacal swabs were taken from 108 birds and blood samples were collected from 70 birds. All tested samples were negative for the infection with bacteria from the family Chlamydiaceae.

Breeder pigeons ( $n = 150$ ) from 15 flocks located at different locations in Slovenia were included in the investigation. Pharyngeal and cloacal swabs were investigated. *C. psittaci* was detected in two (13.3%) of the flocks by real-time PCR method. The infection with *C. psittaci* was also confirmed by sequence analysis. In both flocks, the infection with genotype B was detected by MLVA method.

The pharyngeal and cloacal swabs of backyard poultry were taken in different areas of Slovenia. All together, 252 birds, belonging to 17 species of two orders were investigated. Blood samples were taken from 50 of investigated birds for detection of antibodies against *Chlamydia*. All tested sera were negative. By the real-time PCR method bacteria from the Chlamydiaceae family were detected in eight birds (3.2%): in six of 148 hens (4.1%), one of 15 turkeys (6.7%) and in one of three pheasants (33.3%).

The positive samples were further tested for the presence of the 16S rRNA gene of atypical chicken Chlamydiaceae (ACC) by real time PCR. Infection with ACC was detected in 6 hens and one turkey, while the sample of pheasant was negative for ACC. In analysing the nucleotide sequences of the 23S rRNA gene segment of family Chlamydiaceae, in hens and one turkey 97.1% nucleotide identical to the reference strain of *C. psittaci* 84/55 was found. Identity between the nucleotide sequence of the target DNA of the pheasant and sequencing strain of *C. psittaci* 84/55 was 95.3%.

Serological investigations included 182 houses of 6 intensive poultry farms. Specific IgG antibodies against bacteria of the genus *Chlamydia* were detected in one farm (16.7%) namely in four houses out of 139 examined (2.9%) by IIF method. Seropositive birds were detected in a breeding flock, on a farm in which the pharyngeal and cloacal swabs for molecular investigations were also taken in five houses. In all five houses, the infection with ACC was detected by real-time PCR method. Alignment of the nucleotide sequence showed 97.1% identity with the reference strain of *C. psittaci* 84/55.

Samples of 33 birds taken in previously study that were positive for *C. psittaci* infection in preliminary tests were also included in our study. Samples were investigated by real time PCR method. *C. psittaci* was detected in 23 samples (69.7%). Positive samples were typed by the MLVA method. Genotype A was detected in budgerigars ( $n = 4$ ), nymphs ( $n = 11$ ), Alexandrine parakeet ( $n = 1$ ), love birds ( $n = 3$ ) and amazon parrot ( $n = 1$ ). Genotype B was detected in the domestic pigeons ( $n = 3$ ).

Our study showed that the birds in Slovenia are infected with different types of the bacteria from the Chlamydiaceae family: *C. psittaci*, *C. abortus* and ACC. Different genotypes of *C. psittaci* were determined. Genotype A was detected in parrots, genotype B in parrot and pigeons and genotype C in mallards. The infections of birds with *C. abortus* and ACC and with *C. psittaci* genotype B in lovebirds were determined for the first time in Slovenia. Chlamydial infections were detected in wild birds, cage birds, breed pigeons, backyard poultry and in intensive poultry production.

## 9 ZAHVALA

Hvala Agenciji za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije za financiranje usposabljanja do doktorata.

Hvala mentorici prof. dr. Alenki Dovč za vso podporo, skrb, spodbudo in zaupanje v obdobju raziskovanja in nastajanja doktorskega dela.

Hvala članom komisije prof. dr. Olgi Zorman-Rojs, doc. dr. Darji Keše in viš. zn. sod. dr. Matjažu Ocepku za prijaznost, koristne napotke in pregled doktorske naloge.

Hvala doc. dr. Jožkotu Račniku za strokovni vzgled. Hvala za nesebično predajo znanja in razkritje skrivnostnega sveta veterinarske medicine. Hvala tudi za vso spodbudo, skrb, podporo in razumevanje.

Hvala asist. dr. Brigit Slavec za naklonjenost, konstruktivne pogovore, usmeritve in jasne napotke za izboljšanje naloge. Prav tako hvala za pomoč pri delu v laboratoriju.

Hvala asist. dr. Marku Zadravcu za prijetnejše delo na terenu in v laboratoriju ter za vse koristne napotke pri opravljanju obveznosti na podiplomskem študiju in pri izdelavi naloge.

Hvala dr. Tomiju Trilarju za vse odgovore na moja številna vprašanja in prošnje. Predvsem hvala za pomoč pri vzorčenju prostoživečih ptic.

Hvala dr. Karine Laroucau, dr. Aleksandarju Zocevic, Fabienu Vorimore in njihovim sodelavcem za pomoč in strokovne nasvete pri molekularnem delu naloge.

Hvala doc. dr. Urošu Kapežu, strok. svet. dr. Renati Lindtner-Knific, dr. Adeli Fratnik Steyer, Marku Bogataju, Darji Krelj, Lidiji Dežman, Bernardi Oblak, Vladu Jakovcu, Marjeti Dremelj, Ireni Bahč in Boštjanu Flajniku za vse kar ste naredili zame v času raziskovanja in izdelave doktorske disertacije.

Hvala Petri Bandelj, Maji Čonč, Petru Maričiču, Tei Poljanec, Pavlu Kvapilu, Marjanu Kaučiču, Janezu Habjanu, Jasmini Filipič in vsem drugim veterinarjem ter študentom veterine, ki ste sodelovali pri vzorčenju.

Hvala mag. Brigit Greč-Smole za skrben pregled in ureditev literature v nalogi. Prav tako hvala Stanislavi Ujc, Slavici Sekulič in Alešu Budkoviču za knjižnično in računalniško pomoč.

Hvala prof. dr. Andreju Likarju in Katarini Zadravec za vso pomoč pri statistični analizi rezultatov.

Hvala Tilnu Basletu za obdelavo podatkov v računalniškem programu GIS.

Hvala Rajki Marhold za lektoriranje besedila.

Srčno hvala mojim domačim za neizmerno potrpežljivost in podporo ter za vso spodbudo pri uresničevanju mojih idej.

Iskrena hvala vsem prijateljicam in prijateljem za prijetno družbo in spodbudo. Še posebej hvala Sandri Skutnik, Blažu Gindiosiju, Vesni Širca in Tilnu Basletu.

Hvala vsem, ki ste del mojega življenja.

## 10 LITERATURA

- Abdelrahman YM, Belland RJ. The chlamydial developmental cycle. *FEMS Microbiol Rev* 2005; 29(5): 949–59.
- Andersen AA. Serotyping of *Chlamydia psittaci* isolates using serovar-specific monoclonal antibodies with the microimmunofluorescence test. *J Clin Microbiol* 1991; 29(4): 707–11.
- Andersen AA. Comparison of pharyngeal, fecal, and cloacal samples for the isolation of *Chlamydia psittaci* from experimentally infected cockatiels and turkeys. *J Vet Diagn Invest* 1996; 8(4): 448–50.
- Andersen AA, Vanrompay D. Avian chlamydiosis. *Rev Sci Tech OIE* 2000; 19(2): 396–404.
- Andersen AA, Vanrompay D. Avian chlamydiosis (psittacosis, ornithosis). In: Saif Y, ed. *Diseases of poultry*. Ames: Iowa state University Press, 2003: 863–79.
- Arko B. Tehnologija PCR v realnem času in možnosti uporabe v laboratorijski diagnostiki in farmaciji. *Farm Vestn* 2004; 55: 215–20.
- Avšič Županc T. Posredno dokazovanje virusov. In: Koren S et al., eds. *Splošna medicinska virologija*. Ljubljana: Medicinski razgledi, 2002: 125–6.
- Barbour AG, Amano K, Hackstadt T, Perry L, Caldwell HD. *Chlamydia trachomatis* has penicillin-binding proteins but not detectable muramic acid. *J Bacteriol* 1982; 151(1): 420–8.
- Bas S, Muzzin P, Ninet B, Bornand JE, Scieux C, Vischer TL. Chlamydial serology: comparative diagnostic value of immunoblotting, microimmunofluorescence test, and immunoassays using different recombinant proteins as antigens. *J Clin Microbiol* 2001; 39(4): 1368–77.
- Bavoil P, Ohlin A, Schachter J. Role of disulfide bonding in outer membrane structure and permeability in *Chlamydia trachomatis*. *Infect Immun* 1984; 44(2): 479–85.
- Beatty WL, Morrison RP, Byrne GI. Persistent Chlamydiae: from cell culture to a paradigm for chlamydial pathogenesis. *Microbiol Rev* 1994; 58(4): 686–99.
- Bedson SP, Western GT. Observations on the virus of psittacosis. *Br J Exp Pathol* 1930; 11(6): 502–11.
- Beeckman DSA, Vanrompay DCG. Zoonotic *Chlamydophila psittaci* infections from a clinical perspective. *Clin Microbiol Infect* 2009; 15(1): 11–7.
- Beeckman DSA, Vanrompay DCG. Biology and intracellular pathogenesis of high or low virulent *Chlamydophila psittaci* strains in chicken macrophages. *Vet Microbiol* 2010; 141(3/4): 342–53.
- Berg HF, Maraha B, Bergmans AMC, van de Zee A, Kluytmans JA JW, Peeters MF. Extraction of *Chlamydia pneumoniae* DNA from vascular tissue for use in PCR: an evaluation of four procedures. *Clin Microbiol Infect* 2003; 9(2): 135–9.
- Betsou F, Beaumont K, Sueur JM, Orfila J. Construction and evaluation of internal control DNA for PCR amplification of *Chlamydia trachomatis* DNA from urine samples. *J Clin Microbiol* 2003; 41(3): 1274–6.
- Billington S. Clinical and zoonotic aspects of psittacosis. In *Pract* 2005; 27(5): 256–63.
- Blomqvist M, Christerson L, Waldenström J, et al. *Chlamydia psittaci* in birds of prey, Sweden. *Infect Ecol Epidemiol* 2012; 2: e8435 (4 str.).  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3426325/> (10. november 2012)
- Borel N, Kempf E, Hotzel H et al. Direct identification of chlamydiae from clinical samples using a DNA microarray assay: a validation study. *Mol Cellular Probes* 2008; 22(1): 55–64.
- Brade L, Nurminen M, Mäkelä PH, Brade H. Antigenic properties of *Chlamydia trachomatis* lipopolysaccharide. *Infect Immun* 1985; 48(2): 569–72.

- Brade L, Rozalski A, Kosma P, Brade H. A monoclonal antibody recognizing the 3-deoxy-D-manno-oct-2-ulosonic acid (Kdo) trisaccharide alphaKdo(2-->4)alphaKdo(2-->4)alphaKdo of *Chlamydophila psittaci* 6BC lipopolysaccharide. *J Endotoxin Res* 2000; 6(5): 361–8.
- Branley JM, Roy B, Dwyer DE, Sorrell TC. Real-time PCR detection and quantitation of *Chlamydophila psittaci* in human and avian specimens from a veterinary clinic cluster. *Eur J Clin Microbiol Infect Disease* 2008; 27(4): 269–73.
- Campbell TW, Ellis CK. Avian and exotic animal hematology and cytology. Ames: Blackwell Publishing, 2007: 3–50.
- Circella E, Pugliese N, Todisco G, Cafiero MA, Sparagano OAE, Camarda A. *Chlamydia psittaci* infection in canaries heavily infested by *Dermanyssus gallinae*. *Exp Appl Acarology* 2011; 55(4): 329–38.
- Colvile KM, Lawson B, Pocknell AM, Dagleish MP, John SK, Cunningham AA. Chlamydiosis in British songbirds. *Vet Rec* 2012; 171(7): 177–82.
- Condon K, Oakey J. Detection of Chlamydiaceae DNA in veterinary specimens using a family-specific PCR. *Lett Appl Microbiol* 2007; 45(2): 121–7.
- Corsaro D, Valassina M, Venditti D. Increasing diversity within Chlamydiae. *Crit Rev Microbiol* 2003; 29(1): 37–78.
- Corsaro D, Venditti D. Emerging chlamydial infections. *Crit Rev in Microbiol* 2004; 30(2): 75–106.
- Daft BM, Grumbles IC, Pearson JE, Vice TE, Grimes JE. A manual of methods for laboratory diagnosis of avian chlamydiosis. New Bolton: American Association of Avian Pathologists, 1989: 26 str.
- Dickx V, Beeckman DSA, Dossche L, Tavernier P, Vanrompay D. *Chlamydophila psittaci* in homing and feral pigeons and zoonotic transmission. *J Med Microbiol* 2010; 59(11): 1348–53.
- Dovč A. Uvajanje imunofluorescenčnih metod v diagnostiko klamidioze (*Chlamydia psittaci*) in epizootiologija pri papigah in golobih. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, 1993. Magistrsko delo.
- Dovč A. Klamidioza (*Chlamydia psittaci*) pri domačih in divjih pernatih živalih v Sloveniji. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, 1998. Doktorska disertacija.
- Dovč A, Zorman-Rojs O, Vergles Rataj A, Bole-Hribovsek V, Krapez U, Dobeic M. Health status of free-living pigeons (*Columba livia domestica*) in the city of Ljubljana. *Acta Vet Hung* 2004; 52(2): 219–26.
- Dovč A, Dovč P, Keše D, Vlahović K, Pavlak M, Zorman-Rojs O. Long-term study of chlamydophilosis in Slovenia. *Vet Res Commun* 2005; 29 (1): 23–36.
- Dovč A, Slavec B, Lindtner-Knific R et al. Study of *Chlamydophila psittaci* outbreak in budgerigars. In: Pathogenesis, epidemiology and zoonotic importance of animal chlamydiosis. Proceedings of the 5<sup>th</sup> annual workshop of COST Action 855 Animal chlamydioses and zoonotic implications. Pulawy: National Veterinary Research Institute, 2007: 343–6.
- Dovč A, Sachse K, Laroucau K, Prukner-Radovčić E, Rešibegović E, Ilieski V. The importance of chlamydia infections in birds for animal and human health in Southeastern Europe. In: Machačova J, Rohsmann K, eds. Scientific results of the SEE-ERA.NET Pilot Joint Call. Vienna, 2009: 245–52.
- Draganov M, Murdjeva M, Michailova-Topalska T. McCoy and McCoy-plovdiv cell lines in experimental and diagnostic practice – past, present and perspectives. *J Culture Collections*, 2005; 4: 3–16.
- Eatwell K. Passerine birds: investigation of flock mortality/morbidity. In: Chitty J, Lierz M, eds. BSAVA Manual of raptors, pigeons and passerine. Quedgeley: British small animal veterinary association, 2008: 370–6.
- Ehricht R, Slickers P, Goellner S, Hotzel H, Sachse K. Optimized DNA microarray assay allows detection and genotyping of single PCR-amplifiable target copies. *Mol Cell Probes* 2006; 20(1): 60–3.
- Eugster AK. Chlamydiosis. In: Steele JH, ed. Handbook series in zoonoses: section A: vol. 2. Boca Raton: CRC Press, 1980: 357–431.

- Everett KD, Hatch TP. Architecture of the cell envelope of *Chlamydia psittaci* 6BC. *J Bacteriol* 1995; 177(4): 877–82.
- Everett KD, Bush RM, Andersen AA. Emended description of the order Chlamydiales, proposal of Parachlamydiaceae fam. nov. and Simkaniaceae fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family Chlamydiaceae, including a new genus and five new species, and standards. *Int J Syst Bacteriol*, 1999; 49(2): 415–40.
- Everett KD. *Chlamydia* and *Chlamydiales*: more than meets the eye. *Vet Microbiol* 2000; 75(2): 109–26.
- Frutos MC, Monetti M, Kiguen X, Venezuela F, Ré V, Cuffini C. Genotyping of *C. psittaci* in central area of Argentina. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012; 74(3): 320–2.
- Fukushi H, Hirai K. Proposal of *Chlamydia pecorum* sp. nov. for *Chlamydia* strains derived from ruminants. *Int J Syst Bacteriol* 1992; 42(2): 306–8.
- Gasparini J, Erin N, Bertin C, et al. Impact of urban environment and host phenotype on the epidemiology of Chlamydiaceae in feral pigeons (*Columba livia*). *Environ Microbiol* 2011; 13(12): 3186–93.
- Geens T, Dewitte A, Boon N, Vanrompay D. Development of a *Chlamydophila psittaci* species-specific and genotype-specific real-time PCR. *Vet Res* 2005a; 36(5-6): 787–97.
- Geens T, Desplanques A, Loock M, et al. Sequencing of the *Chlamydophila psittaci* ompA gene reveals a new genotype, E/B, and the need for a rapid discriminatory genotyping method. *J Clin Microbiol* 2005b; 43(5): 2456–61.
- Gerlach H. Chlamydia. In: Ritchie BW, ed. Avian medicine: principles and application. Lake Worth: Wingers Publishing, 1994: 984–96.
- Grayston JT, Kuo CC, Campbell LA, Wang SP. *Chlamydia pneumoniae* sp. nov. for *Chlamydia* spp. strain TWAR. *Int J Syst Bacteriol* 1989; 39: 88–90.
- Greub G. International Committee on Systematics of Prokaryotes. Subcommittee on the taxonomy of the Chlamydiae: minutes of the inaugural closed meeting, 21 March 2009, Little Rock, AR, USA. *Int J Syst Evol Microbiol* 2010a; 60(11): 2691–3.
- Greub G. International Committee on Systematics of Prokaryotes. Subcommittee on the taxonomy of the Chlamydiae: minutes of the closed meeting, 21 June 2010, Hof bei Salzburg, Austria. *Int J Syst Evol Microbiol* 2010b; 60(11): 2694.
- Halberstadter L, von Prowazek S. Über Zelleinschlusse Parasitärer Natur beim Trachom. *Arb Kaiserl Gesundheitsamt (Berlin)* 1907; 26: 44–7.
- Hammerschlag MR. The intracellular life of chlamydiae. *Curr Topics Microbiol Immunol* 2002; 138(4): 239–48.
- Harcourt-Brown N. Psittacine birds. In: Tully T, Dorrestein M, Jones K, eds. *Handbook of avian medicine*. Saunders Elsevier, 2009: 138–69.
- Harkinezhad T, Verminnen K, van Droogenbroeck C, Vanrompay D. *Chlamydophila psittaci* genotype E/B transmission from African grey parrots to humans. *J Med Microbiol* 2007; 56(8): 1097–100.
- Harkinezhad T, Geens Tom, Vanrompay D. *Chlamydophila psittaci* infections in birds: a review with emphasis on zoonotic consequences. *Vet Microbiol* 2009a; 135(1/2): 68–77.
- Harkinezhad T, Verminnen K, De Buyzere M, Rietzschel E, Bekaert S, Vanrompay D. Prevalence of *Chlamydophila psittaci* infections in a human population in contact with domestic and companion birds. *J Med Microbiol* 2009b; 58(9): 1207–12.
- Hatch TP, Al-Hossainy E, Silverman JA. Adenine nucleotide and lysine transport in *Chlamydia psittaci*. *J Bacteriol* 1982; 150(2): 662–70.

- Heddema ER, Sluis ST, Buys JA, Vandenbroucke-Grauls CMJE, van Wijnen JH, Visser CE. Prevalence of *Chlamydophila psittaci* in fecal droppings from feral pigeons in Amsterdam, the Netherlands. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72(6): 4423-5.
- Heine H, Müller-Loennies S, Brade L, Lindner B, Brade H. Endotoxic activity and chemical structure of lipopolysaccharides from *Chlamydia trachomatis* serotypes E and L2 and *Chlamydophila psittaci* 6BC. *Eur J Biochem* 2003; 270(3): 440-50.
- Heinz E, Tischler P, Rattei T, Myers G, Wagner M, Hovn M. Comprehensive in silico prediction and analysis of chlamydial outer membrane proteins reflects evolution and life style of the Chlamydiae. *BCM Genomics* 2009; 10(11): e634 (18 str.).  
<http://www.biomedcentral.com/1471-2164/10/634> (23. november 2012)
- Herrmann B, Rahman R, Bergström S, Bonnedahl J, Olsen B. *Chlamydophila abortus* in a brown skua (*Catharacta antarctica lonnbergi*) from a Subantarctic Island. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66(8): 3654-6.
- Hewinson RG, Griffiths PC, Bevan BJ et al. Detection of *Chlamydia psittaci* DNA in avian clinical samples by polymerase chain reaction. *Vet Microbiol*, 1997; 54(2): 155-66.
- Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Roche Mol Syst* 1993; 11: 1026-30.
- Holzinger-Umlauf HA, Marschang RE, Gravendyck M, Kaleta EF. Investigation on the frequency of *Chlamydia* sp. infections in tits (Paridae). *Avian Pathol* 1997; 26(4): 779-89.
- Hubalek Z, Juricova Z, Halouzka J. A survey of free living birds as hosts and lessors of microbial pathogens. *Folia Zool* 1995; 44: 1-11.
- Jourdain E, Gauthier-Clerc M, Bicout DJ, Sabatier P. Bird migration routes and risk for pathogen dispersion into western mediterranean wetlands. *Emerg Infect Dis* 2007; 13(3): 365-72.
- Kaleta EF, Taday EMA. Avian host range of *Chlamydophila* spp. based on isolation, antigen detection and serology. *Avian Pathol* 2003; 32(5): 435-61.
- Kalman S, Mitchell W, Marathe R, et al. Comparative genomes of *Chlamydia pneumoniae* and *C. trachomatis*. *Nat Genet* 1999; 21(4): 385-9.
- Kaltenboeck B, Kousoulas KG, Storz J. Structures of and allelic diversity and relationships among the major outer membrane protein (ompA) genes of the four chlamydial species. *J Bacteriol* 1993; 175(2): 487-502.
- Keše D, Petrovec M, Avšič-Županc T. Posebnosti pri prevzemu in prenosu kužnin za dokaz klamidij, rikecij in erlihij. In: Mikrobiološka analiza kužnin. Nova Gorica: Zavod za zdravstveno varstvo, 1999: 55-6.
- Keše D, Čižman M, Marina J, Avšič Županc T. *Chlamydia pneumoniae* infections in patients with community-acquired pneumonia in Slovenia. *Scand J Infect Dis* 2002; 34(3): 172-6.
- Kramljak Z. *Chlamydophila psittaci* pri pticah - dokazovanje okužb z molekularnimi metodami. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, 2006. Diplomsko delo.
- Kuo C, Stephens RS, Bavoil PM, Kaltenboeck B. Chlamydia. In: Krieg N et al., eds. Bergey's manual systematic bacteriology. New York: Springer, 2010: 846.
- Laroucau K, Mahé AM, Bouillin C, et al. Health status of free-living pigeons in Paris. In: Cevenini R, Sambri V, eds. Proceedings of the 3<sup>rd</sup> workshop on diagnosis and pathogenesis of animal chlamydioses. Siena, 2005: 17-8.
- Laroucau K, Trichereau A, Vorimore F, Mahé AM. A pmp genes-based PCR as a valuable tool for the diagnosis of avian chlamydiosis. *Vet Microbiol* 2007; 121(1/2): 150-7.
- Laroucau K, Thierry S, Vorimore F, et al. High resolution typing of *Chlamydophila psittaci* by multilocus VNTR analysis (MLVA). *Infect Genet Evol* 2008; 8(2): 171-81.

- Laroucau K, Trichereau A, Vorimore F, Mahé AM. Chlamydial infections in duck farms associated with human cases of psittacosis in France. *Vet Microbiol* 2009; 135(1-2): 82–89.
- Lemus JA, Fargallo JA, Vergara P, Parejo D, Banda E. Natural Cross Chlamydial Infection between Livestock and Free-Living Bird Species. *PLoS ONE* 2010; 5(10): e13512 (12 str.).  
<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0013512> (23. november 2012)
- Lienard J, Croxatto A, Aeby S. Development of a new chlamydiales-specific real-time PCR and its application to respiratory clinical samples. *J Clin Microbiol* 2011; 49(7): 2637–42.
- Longbottom D, Coulter LJ. Animal chlamydioses and zoonotic implications. *J Comp Pathol* 2003; 128: 217–44.
- Machado de Ponte M. Population dynamics of great white pelicans in Southern Africa.  
Cape Town:University of Cape Town, Department of zoology, 2009: 217-23. Doktorska disertacija.
- Marhold C, Slavec B, Račnik J, Zadravec M, Zorman-Rojs O, Dovč A. Comparison of different methods of stored feces samples and extraction of *Chlamydia* DNA for use in real-time PCR. In: Caro MR, Salinas J, Buendia AJ, eds. Pathogenesis and diagnosis of chlamydial infection.  
1<sup>st</sup> European meeting on animal chlamydioses and zoonotic aspects. Murcia, 2009: 14.
- Marhold C, Slavec B, Laroucau K, et al. Detection of *Chlamydia psittaci* in cage birds in Slovenia by real-time PCR. *Slo Vet Res* 2012; 49(4): 185–92.
- McClarty G. Chlamydiae and the biochemistry of intracellular parasitism. *Trends Microbiol* 1994; 2(5): 157–64.
- McClenaghan M, Herring AJ, Aitken ID. Comparison of *Chlamydia psittaci* isolates by DNA restriction endonuclease analysis. *Infect Immun* 1984; 45(2): 384–9.
- McCoy AJ, Sandlin RC, Maurelli AT. In vitro and in vivo functional activity of Chlamydia MurA, a UDP-N-acetylglucosamine enolpyruvyl transferase involved in peptidoglycan synthesis and fosfomycin resistance. *J Bacteriol* 2003; 185(4): 1218–28.
- McElnea CL, Cross GM. Methods of detection of *Chlamydia psittaci* in domesticated and wild birds.  
*Aust Vet J* 1999; 77(8): 516–21.
- McGuigan CC, McIntyre PG, Templeton K. Psittacosis outbreak in Tayside, Scotland, December 2011 to February 2012. *Euro Surveill* 2012; 17(22): pii 20186 (3 str.).  
<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20186> (12. November 2012)
- Mihajlović M. Važnije serološke metode u virusologiji. In: Dujin T, ed. Priručnik za laboratorijsku diagnostiku, standarnizacija diagnostičnih metoda za bakterijske, virusne i parazitarske bolesti životinja čije je suzbijanje propisano zakonom. Beograd: Savez veterinara i vet. tehničara, 1984: 363–78.
- Mitchell SL, Wolff BJ, Thacker WL, et al. Genotyping of *Chlamydophila psittaci* by real-time PCR and high-resolution melt analysis. *J Clin Microbiol* 2009; 47(1): 175–81.
- MKGP. Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano. Akcijski načrt za reševanje problemov povezanih s sivo vrano (*Corvus cornix*) v Sloveniji: predlog. Ljubljana, 2011: 1-88.  
[http://www.arhiv.mkgp.gov.si/fileadmin/mkgp.gov.si/pageuploads/GOZD/Lovstvo/Akcijski\\_nacrt\\_siva\\_vrana.pdf](http://www.arhiv.mkgp.gov.si/fileadmin/mkgp.gov.si/pageuploads/GOZD/Lovstvo/Akcijski_nacrt_siva_vrana.pdf) (1. januar 2013)
- Moore FM, Petrak ML, McMillan MC. Diagnosis of chlamydial infection in pet birds: comparison of cloacal-swab culture and peroxidase-antiperoxidase methods. *Avian Dis* 1988; 32(1): 157–62.
- Moulder JW. Why is *Chlamydia* sensitive in the absence of peptidoglycan? *Infect Agents Dises* 1993; 2: 87–99.
- Ménard A, Clerc M, Subtil A, Mégraud F, Bébér C, de Barbeyrac B. Development of a real-time PCR for the detection of *Chlamydia psittaci*. *J Med Microbiol* 2006; 55(4): 471–3.
- Naglić T, Hajsing D, Madić J, Pinter L. Klamidije. In: Naglić T, ed. Veterinarska mikrobiologija: specijalna bakteriologija i mikologija.  
Zagreb: Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Hrvatsko mikrobiološko društvo, 2005: 239–45.

- Nurminen M, Wahlström E, Kleemola M, Leinonen M, Saikku P, Mäkelä PH. Immunologically related ketodeoxyoctonate-containing structures in *Chlamydia trachomatis*, Re mutants of *Salmonella* species, and *Acinetobacter calcoaceticus* var. anitratius. Infect Immun 1984; 44(3): 609–13.
- Page LA. Revision of the Chlamydiaceae Rake (Rickettsiales): unification of the psittacosis-lympogranuloma venereum-trachoma group of organisms in the genus Chlamydia Jones Rake and Stearns, 1945. Int J Syst Bacteriol 1966.; 16: 223–52.
- Page LA. Proposal for the recognition of two species in the genus Chlamydia Jones, Rake, and Stearns, 1945. Int J Syst Bacteriol 1968; 18: 51–66.
- Pannekoek Y, Dickx V, Beeckam DSA, et al. Multi locus sequence typing of *Chlamydia* reveals an association between *Chlamydia psittaci* genotypes and host species. PloS One 2010; 5(12): e14179 (12 str.). <http://www.plosone.org/article/info:doi/10.1371/journal.pone.0014179> (6. junij 2012)
- Pantchev A, Sting R, Bauerfeind R, Tyczka J, Sachse K. New real-time PCR tests for species-specific detection of *Chlamydophila psittaci* and *Chlamydophila abortus* from tissue samples. Vet J 2009; 181(2): 145–50.
- Pearson JE, Gustafson GA, Senne DA, Peterson LA. Isolation and identification of *Chlamydia psittaci* from pet birds. J Am Vet Med Assoc 1989; 195(11): 1564–7.
- Pennycott T. Pigeons: infectious diseases. In: Chitty J, Lierz M, eds. BSAVA Manual of raptors, pigeons and passerine. Quedgeley: British small animal veterinary association, 2008: 311–9.
- Pinkerton H, Swank RL. Recovery of virus morphologically identical with psittacosis from thiamin-deficient pigeons. Proc Soc Wxp Med 1940; 45: 704–6.
- Račnik J. Epidemiološka študija aviarne influence in bolezni zahodnega Nila (West Nile) pri pticah v Sloveniji. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, 2008. Doktorska disertacija.
- Raulston JE, Wyrick EP. Chlamydia. In: Lederberg J, ed. Encyclopedia of microbiology. San Diego: Academic Press, 2000: 781–8.
- Rizzo F, Vicari N, Robetto S et al. Detection of a novel Chlamydiaceae in wild birds in north western Italy. In: Ouburg S, Morré SA, eds. 7<sup>th</sup> Meeting of the European Society for Chlamydia research. Amsterdam, 2012: 126. Poster.
- Rockey DD, Lenart J, Stephans RS. Genome sequencing and our understanding of chlamydiae. Infect Immun 2000; 68: 5473–9.
- Rodolakis A, Yousef Mohamad K. Zoonotic potential of *Chlamydophila*. Vet Microbiol 2010; 140(3/4): 382–91.
- Sachse K, Laroucau K, Hotzel H, Schubert E, Ehricht R, Slickers P. Genotyping of *Chlamydophila psittaci* using a new DNA microarray assay based on sequence analysis of ompA genes. BMC Microbiol 2008; 8: e63 (12 str.). <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/8/63> (24. november 2012)
- Sachse K, Vretou E, Livingstone M, Borel N, Pospischil A, Longbottom D. Recent developments in the laboratory diagnosis of chlamydial infections. Vet Microbiol 2009; 135(1/2): 2–21.
- Sachse K, Kuehlewind S, Ruettger A, Schubert E, Rohde G. More than classical *Chlamydia psittaci* in urban pigeons. Vet Microbiol 2012; 157(3/4): 476–80.
- Schachter J. Chlamydial infections-past, present, future. J Am Vet Med Assoc 1989; 195: 1501–6.
- Schachter J, Stephens RS, Timms P, et al. Radical changes to chlamydial taxonomy are not necessary just yet. Int J Syst Evol Microbiol 2001; 51(1): 249.
- Schmitz-Esser S, Linka N, Collingro A, et al. ATP/ADP translocases: a common feature of obligate intracellular amoebal symbionts related to Chlamydiae and Rickettsiae. J Bacteriol 2004; 186(3): 683–91.
- Seth-Smith HMB, Harris SR, Rance R, et al. Genome sequence of the zoonotic pathogen *Chlamydophila psittaci*. J Bacteriol 2011; 193(5): 1282–3.

- Simpson VR, Bevan R. *Chlamydial psittaci* infection in robins. *Vet Rec* 1989; 537.
- Smith KA, Campbell CT, Murphy J, Stobierski MG, Tengelsen LA. Compendium of measures to control *Chlamydophila psittaci* infection among humans (psittacosis) and pet birds (avian chlamydiosis), 2010. National Association of State Public Health Veterinarians (NASPHV). *J Exot Pet Med* 2011; 20: 32–45.
- Spenser EL. Common infectious diseases of psittacines birds seen in practice. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1991; 21(6): 1213–7.
- Stainer RY, van Niel CB. The concept of a bacterium. *Arch Microbiol* 1962; 42: 17–35.
- Stanford M. Raptors: infectious diseases. In: Chitty J, Lierz M, eds. *BSAVA Manual of raptors, pigeons and passerine*. Quedgeley: British small animal veterinary association, 2008: 212–22.
- Stephens RS, Kalman S, Lammel C et al. Genome sequence of an obligate intracellular pathogen of humans: *Chlamydia trachomatis*. *Science* 1998; 282(5389): 754–9.
- Storz J, Page LA. Taxonomy of the Chlamydiae: reasons for classifying organisms of the genus *Chlamydia*, family Chlamydiaceae, in a separate order, Chlamydiales ord. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1971; 21: 332–4.
- Telfer BL, Moberley SA, Hort KP et al. Probable psittacosis outbreak linked to wild birds. *Emerg Infect Dis* 2005; 11(3): 391–7.
- Thomas NS, Lusher M, Storey CC, Clarke IN. Plasmid diversity in chlamydia. *Microbiology* 1997; 143(6): 1847–54.
- Todd WJ, Caldwell HD. The interaction of *Chlamydia trachomatis* with host cells: ultrastructural studies of the mechanism of release of a biovar II strain from HeLa 229 cells. *J Infect Dis* 1985; 151: 1037–44.
- Tong CY, Sillis M. Detection of *Chlamydia pneumoniae* and *Chlamydia psittaci* in sputum samples by PCR. *J Clin Pathol* 1993; 46(4): 313–7.
- Tong CY, Donnelly C, Harvey G, Sillis M. Multiplex polymerase chain reaction for the simultaneous detection of *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, and *Chlamydia psittaci* in respiratory samples. *J Clin Pathol* 1999; 52(4): 257–63.
- Trávníček M, Cisláková L, Deptuľa W, Stosik M, Bhide MR. Wild pigeons and pheasants - a source of *Chlamydophila psittaci* for humans and animals. *Ann Agric Environ Med* 2002; 9(2): 253–5.
- Tschirch W, Kaleta EF. Chlamydiosis. *Microbiology* 1999; 77: 1–4.
- Turković B, Brudnjak Z. Antigenska struktura i imunobiologija klamidija. In: Hren-Vencelj H, ed. *Klamidijske infekcije*. Zbornik predavanj Seminarja o klamidijskih infekcijah. Ljubljana: Univerza Edvarda Kardelja v Ljubljani, Medicinska fakulteta, 1989: 18–24.
- Van Loock M, Geens T, De Smit, et al. Key role of *Chlamydophila psittaci* on Belgian turkey farms in association with other respiratory pathogens. *Vet Microbiol* 2005; 107(1/2): 91–101.
- Vanrompay D, Andersen AA, Ducatelle R, Haesebrouck F. Serotyping of European isolates of *Chlamydia psittaci* from poultry and other birds. *J Clin Microbiol* 1993; 31(1): 134–7.
- Vanrompay D, Ducatelle R, Haesebrouck F. *Chlamydia psittaci* infections: a review with emphasis on avian chlamydiosis. *Vet Microbiol* 1995; 45(2/3): 93–119.
- Vanrompay D, Harkinezhad T, van Droogenbroeck C et al. *Chlamydophila psittaci* Transmission from Pet Birds to Humans. *Emerg Infect Dis* 2007; 13(7): 1108–10.
- Vázquez B, Esprón F, Neves E, López J, Ballesteros C, Muñoz MJ. Screening for several potential pathogens in feral pigeons (*Columba livia*) in Madrid. *Acta Vet Scand* 2010; 52: 45–51.
- Verbančič M. Molekularno dokazovanje klamidioze. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, 2008. Diplomsko delo.

- Verminnen K, Duquenne B, De Keukeleire D, et al. Evaluation of a *Chlamydophila psittaci* infection diagnostic platform for zoonotic risk assessment. *J Clin Microbiol* 2008; 46(1): 281–5.
- Vlahović K, Matica B, Bata I, et al. Campylobacter, salmonella and chlamydia in free-living birds of Croatia. *Eur J Wildl Res* 2004; 50(3): 127–32.
- Vlahović K, Prukner-Radovčić E, Horvatek D et al. Bacterial and fungal flora in faecal samples from rooks (*Corvus frugilegus*) in the City of Zagreb, Croatia. *Vet Arh* 2010; 80(1): 81–92.
- Voigt A, Schöfl G, Saluz HP. The *Chlamydia psittaci* genome: a comparative analysis of intracellular pathogens. *PLoS one* 2012; 7(4): e35097 (16 str.).  
<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0035097> (13. november 2012)
- Vorimore F, Bastian S, Deruyter L, et al. Isolation of new Chlamydia species from feral sacred Ibis (*Threskiornis aethiopicus*): Candidatus Chlamydia ibidis. In: Ouburg S, Morre SA, eds. 7<sup>th</sup> Meeting of the European Society for Chlamydia research. Amsterdam, 2012: 178 (Session: Genomics and Bioinformatics)
- Vrezec A, Tome D, Denac D. Selitev in izjemni selitveni pojavi pri pticah. *Ujma* 2006; 20: 125–36.
- Ward M. Chlamydial classification, development and structure. *Br Med Bull* 1983; 39(2): 109–15.
- Weber TP, Stilianakis NI. Ecologic immunology of avian influenza (H5N1) in migratory birds. *Emerg Infect Dis* 2007; 13(8): 1139–43.
- Woods LW, Dostson JF, Castro AE. A rapid monoclonal immunofluorescence assay for *Chlamydia psittaci* in fecal smears from psittacine birds. *J Vet Diagn Invest* 1989; 1(2): 150–3.
- Worell B. Ramphastids. In: Tully T, Dorrestein M, Jones K, eds. *Handbook of avian medicine*. New York: Saunders Elsevier, 2009: 335–50.
- Wylie JL, Hatch GM, McClarty G. Host cell phospholipids are trafficked to and then modified by *Chlamydia trachomatis*. *J Bacteriol* 1997; 179(23): 7233–42.
- Wyllie S, Ashley RH, Longbottom D, Herring A. The major outer membrane protein of *Chlamydia psittaci* functions as a porin-like ion channel. *Infect Immun* 1998; 66(11): 5202–7.
- Wyrick PB, Richmond SJ. Biology of chlamydiae. *J Am Vet Med Assoc* 1989; 195(11): 1507–12.
- Wyrick PB. Intracellular survival by *Chlamydia*. *Cell Microbiol* 2000; 2: 275–82.
- Yang JM, Lui HX, Hao YX, He C, Zhao DM. Development of a rapid real-time PCR assay for detection and quantification of four familiar species of Chlamydiaceae. *J Clin Virol* 2002; 36(1): 39–43.
- Yang J, Ling Y, Yuan J, Pang W, He C. Isolation and characterization of peacock *Chlamydophila psittaci* infection in China. *Avian Dis* 2011; 55(1): 76–81.
- Yin L, Kalmar ID, Lagae S, et al. Emerging *Chlamydia psittaci* infections in the chicken industry and pathology of *Chlamydia psittaci* genotype B and D strains in specific pathogen free chickens. *Vet Microbiol* 2012; 162(2/4): 740–9.
- Yuan Y, Zhang YX, Manning DS, Caldwell HD. Multiple tandem promoters of the major outer membrane protein gene (*omp1*) of *Chlamydia psittaci*. *Infect Immun* 1990; 58(9): 2850–5.
- Zhang L, Douglas AL, Hatch TP. Characterization of a *Chlamydia psittaci* DNA binding protein (EUO) synthesized during the early and middle phases of the developmental cycle. *Infect Immun* 1998; 66(3): 1167–73.
- Zocevic A, Vorimore F, Marhold C, et al. Molecular characterization of atypical *Chlamydia* and evidence of their dissemination in different European and Asian chicken flocks by specific real-time PCR. *Environ Microbiol* 2012; 14(8): 2212–22.
- Zweifel D, Hoop R, Sachse K, Pospischil A, Borel N. Prevalence of *Chlamydophila psittaci* in wild birds: potential risk for domestic poultry, pet birds, and public health? *Eur J Wildl Res* 2009; 55(6): 575–81.