

Spezies-spezifischer Nachweis von Chlamydien bei Haustieren mittels Real-Time PCR

Alexandra Pantchev



INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2010

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2010

© 2010 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. R. Bauerfeind

Spezies-spezifischer Nachweis von Chlamydien bei Haustieren mittels Real-Time PCR

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Alexandra Pantchev

Tierärztin aus Mainz

Gießen 2010

Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil. Georg Baljer

Gutachter: Prof. Dr. Rolf Bauerfeind
Prof. Dr. Michael Lierz

Tag der Disputation: 27.04.2010

*Meinen Eltern
und
meinem Ehemann Niko*

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Pantchev, A., R. Bauerfeind, K. Sachse, J. Tyczka & R. Sting
Psittakose oder Ornithose? Spezies-spezifischer Nachweis von Chlamydien bei
Haustieren mittels Real-Time PCR. DVG-Fachgruppentagung „Bakteriologie und
Mykologie“, Wetzlar, 15. - 17. Juni 2006, Tagungsband S. 75.

Pantchev, A., R. Bauerfeind, K. Sachse, J. Tyczka & R. Sting
Chlamydiosis-but who is the real offender? Detection of chlamydiae in domestic
animals using species-specific real-time PCR assays. Proceedings of the 4th Annual
Workshop of COST Action 855 "Animal Chlamydioses and Zoonotic Implications",
Edinburgh/UK, 3. - 5. September 2006, p. 73, ISBN 978-0-9553665-0-5.

Pantchev, A., R. Bauerfeind, K. Sachse, J. Tyczka & R. Sting
Real-Time PCR zum Spezies-spezifischen Nachweis von *Chlamydophila*- und
Chlamydia-Spezies bei Tieren. 5. Deutscher Chlamydienworkshop, Hannover, 7. - 9.
März 2007.

Sting, R., A. Pantchev, R. Bauerfeind & K. Sachse
Psittakose: der Spezies-Nachweis ist entscheidend. 26. AVID-Tagung Bakteriologie
Kloster Banz, Staffelstein, 24. - 26. Oktober 2007.

Sting, R., A. Pantchev, R. Bauerfeind & K. Sachse
Real-Time PCR zum Spezies-spezifischen Nachweis von Chlamydien bei
unseren Haustieren. 4. Arbeitstagung des Nationalen Referenzlabors für Psittakose -
Diagnostik, Epidemiologie und Pathogenese der Chlamydien- und
Coxielleninfektionen, Jena, 25. - 26. September 2008.

Pantchev, A., R. Sting, R. Bauerfeind, J. Tyczka & K. Sachse
New real-time PCR tests for species-specific detection of *Chlamydophila psittaci*
and *Chlamydophila abortus* from tissue samples. Veterinary Journal, 2009; 181(2):
145-150.

Pantchev, A., R. Sting, R. Bauerfeind, J. Tyczka & K. Sachse
Detection of all *Chlamydophila* and *Chlamydia* spp. of veterinary interest using
species-specific real-time PCR assays. Comparative immunology, microbiology and
infectious diseases. September 2009 (im Druck).

Diese Arbeit wurde freundlicherweise durch Mittel der
Grimminger-Stiftung für Zoonosenforschung unterstützt.

ABKÜRZUNGEN	IV
1 EINLEITUNG	1
2 LITERATURÜBERSICHT	3
2.1 Eigenschaften der Chlamydiales	3
2.1.1 Morphologische und biochemische Eigenschaften	3
2.1.2 Entwicklungszyklus und Tenazität.....	3
2.1.3 Antigenstrukturen.....	5
2.1.4 Persistenz	5
2.2 Taxonomie der Chlamydiales	6
2.3 Medizinische Bedeutung der Chlamydiaceae	9
2.3.1 Vögel.....	9
2.3.2 Säuger	10
2.3.2.1 Schafe und Ziegen	10
2.3.2.2 Rinder	11
2.3.2.3 Schweine.....	11
2.3.2.4 Pferde.....	12
2.3.2.5 Katzen	12
2.3.2.6 Hunde.....	13
2.3.2.7 Meerschweinchen und kleine Säugetiere	13
2.3.2.8 Mensch.....	14
2.3.3 Sonstige Wirtsspezies	14
2.4 Bedeutung von Chlamydien als Zoonoseerreger	15
2.5 Tierseuchenrechtliche Bestimmungen in Deutschland	17
2.6 Methoden zum Nachweis von Chlamydieninfektionen bei Tieren	19
2.6.1 Proben für die Chlamydiendiagnostik.....	19
2.6.2 Direkte Nachweisverfahren.....	20
2.6.2.1 Zellkultur, Färbung, Immunfluoreszenz.....	20
2.6.2.2 Antigen-ELISA.....	20
2.6.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	21
2.6.2.4 Real-Time PCR	24
2.6.2.5 DNA-Microarray.....	26
2.6.3 Indirekte Nachweisverfahren	27
2.6.3.1 Komplementbindungsreaktion.....	27

2.6.3.2	Antikörper-ELISA und Immunoblot	27
3	MATERIAL UND METHODEN	29
3.1	Geräte, Instrumente und Verbrauchsmaterialien	29
3.2	Hard- und Software.....	31
3.3	Chemikalien und Nährmedien.....	31
3.4	Bakterienstämme.....	34
3.5	DNA-Proben	35
3.6	Proben für den Ringversuch.....	37
3.7	Zelllinie.....	38
3.8	Bakteriologische Methoden	39
3.8.1	Anzucht und Vermehrung von Chlamydien in Zellkulturen	39
3.8.2	Anzucht und Vermehrung von anderen Bakterien	41
3.8.3	Bestimmung der Chlamydien-Keimzahl.....	41
3.9	Molekularbiologische Methoden	43
3.9.1	Gewinnung von genomischer DNA	43
3.9.2	Design von Spezies-spezifischen Real-Time PCR-Assays	44
3.9.3	Chlamydiaceae-spezifischer Real-Time PCR-Assay	49
3.9.4	Real-Time PCR-Assays	49
3.9.5	Real-Time PCR-Untersuchung von DNA-Proben aus klinischem Probenmaterial.....	52
3.9.6	Ringversuch der AVID-Arbeitsgruppe "Molekularbiologische Methoden in der Tierseuchendiagnostik" zum Nachweis von <i>Cp. psittaci</i> (Psittakose-Ringversuch) mit dem entworfenen Assay 1	54
3.9.7	DNA-Microarray-Assay	57
3.9.8	Statistische Auswertung.....	58
4	ERGEBNISSE.....	59
4.1	Eigenschaften der Spezies-spezifischen Real-Time PCR-Assays	59
4.1.1	Sonden- und Primerkonzentration	59
4.1.2	Spezifität und Sensitivität	61
4.1.3	Nachweisgrenze.....	63
4.1.4	Reproduzierbarkeit.....	73

4.2	Nachweis von <i>Chlamydia</i> und <i>Chlamydophila</i> spp. bei Haustieren	76
4.2.1	Richtlinien für die Befundung der Untersuchungsergebnisse	76
4.2.2	Übersicht über die Ergebnisse in den verschiedenen Real-Time PCR-Assays.....	77
4.2.3	Papageien, Sittiche und Tauben	81
4.2.4	Wiederkäuer	82
4.2.5	Schweine	83
4.2.6	Pferde	84
4.2.7	Heimtiere	84
4.3	Vergleich von Real-Time PCR- und DNA-Microarray-Ergebnissen.....	85
4.4	Ergebnisse des Psittakose-Ringversuchs.....	87
5	DISKUSSION.....	93
5.1	Methodik der Spezies-spezifischen Real-Time PCR-Assays.....	93
5.2	Vergleichende Untersuchungen mit Spezies-spezifischen Microarrays (NRL).....	98
5.3	Psittakose-Ringversuch.....	100
5.4	Verbreitung von <i>Chlamydia</i> und <i>Chlamydophila</i> spp. bei Haustieren.....	102
5.5	Schlussfolgerungen	107
6	ZUSAMMENFASSUNG	109
	SUMMARY.....	111
7	LITERATURVERZEICHNIS.....	113
	ANHANG	143
	DANKSAGUNG	160

ABKÜRZUNGEN

A. dest.	destilliertes Wasser (Aqua destillata)
Best.-Nr.	Bestell-Nummer
BGM	Buffalo-Green-Monkey-Kidney
bp	Basenpaare
C	Celsius
C.	<i>Chlamydia</i>
cm	Zentimeter
Cp.	<i>Chlamydophila</i>
C _T	Threshold cycle: Anzahl der Zyklen, bei der das Fluoreszenz-Signal einen automatisch errechneten Schwellenwert zum ersten Mal übersteigt. Je niedriger der C _T -Wert ist, desto stärker fällt die Reaktion in der Real-Time PCR aus.
CVUAS	Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Stuttgart
dest.	destilliert
d. h.	das heißt
EBE	Einschlusskörperchen-bildende Einheit
evt.	eventuell(e)
Fa.	Firma
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
IFU	Inclusion Forming Unit (Einschlusskörperchen-bildende Einheit)
kDa	Kilodalton
LNA	Locked Nucleic Acid
LPS	Lipopolysaccharid
MGB	Minor Groove Binder
Mm	Millimeter
min	Minute(n)
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NRL	Nationales Referenzlabor für Psittakose, Institut für molekulare Pathogenese, Friedrich-Loeffler-Institut Jena
RFLP	Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus
sec	Sekunde(n)
h	Stunde(n)

g	Erdbeschleunigung
l	Liter
o. g.	oben genannte(r/n)
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
sog.	so genannt(e/en/er)
vgl.	vergleiche
VO	Verordnung

1 EINLEITUNG

Chlamydien ist es wie kaum einer anderen Bakteriengruppe im Laufe der Evolution gelungen, sich einerseits an derart viele Wirtsorganismen anzupassen und andererseits bei Tier und Mensch unterschiedlichste Krankheitsbilder hervorzurufen. So beeindrucken einige Chlamydienarten nicht nur durch ihr immenses Wirtsspektrum, das sich von wirbellosen über wechselwarme Tiere bis hin zu Vögeln und Säugetieren erstreckt, sondern auch durch ihre natürliche Übertragbarkeit vom Tier auf den Menschen. Dies macht diese Chlamydienarten zu wichtigen bakteriellen Zoonoseerregern, weshalb der Gesetzgeber diese Erreger in verschiedenen Verordnungen des Tierseuchenrechts berücksichtigt hat. Hervorzuheben ist in diesem Zusammenhang vor allem die Spezies *Chlamydomphila (Cp.) psittaci*, die bisher allein bei über 400 Vogelarten nachgewiesen werden konnte (**133**). Besondere Bedeutung haben hochvirulente Stämme dieses Erregers, die die von Papageien und Sittichen auf den Menschen übertragbare Psittakose (Papageienkrankheit) hervorrufen. Aufgrund schwerwiegender Erkrankungen bei infizierten Personen wurde diese Zoonose in die Liste der anzeigepflichtigen und damit staatlich bekämpften Tierseuchen aufgenommen (**34, 36**). Dem entgegen werden Infektionen anderer Vögel mit *Cp. psittaci*-Stämmen als Ornithose bezeichnet und fallen somit nicht unter die Anzeigepflicht, können aber ebenfalls nach der Psittakose-Verordnung staatlich bekämpft werden. Der Gesetzgeber hat darüber hinaus Chlamydieninfektionen generell aufgrund ihres hohen zoonotischen Potentials als Chlamydiosen (Infektion mit *Chlamydomphila*-Spezies) in der Zoonose-Verordnung 2004 (**37**) und der Verordnung über meldepflichtige Tierkrankheiten 2005 (**35**) berücksichtigt. Während die durch *Cp. psittaci* verursachte Psittakose als eine von Papageien auf Menschen übertragbare Krankheit schon 1879 beschrieben worden ist (**209**), sind von Schafen und Ziegen stammende *Cp. abortus*-Stämme (**41, 128, 196, 272**) erst seit sehr viel kürzerer Zeit als wichtige Zoonoseerreger bekannt. Über das Vorkommen der verschiedenen Chlamydien-Spezies bei anderen Haustieren wie Pferd, Rind, Schwein, Katze, Hund, Meerschweinchen und Kaninchen ist insbesondere nach der taxonomischen Neuordnung der ehemaligen Gattung *Chlamydia* bisher noch wenig bekannt. Denn untrennbar verbunden mit tierseuchenrechtlichen Bestimmungen und Untersuchungen zum Vorkommen und zur Bedeutung der einzelnen Chlamydien-Spezies als Krankheitserreger sind

taxonomische Studien. Diese haben erst in jüngster Zeit zu einer völlig neuen Einteilung in die Gattungen *Chlamydia* (*C.*) mit den 3 Spezies *C. trachomatis*, *C. muridarum* und *C. suis* sowie der Gattung *Chlamydophila* (*Cp.*) mit den 6 Spezies *Cp. psittaci*, *Cp. abortus*, *Cp. pecorum*, *Cp. felis*, *Cp. pneumoniae* und *Cp. caviae* geführt (77).

Der Nachweis von Chlamydien stellt jedoch nach wie vor nicht nur wegen der aufwändigen Anzucht ausschließlich in lebenden Zellen sondern auch wegen der zahlreichen Spezies eine besondere Herausforderung dar. Eine entscheidende Verbesserung hat die Chlamydiendiagnostik durch die Einführung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) erfahren. Dennoch ist in der Routinediagnostik bisher noch kein robustes Testsystem etabliert, das eine sensitive und zugleich zuverlässige wie auch rasche Speziesdifferenzierung dieser Bakterien und somit eine Beurteilung der unterschiedlichen zoonotischen Potentiale erlaubt. Dies ist aber spätestens nach der Neufassung der Psittakose-Verordnung vom 20.12.2005 unerlässlich (36). So gehört zur Feststellung eines Falles von Psittakose oder Ornithose der Spezies-spezifische Nachweis des Erregers *Cp. psittaci*. Dieser Standpunkt wird auch von der EU-Kommission vertreten (Zitat BMVEL, 32). Die Notwendigkeit einer Speziesdifferenzierung der Chlamydien gemäß der neuen Taxonomie unterstreichen außerdem aktuelle Untersuchungen von Nutzgeflügelarten wie Puten und Hühnern (230) sowie von 113 verschiedenen Vogelarten (46), bei denen neben *Cp. psittaci* auch *Cp. abortus* nachgewiesen werden konnte.

Die vorliegende Arbeit verfolgte deshalb die folgenden Ziele:

- Entwicklung und Etablierung eines sensitiven und zuverlässigen Real-Time PCR-Assays für die Routinediagnostik zum Nachweis von *Cp. psittaci* bei papageienartigen (Psittakose) und anderen Vögeln (Ornithose) gemäß den Anforderungen der Psittakose-Verordnung (32, 36).
- Entwicklung und Etablierung von Real-Time PCR-Assays zum differenzierten Nachweis von *Cp. abortus*, *Cp. pecorum*, *Cp. felis*, *Cp. caviae* und *C. suis*.
- Bestimmung des Vorkommens und der Häufigkeitsverteilung von *Cp. psittaci*, *Cp. abortus*, *Cp. pecorum*, *Cp. felis*, *Cp. caviae* und *C. suis* bei Haussäugetieren in Deutschland.
- Eignungsprüfung für eine neue Microarray-Technik zum Spezies-spezifischen Nachweis von Chlamydien-DNA in klinischem Probenmaterial von Tieren.

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 Eigenschaften der Chlamydiales

2.1.1 Morphologische und biochemische Eigenschaften

Chlamydien sind kokkoide, unbewegliche Bakterien. Die Zellwand der Chlamydien ist der von gramnegativen Bakterien ähnlich. Sie enthält jedoch typischerweise kein Peptidoglycan, wobei Genomsequenzierungen gezeigt haben, dass nahezu alle für die Synthese von Petidoglycan benötigten Gene vorhanden sind. Die Außenmembran wird aus dem Lipopolysaccharid (LPS) und dem Major Outer Membran Protein (MOMP), das bis zu 60 % der Proteinfraction dieser Membran ausmacht, gebildet (217). Chlamydien sind obligat intrazelluläre Bakterien deren Vermehrung in ihren Wirtszellen durch einen einzigartigen Lebenszyklus mit zwei hauptsächlichen Erscheinungsformen gekennzeichnet ist. Die mit 0,2 bis 0,6 µm relativ kleinen kokkoiden Elementarkörperchen kommen extrazellulär vor und stellen die infektiöse jedoch metabolisch inaktive Form der Chlamydien dar. Die in zytoplasmatischen Einschlüssen existierenden, metabolisch aktiven und damit vermehrungsfähigen Retikularkörperchen sind mit einem Durchmesser von 0,5 bis 1,5 µm vergleichsweise größer und von pleomorpher Form (7). Die in den Einschlüssen bei der Transformation von Retikular- zu Elementarkörperchen entstehende Zwischenform wird als Intermediärkörperchen (0,3 bis 1 µm) bezeichnet (262).

2.1.2 Entwicklungszyklus und Tenazität

Chlamydien verfügen über einen komplexen Reproduktionszyklus, der unter den Bakterien als einzigartig gilt. Dieser verläuft unter Ausprägung der oben genannten unterschiedlichen Erscheinungsformen und ist in **Abbildung 1** schematisch dargestellt.

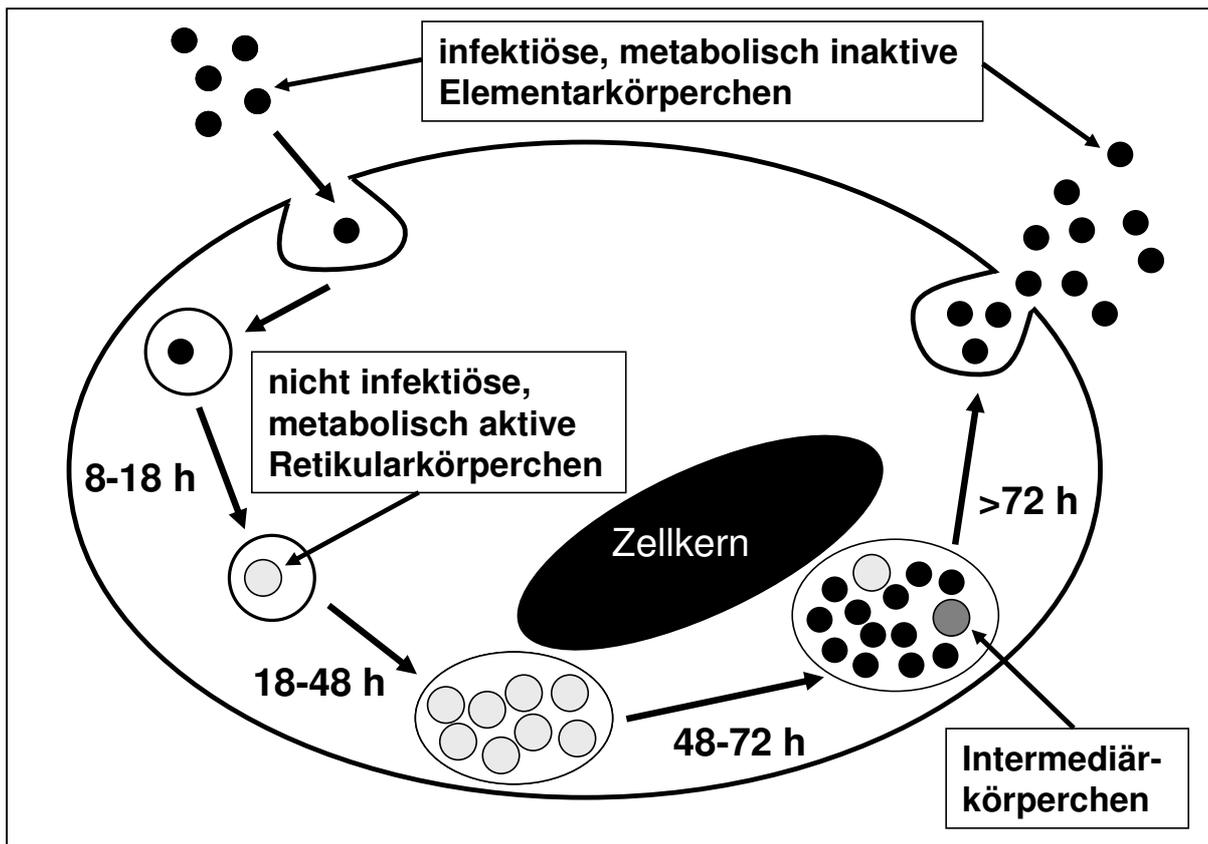


Abbildung 1: Reproduktionszyklus der Chlamydien in einer Wirtszelle. Die angegebenen Zeiten sind Richtwerte und können je nach Spezies sehr unterschiedlich sein.

Initiiert wird der Entwicklungszyklus, der abhängig von der Chlamydien-Spezies zwei bis drei Tage dauert, durch eine rezeptorvermittelte Endozytose infektiöser, metabolisch inaktiver Elementarkörperchen in die kernhaltige eukaryotische Wirtszelle (11, 172). Die in den Phagosomen (membranhüllte Vakuolen) vorhandenen Erreger verhindern deren Fusion mit Lysosomen zu Phagolysosomen, die zur Abtötung des Erregers führen würde (71, 222). Des Weiteren wird ein Überleben infizierter Wirtszellen und damit der Chlamydien durch Hemmung der Apoptose gewährleistet (42, 191). Die Elementarkörperchen entwickeln sich zu nicht infektiösen, metabolisch aktiven Retikularkörperchen und vermehren sich durch binäre Teilung innerhalb der Vakuole, die in der Zelle mikroskopisch als sog. Einschlusskörperchen sichtbar wird. Die für diese Entwicklung notwendige Energie gewinnen Chlamydien nicht aus eigenem metabolischem Stoffwechsel, sondern nutzen das von der Wirtszelle synthetisierte energiereiche Adenosintriphosphat (ATP). Aus diesem Grunde werden Chlamydien auch als sog. „Energieparasiten“

bezeichnet (**5, 7, 172, 274**). Nach mehreren Teilungen werden die Retikularkörperchen schließlich über Intermediärkörperchen zu Elementarkörperchen transformiert, die durch Zellyse oder Exozytose aus der Wirtszelle freigesetzt werden und somit weitere Wirtszellen infizieren können (**172**). Die Tenazität der Elementarkörperchen von Chlamydien ist außerhalb von Zellen hoch. So bleiben die pathogenen Chlamydien beispielsweise in eingetrocknetem Kot bis zu einem Monat, in Einstreu, Staub und Federn sogar bis zu einem halben Jahr infektiös. Dieser Umstand ist für die überwiegend durch Inhalation von erregerehaltigen Staub und Aerosolen verursachten Infektionen mitbestimmend (**232**).

2.1.3 Antigenstrukturen

Chlamydien besitzen Gattungs-, Familien- sowie Spezies-spezifische Antigene, die hauptsächlich in der Zellwand lokalisiert sind. Zu den Gattungsspezifischen Antigenen gehört das thermostabile Lipopolysaccharid (LPS) mit dem spezifischen Epitop im 3-Desoxy-D-manno-Octulonsäure (KDO)-Trisaccharid und die Heat-Shock-Proteine (Hsp) 60 und 70 (60 bzw. 70 kDa). Das Major Outer Membrane Protein (MOMP), das durch das sog. *ompA*-Gen kodiert wird, trägt neben Gattungsspezifischen Epitopen auch Spezies-, Subspezies- und Serovar-spezifische Epitope in der Tertiärstruktur des Proteins und stellt somit ein sehr bedeutendes Antigen für die Chlamydiendiagnostik dar. Das *ompA*-Gen mit durchschnittlich 1290 Nukleotiden gilt aus phylogenetischer Sicht als hochkonserviert (**139**). Neben hochkonservierten Bereichen sind zusätzlich vier variable Domänen (VD I bis IV) zu erkennen, deren Nukleotidsequenzen sich in unterschiedlichen Spezies hinsichtlich Länge und Basenfolge unterscheiden (**10, 229**). Das *Large Cysteine-Rich*-Protein wird durch das *ompB*-Gen kodiert und ist essentiell für die Umwandlung von Retikularkörperchen zu Elementarkörperchen (**101**).

2.1.4 Persistenz

Als Persistenz wird die Überlebensfähigkeit von Chlamydien in der Wirtszelle über längere Zeit bezeichnet, in der die Chlamydien zwar vital aber nicht kultivierbar sind (**16, 45**). Bei der Persistenz wird der Entwicklungszyklus der Chlamydien durch intrazelluläre Veränderungen wie z.B. Nährstoffmangel (Aminosäuren [**50**], Eisen [**205**]), Antibiotika- (Penicillin G [**163**]) oder Cytokin-Behandlung (TNF- α , IFN- γ [**15**])

unterbrochen, was zur Ausbildung einer morphologisch veränderten Form dieser Erreger führt. Es konnte gezeigt werden, dass mit der Ausbildung und Aufrechterhaltung des persistenten Zustands eine Herunterregulation bestimmter Gentranskripte einhergeht, was auf eine Überlebensform hinweist, die die Chlamydien für eine längere Zeit in der Wirtszelle ohne Zellteilung aber mit metabolischer Aktivität annehmen (89). Bei für Chlamydien günstigeren äußeren Bedingungen ist eine Reaktivierung dieser Form möglich. Das Persistenzphänomen der Chlamydien wird mit der Entstehung chronischer Erkrankungen (Trachom, Arthritis, kardiovaskuläre und chronische Atemwegserkrankungen) in Verbindung gebracht (16).

2.2 Taxonomie der Chlamydiales

Die Ordnung der Chlamydiales hat in den letzten Jahren eine grundlegende taxonomische Revision erfahren. Bis zum Jahr 1980 gehörten dieser Ordnung lediglich die schon 1957 vorgeschlagene und älteste Familie Chlamydiaceae an (201). Alle Bakterien mit für Chlamydien typischen morphologischen und chemischen Eigenschaften (obligat intrazelluläre Erreger mit für Chlamydien typischem Reproduktionszyklus und Identität der 16S- und 23S-rRNA-Gene zu über 80 %) wurden entweder der Spezies *Chlamydia trachomatis* (Akkumulation von Glycogen in den Einschlusskörperchen, Sulfadiazin-Empfindlichkeit) oder *Chlamydia psittaci* (keine Akkumulation von Glycogen in den Einschlusskörperchen, Sulfadiazin-Resistenz) zugeordnet (185, 186, 233). Durch die Entwicklung der DNA-DNA-Hybridisierung konnten insgesamt 8 Chlamydien-Spezies differenziert werden, wobei die Spezies *Chlamydia pneumoniae* (90) und *Chlamydia pecorum* (80) neu benannt wurden. DNA-Sequenzierungen führten 1993 zur Identifizierung einer vom Schwein isolierten *Chlamydia trachomatis*-like *Chlamydia* (139) mit Sulfadiazin-Resistenz.

Untersuchungen zu Phänotyp, assoziierten Krankheiten, Antigenstrukturen, Wirtsspektrum und Biologie bekräftigten zunächst die Aufteilung in 9 verschiedene Chlamydien-Spezies innerhalb der Chlamydiaceae (77, 139, 243), deren 16S-rRNA-Gene zu über 90 % identisch sind (199, 243). Bis zum Jahr 1999 gehörte der Ordnung Chlamydiales jedoch ausschließlich die Familie Chlamydiaceae mit der Gattung *Chlamydia* (*C.*) und den vier genannten Spezies an (111).

Vor allem phylogenetische Analysen der 16S- und 23S-rRNA-Gene führten im Jahr 1999 zur Revision der Chlamydien-Taxonomie (74, 77). Die Ordnung der Chlamydiales beinhaltet nun neben der ursprünglichen schon 1957 vorgeschlagenen und ältesten penicillinempfindlichen Familie Chlamydiaceae (201) drei weitere penicillinresistente Familien, Parachlamydiaceae, Simkaniaceae und Waddliaceae (130).

Die Spezies *Neochlamydia hartmanellae* und *Parachlamydia acanthamoeba*, Vertreter der Familie Parachlamydiaceae, wurden als Endosymbionten in Amöben (*Acanthamoeba* bzw. *Hartmanella vermiformis*) festgestellt. Der Nachweis von Elementar- und Retikularkörperchen dieser Spezies im Zytoplasma und nicht in membranumhüllten Vakuolen in der Wirtszelle zeigt, dass sich der Reproduktionszyklus dieser Familie am meisten von dem der Chlamydiaceae unterscheidet (79). Eine Beteiligung an Atemwegserkrankungen des Menschen wird angenommen, ist aber noch nicht ausreichend geklärt (71, 92).

Simkania negevensis ist die bisher einzige Spezies der Familie Simkaniaceae und an Kontaminationen von Zellkulturen und an Atemwegserkrankungen des Menschen beteiligt (71, 131, 151). Sie reagiert nicht mit monoklonalen Antikörpern gegen LPS-Trisaccharide, MOMP und *Large Cysteine-Rich-Protein* (130).

Die Spezies *Waddlia chondrophila* wurde aus Abortmaterial vom Rind isoliert, wobei ihre ursächliche Beteiligung an Aborten vermutet wird (26, 61, 109, 215). In Laboruntersuchungen reagierte *Waddlia chondrophila* nicht mit Antiseren gegen *Chlamydia* und *Chlamydophila* (60) und ein nicht näher identifizierter *Parachlamydia*-Stamm reagierte nicht mit Antikörpern gegen Chlamydiaceae-LPS (21). Bei *Waddlia malaysiensis* handelt es sich um eine bei Fledermäusen nachgewiesene Spezies (47).

Eine neue Familie innerhalb der Ordnung Chlamydiales wird durch den *Chlamydia*-like-Organismus Candidatus *Piscichlamydia salmonia* repräsentiert. Dieser mit einer hohen Mortalität bei Zuchtfischen einhergehende Erreger wurde in Kiemen von Lachsen in Verbindung mit der Erkrankung Epitheliocystis nachgewiesen (63, 149).

Die für Säugetiere und Vögel besonders relevanten Chlamydien der Familie Chlamydiaceae wurden in die zwei Gattungen *Chlamydia* (*C.*) und *Chlamydophila* (*Cp.*) mit Identität der 16S- und 23S-rRNA-Gene zu über 97 % bzw. 95 % (199, 243) und die 9 Spezies *C. trachomatis*, *C. muridarum*, *C. suis*, *Cp. psittaci*, *Cp. abortus*, *Cp. caviae*, *Cp. felis*, *Cp. pecorum* und *Cp. pneumoniae* unterteilt (vgl. **Tabelle 1**).

Die Einteilung der Chlamydiaceae in zwei Gattungen wird auch durch Analysen des *ompA*-Gens (**139**), welches für das MOMP (Major Outer Membrane Protein) kodiert, belegt. Zusätzlich untermauern vergleichende Analysen von weiteren Sequenzdaten für die Gene des GroEL-Chaperonins, der KDO-Transferase, des *Small Cysteine-Rich*-Lipoproteins und des *Large Cysteine-Rich*-60-kDa-Proteins diese neue Einteilung (**38**).

Ein Nachweis aller Spezies der Chlamydiaceae ist mittels monoklonaler Antikörper gegen LPS-Trisaccharide möglich (**155**), mit monoklonalen Antikörpern gegen Epitope des MOMP (NPTI, NLNPTI, LNPTIA oder LNPTI) werden die Spezies der Gattung *Chlamydia* festgestellt. Serovare der Spezies *Cp. psittaci*, die durch Sequenzierungen des *ompA*-Gens nachvollziehbar sind (**77, 83**), können ebenfalls mit spezifischen monoklonalen Antikörpern gegen MOMP (**2, 4, 6, 64, 83, 242, 256, 258**), mit spezifischen Real-Time PCR-Assays (**84**) oder anhand des Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus (RFLP) von PCR-Amplicons (**220, 258**) nachgewiesen werden.

Bisher können 9 verschiedene Sero-/Genotypen des *ompA*-Gens unterschieden werden (A, B, C, D, E, F, E/B, WC und M56). Es wurde angenommen, dass die Chlamydien-Stämme der einzelnen Sero-/Genotypen überwiegend endemisch bei unterschiedlichen Wirtsvögeln vorkommen. So sind die Serovare A und F bei Psittaziden, die Serovare B und E bei Tauben, das Serovar C bei Enten und Gänsen, das Serovar D bei Puten und das Serovar E/B bei Enten besonders häufig nachweisbar. Die Serovare WC und M56 wurden bei Rindern bzw. Schneehasen und Bisamratten entdeckt. Dennoch besitzen die einzelnen Serovare keine absolute Wirtsspezifität, wie Vanrompay et al. mit Isolaten des eigentlich für Tauben typischen Sero-/Genotyps B aus Hühnern und Puten zeigen konnten (**258**).

Tabelle 1: Vergleich zwischen alter und neuer ¹⁾ Taxonomie der Familie Chlamydiaceae (176, 217)

Alte Taxonomie	Neue Taxonomie
<i>Chlamydia trachomatis</i>	<i>Chlamydia trachomatis</i>
	<i>Chlamydia muridarum</i>
	<i>Chlamydia suis</i>
<i>Chlamydia psittaci</i>	<i>Chlamydophila psittaci</i>
	<i>Chlamydophila abortus</i>
	<i>Chlamydophila caviae</i>
	<i>Chlamydophila felis</i>
<i>Chlamydia pecorum</i>	<i>Chlamydophila pecorum</i>
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	<i>Chlamydophila pneumoniae</i>

Erklärung: ¹⁾ Taxonomie nach Everett et al., 1999 (77)

2.3 Medizinische Bedeutung der Chlamydiaceae

2.3.1 Vögel

Chlamydien konnten bei bereits 496 Vogelarten in 30 Ordnungen nachgewiesen werden (133). Da die aviäre Chlamydiose zunächst nur bei Papageien, Sittichen und Menschen, die in Kontakt mit diesen Vögeln standen, beobachtet wurde, bezeichnete man diese Erkrankung als Psittakose oder Papageien-Fieber. Im Jahr 1941 wurde für die Chlamydien-bedingte Erkrankung bei frei lebenden Vögeln sowie Hausgeflügel (Hühner, Puten, Enten) der Begriff „Ornithose“ eingeführt (167). Der Begriff „Psittakose“ kommt heute noch häufig für die Beschreibung der Erkrankung bei Menschen zur Anwendung. Für die Erkrankung von Vögeln wird die Bezeichnung „aviäre Chlamydiose“ mittlerweile bevorzugt, da die bei Psittaziden und anderen Vogelarten durch Chlamydien hervorgerufenen Erkrankungen ähnlich zu sein scheinen (4). Die meisten aviären Chlamydiosen werden durch die Spezies *Cp. psittaci* verursacht, weniger häufig durch die Spezies *Cp. abortus* (46, 230). *Cp. abortus* scheint aus heutiger Sicht keine besondere Bedeutung bei der aviären

Chlamydiose zu spielen. So konnten nach einer künstlich herbeigeführten Infektion mit einem ovinen *Cp. abortus*-Stamm bei Puten entweder keine oder nur milde Anzeichen einer Erkrankung festgestellt werden (245).

In Abhängigkeit von der Infektionsdosis, der Virulenz des Chlamydien-Stammes, der Empfänglichkeit und dem Immunstatus des Wirtes sowie von Umwelteinflüssen verläuft die aviäre Chlamydiose akut, subakut bis protrahiert oder chronisch, wobei der klinisch inapparente Infektionsverlauf bei adulten Vögeln am häufigsten auftritt (217). Bei klinischer Manifestation dominieren unspezifische Symptome wie Apathie, Anorexie, Konjunktivitis, Keratokonjunktivitis, Zittern, Krämpfe, Lähmungen, struppiges Gefieder und Abmagerung (132). Ist der Verdauungstrakt betroffen, kommt es zum Absatz von hellgrünem oder grau-wässrigem Kot.

Die horizontale Erregerübertragung erfolgt hauptsächlich durch die Inhalation von erregerhaltigem Staub oder Aerosolen aus Federn, Sekreten oder Kot, aber auch durch die perorale Aufnahme des Erregers (242). Die vertikale Übertragung von Chlamydien wurde bereits bei Hühnern, Enten, Papageien, Möwen, Gänsen und Puten beschrieben (124, 150, 157, 169, 278, 281). Zum Zoonoseaspekt der aviären Chlamydiosen siehe Kapitel 2.4.

2.3.2 Säuger

2.3.2.1 Schafe und Ziegen

Besonders fulminant und seuchenhaft verlaufende, mit Fehlgeburten als Leitsymptom einhergehende Chlamydien-Infektionen kennt man bei Schafen. Diese werden deshalb als enzootischer Schafabort bezeichnet. Ursächlicher Erreger ist *Cp. abortus*, der in zahlreichen Ländern Europas nicht nur für mehr als 50 % der Abortfälle bei Schafen verantwortlich gemacht wird, sondern unter den infektiösen Abortursachen der kleinen Wiederkäuer auch an erster Stelle zu nennen ist (206). Die Infektion des weiblichen Genitale löst bei Mutterschafen und –ziegen nicht nur Fehlgeburten aus, sondern führt auch zu anderen Fruchtbarkeitsstörungen (179, 187, 188, 212). Neben Pneumonien und Enteritiden sind auch durch *Cp. pecorum* hervorgerufene Konjunktividen und Polyarthritiden bei Mutterschafen und deren Neugeborenen beschrieben (129, 179). Der Nachweis von Chlamydien in

Schafsmilch (277) zeigt, dass auch der perorale Infektionsweg epidemiologisch wichtig sein kann (173).

2.3.2.2 Rinder

In Rinderbeständen sind Chlamydien sehr weit verbreitet und als Ursache infektiöser Faktorenkrankheiten beschrieben (127, 217). Bei den Chlamydien-Spezies die bisher bei Rindern nachgewiesen werden konnten, handelt es sich um *Cp. abortus*, *Cp. psittaci* und *Cp. pecorum* (27, 127, 143, 253), wobei vor allem die Spezies *Cp. abortus* mit Aborten und Endometritiden in Verbindung gebracht wird. Zahlreiche Fachpublikationen deuten auf die Beteiligung von Chlamydien an Erkrankungen des Genital- (28, 137, 197, 231, 279) und Respirationstrakts hin (252). Eine Infektion im zweiten Drittel der Trächtigkeit ruft Verkälben im sechsten bis achten Monat hervor (85). Darüber hinaus werden Chlamydien nicht selten in Zusammenhang mit Polyarthritiden, Polyserositis, Mastitis, Enteritis, Keratokonjunktivitis und Enzephalomyelitis beobachtet (138, 162, 234). Der Nachweis von Chlamydien gelang nicht nur aus dem weiblichen Genitale, sondern auch aus Spermaproben von Besamungsbullen. Die Bedeutung dieses Befundes im Hinblick auf Fortpflanzungsstörungen kann bisher aber noch nicht eingeschätzt werden (143, 247). Zusätzlich konnten Chlamydien auch in Kotproben von latent infizierten Rindern festgestellt werden, die somit eine wichtige Infektionsquelle in Rinderbeständen darstellen (280).

Aber nicht nur Chlamydien im engeren Sinne, sondern auch das vor einigen Jahren entdeckte Bakterium *Waddlia chondrophila*, das in einem Rinderfetus nachgewiesen werden konnte, wird in Verbindung mit Abortereignissen beim Rind gebracht (27, 61, 109, 215). Beim Rind sind orale, aerogene, genitale, laktogene und konjunktivale Infektionen von Chlamydien beschrieben worden (28, 85, 143, 231, 267).

2.3.2.3 Schweine

Bei den Chlamydiosen des Schweins sind es die Spezies *C. suis* (44, 142), *Cp. psittaci* (142, 246), *Cp. abortus* (44) und *Cp. pecorum* (142), die für Infektionskrankheiten auch in Zusammenspiel mit anderen Erregern verantwortlich gemacht werden. Im Einzelnen wurden Aborte bei Sauen, Polyarthritiden bei Ferkeln, Genitalerkrankungen bei Ebern sowie Diarrhoe, Atemwegserkrankungen und

Konjunktividen in betroffenen Betrieben beobachtet (**39, 207, 213, 237, 282**). Experimentelle Infektionen haben gezeigt, dass aerogene Infektionen mit *C. suis* zu schweren respiratorischen Erkrankungen führen, aber auch klinisch unauffällig verlaufen können (**207, 214, 218**). Wie auch beim Rind ist der Nachweis von Chlamydien in Sperma gelungen, wobei nicht die häufig mit Genitalinfektionen einhergehende Spezies *Cp. abortus*, sondern *Cp. psittaci*, *C. suis*, *Chlamydia*-like Bakterien und sporadisch auch *Cp. pecorum* gefunden wurden (**142, 246, 267**). Die Bedeutung dieser Ergebnisse im Hinblick auf die venerische Übertragung von Chlamydien ist allerdings auch beim Schwein noch unklar.

2.3.2.4 Pferde

Der Nachweis von Chlamydien in abortierten Pferdefeten (**23, 88**) lässt auf eine Beteiligung dieser Erreger an Aborten schließen (**217**). Isolate aus Abortfällen von Pferden wurden in zwei Fällen als *Cp. psittaci* differenziert (**110, 236**). Der Nachweis von *C. psittaci* (alte Taxonomie) im Respirationstrakt war mit Pneumonien verbunden (**164**), aber auch bei gesunden Tieren möglich (**160**). Studien in Italien zufolge waren bei 26,5 % der mittels Mikroimmunfluoreszenz (MIF) -Test untersuchten Pferdeseren Antikörper gegen *Cp. pneumoniae* vorhanden, wobei einige Serumproben auch schwach mit *Cp. psittaci* reagierten (**58**). Interessant ist auch ein im Jahresbericht 2006 des Friedrich-Loeffler-Instituts veröffentlichter Befund, wonach *Cp. caviae* bei Pferden erstmals aus Augen- und Nasentupferproben isoliert wurde (**31**).

2.3.2.5 Katzen

Infektionen mit Chlamydien sind bei dieser Tierart sehr weit verbreitet. Dies haben sowohl Untersuchungen zum direkten wie auch indirekten Nachweis dieses Erregers nicht nur bei Haus-, sondern auch bei Wildkatzen gezeigt (**171, 240, 284**). Die durch *Cp. felis* verursachte feline Chlamydiose geht mit Rhinitis, Konjunktivitis und Pneumonie einher (**82, 100, 118, 202, 250**). Eine Beteiligung der Chlamydien an multifaktoriellen Krankheiten wie dem Katzenschnupfenkomplex, oder auch als „Feline Upper Respiratory Disease (U.R.D.)“ bezeichnet, konnte bewiesen werden. Dabei können nicht nur über Inhalation, sondern auch peroral aufgenommene Chlamydien zu Atemwegserkrankungen führen (**82**). Bei über Monate bis Jahre bestehenden persistierenden Infektionen können klinische Symptome unter anderem

durch Stress oder Sekundärinfektionen durch z.B. Viren induziert werden. Bei persistierenden Infektionen ist eine vollständige Eliminierung der Chlamydien oftmals erst nach mehrmaliger Behandlung mit Doxycyclin erfolgreich (53). Die Bedeutung der zu den Parachlamydiaceae gehörenden *Chlamydia*-like-Organismen, die relativ häufig im Zusammenhang mit den für Chlamydien typischen Erkrankungen bei Katzen nachgewiesen werden, ist noch nicht ausreichend geklärt (239). Die Untersuchung von 30 gesunden Katzen und 226 an Konjunktivitis und Keratitis erkrankten Katzen ergab bei 39 % der Tiere den Nachweis von DNA, die eine Homologie von 99 % zu *Neochlamydia hartmanellae* aufwies (270). Des Weiteren konnten Chlamydien bei Katzen nicht nur von den Konjunktiven und dem Rachen, sondern auch aus dem Magen (99) und dem Genitaltrakt isoliert werden. Eine Beteiligung von Chlamydien an Erkrankungen des Genitaltrakts ist jedoch fraglich (239). Eine Katze erkrankte einen Monat nach der Einführung eines Aras in den Haushalt an einer Konjunktivitis, wobei *C. psittaci* (alte Taxonomie) aus einem Konjunktivaltupfer der Katze bzw. aus Vogelkot nachgewiesen wurde. Beide Tiere wurden erfolgreich mit Doxycyclin behandelt (153).

2.3.2.6 Hunde

Über das Vorkommen von Chlamydien bei Hunden ist bisher noch wenig bekannt. Festgestellt werden konnten Chlamydien in Einzelfällen in der Gelenkflüssigkeit im Zusammenhang mit einer Polyarthrit (148), bei Artherosklerose (219), Enzephalitis (87) und in einem Pleura-Erguss (9). Des Weiteren gelang der Nachweis von *Cp. abortus* bei einem Hund mit Konjunktivitis (116).

2.3.2.7 Meerschweinchen und kleine Säugetiere

Die Spezies *Cp. caviae* wurde bei Meerschweinchen mit Konjunktivitis (235) und Infektionen des Urogenitaltraktes (203, 204) nachgewiesen. *Cp. caviae* konnte bei einem Kaninchen, das mit Meerschweinchen vergesellschaftet war, ebenfalls isoliert werden (158). Zudem ergaben serologische Untersuchungen im Osten der Slowakei, dass Chlamydien mit einer Prävalenz von 12,9 % auch bei kleinen Säugetieren, wie Insektenfressern und Nagetieren, weit verbreitet sind (48). Als Erreger von Pneumonien und Genitalinfektionen bei Mäusen ist *C. muridarum* bekannt (180).

2.3.2.8 Mensch

Zu den bisher bekannten Erregern humaner Chlamydien-Infektionen gehören *C. trachomatis*, *Cp. pneumoniae*, *Cp. psittaci* und *Cp. abortus*. *C. trachomatis* kommt weltweit vor und verursacht beim Menschen je nach Serotyp und bei entsprechender Inokulation entzündliche Erkrankungen am Auge (Serotypen A, B, Ba, C) oder im Genitaltrakt (D bis K, L1 - L3). Auch bei direktem Kontakt verlaufen viele Infektionen jedoch asymptomatisch, was die weite Verbreitung des Erregers begünstigt. In Entwicklungsländern leiden vor allem Kinder an dem durch *C. trachomatis* verursachten Trachom, einer chronischen Konjunktivitis, die bei ausbleibender Behandlung mit Erblindung enden kann (248). *C. trachomatis*-Serotypen mit Affinität zum Genitaltrakt zählen in den Industrieländern gegenwärtig zu den am häufigsten sexuell übertragenen Erregern. Spätfolgen chronischer Infektionen sind Unfruchtbarkeit und Sterilität sowie reaktive Arthritis. Ist der Geburtskanal von Schwangeren entsprechend infiziert, können sich die Neugeborenen während der Geburt anstecken und nachfolgend an einer neonatalen Konjunktivitis (Ophthalmia neonatorum) und Pneumonie erkranken (17). Das ebenfalls durch *C. trachomatis* (Serovare L1-L3) verursachte Lymphogranuloma verum ist eine mit Ulcera und Lymphadenitis einhergehende Geschlechtskrankheit, die selten vorkommt und überwiegend in den Tropen verbreitet ist.

Cp. pneumoniae wird als Ursache für Pneumonien und Bronchitis beschrieben (91). In den meisten Fällen verlaufen die Erkrankungen jedoch mild. Die Übertragung erfolgt vermutlich durch Sekrete aus dem Respirationstrakt. Walter et al. (273) konnten bei einem Patienten mit Myokarditis eine Doppelinfection von *Cp. pneumoniae* und *Cp. psittaci* mittels PCR und Elektronmikroskopie nachweisen. Weiterhin wird über eine ätiologische Rolle von *Cp. pneumoniae* bei Asthma (97), der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD, 22), Sarkoidose (95) und Erythema nodosum (70) diskutiert. Die Bedeutung von Infektionen mit *Cp. psittaci* und *Cp. abortus* beim Mensch wird im Kapitel 2.4 erläutert.

2.3.3 Sonstige Wirtsspezies

Die enorme Anpassungsfähigkeit der Chlamydien wird durch ein sehr breites Wirtsspektrum unterstrichen. Nicht nur bei Säugetieren und Vögeln, sondern auch bei Arthropoden (168), Beuteltieren, Mollusken (232), Amphibien (31, 174, 175),

Reptilien (**122, 125, 265**) und Fischen (**63, 181**) konnten Chlamydien nachgewiesen werden. So wurde bei Nilkrokodilen mit akuter Hepatitis und Ödemen eine Infektion mit *C. psittaci* (alte Taxonomie) beschrieben (**122**). Mittels PCR wurde *Cp. pneumoniae* bei australischen Fröschen mit Anämie und Pneumonie festgestellt (**18**). Eine Infektion mit Candidatus *Piscichlamydia salmonia*, ein *Chlamydia*-like-Organismus, wurde in Kiemen von Lachsen in Verbindung mit der Erkrankung Epitheliocystis aufgezeigt (**63**). In Kalifornien wurden Chlamydien in Zecken und Flöhen nachgewiesen (**65**). *Chlamydia*-like Bakterien wurden im Hepatopankreas und in den Ovarien von Spinnen festgestellt (**183**). Emerson et al. (**69**) berichtet, dass die sich von Tränenflüssigkeit ernährende Fliegenart *Musca sorbens* wahrscheinlich der Hauptvektor der Trachominfektion der Menschen im Gambia ist.

2.4 Bedeutung von Chlamydien als Zoonoseerreger

Die bekannteste Chlamydiose des Menschen stellt die durch *Cp. psittaci* hervorgerufene Psittakose dar. Häufig waren es Papageien und andere exotische Vögel, von denen sogar Epidemien beim Menschen ausgingen, was in der Namensgebung Papageienkrankheit seinen Niederschlag gefunden hat. Heute weiß man, dass nicht nur *Cp. psittaci*-Stämme von Psittaziden schwere Erkrankungen beim Menschen verursachen können, sondern ähnlich schwere Verlaufsformen – hier als Ornithose bezeichnet – auch auf *Cp. psittaci*-Stämme von anderen Vögeln zurückzuführen sind (**81, 161**). Solche Infektionen rufen beim Menschen häufig unspezifische, grippeähnliche Symptome hervor, die aber auch in schwere Erkrankungsformen mit überwiegend atypischer Pneumonie, Endokarditis und Enzephalitis übergehen können (**51**). Die Übertragung auf den Menschen erfolgt hauptsächlich über die Inhalation von erregerrhaltigen Staub- oder Tröpfchenaerosolen. Im Infektionsschutzgesetz (§ 7) ist festgelegt, dass der Erregernachweis von *Chlamydia psittaci* beim Mensch meldepflichtig ist, sofern der Hinweis auf eine akute Infektion besteht. Dementsprechend wurden im Jahr 2007 10 Ornithose-Fälle gemeldet, im Jahr 2000 waren es noch 107. Es handelt sich hiermit um eine relativ selten gemeldete Erkrankung (**210**).

Alle Vögel, insbesondere Tauben und Greifvögel, die sehr häufig mit *Cp. psittaci* infiziert sind (**96, 152, 198, 244, 251**), gelten als potentielles Erregerreservoir. Die Vögel scheiden Chlamydien über Sekrete und Exkrememente aus. Berichte über

Erkrankungen bei Personen mit regelmäßigem und häufigem Kontakt zu Vögeln, wie beispielsweise Beschäftigte in Geflügelschlachthanlagen, Tierärzte und Vogelzüchter, weisen darauf hin, dass diese einem höheren Infektionsrisiko ausgesetzt sind als die Normalbevölkerung (**8, 102, 104, 112, 178, 264**). Eine Übertragung von Mensch zu Mensch ist hingegen äußerst selten und vom Menschen auf den Vogel bisher noch nicht beschrieben worden (**29, 268**). Auch wenn unter den Chlamydien aviäre *Cp. psittaci*-Stämme als besonders humanpathogen gelten (**217**), darf dies nicht darüber hinweg täuschen, dass auch andere Chlamydien-Spezies wichtige Zoonoseerreger sind. Unter diesen ist vor allen *Cp. abortus* zu nennen, der Erreger des enzootischen Schafabortes, der sich in den letzten Jahren als signifikante Gefahr für die Gesundheit vor allem schwangerer Frauen und deren ungeborenes Kind darstellte. So wurden in Verbindung mit Chlamydien-Aborten bei Schafen (**41, 52, 128, 141, 272, 283**) und Ziegen (**19, 195, 196, 269**) schwere fieberhafte Erkrankungen bis hin zu Fehlgeburten bei Frauen beobachtet. Aus diesem Grund empfahlen die Gesundheitsbehörden schwangeren Frauen zunächst in England, dann auch in anderen Ländern, sich vor allem während der Ablamperperioden von Schafen fernzuhalten (**66, 106**).

Die Bedeutung infizierter Rinder und Schweine als mögliche Ansteckungsquelle für den Menschen ist noch nicht ausreichend geklärt. Die Tatsache, dass auch die für den Menschen pathogenen Spezies *Cp. psittaci* und *Cp. abortus* bei Rindern und Schweinen vorkommen und eine Übertragung von Vögeln, bzw. kleinen Wiederkäuern auf diese Tierarten nicht auszuschließen ist, macht deutlich, dass auf diesem Gebiet noch Forschungsbedarf besteht (**27**). Fallberichte über Psittakose- oder Ornithose-ähnliche Symptome bei Personen mit Kontakt zu Schweinen und Rindern sowie die Häufung von serologisch positiven Befunden bei dieser Personengruppe untermauern die Befürchtung, dass von bovinen und porcinen Chlamydieninfektionen eine Zoonose-Gefahr ausgeht (**14, 145, 271**).

Unter den Heimtieren spielen aber nicht nur Vögel als Quelle für Chlamydiosen des Menschen eine wichtige Rolle, sondern auch der Kontakt zu Katzen und Meerschweinchen kann gesundheitliche Folgen haben. Bekannt ist, dass Personen, die zu Chlamydien-infizierten Katzen engen Kontakt hatten, an Konjunktivitis oder atypischer Pneumonie erkrankten (**12, 126, 221, 222, 224**).

Über die Beteiligung insbesondere von *Cp. felis* an systemischen Allgemeinerkrankungen oder schweren Erkrankungen innerer Organe wurde bisher

allerdings noch nicht berichtet (**30**). Zur zoonotischen Bedeutung von *Cp. caviae* liegt ein Fallbericht vor, der die Übertragung dieser üblicherweise beim Meerschweinchen vorkommenden Chlamydien-Spezies auf einen Menschen sowie auf eine in demselben Haushalt lebende Katze schildert (**158**).

Infektionen von Amphibien und Reptilien mit dem Erreger *Cp. pneumoniae*, der vor allem beim Menschen Lungeninfektionen verursacht, aber auch schon bei Infektionen von Pferden und Koalas auffiel, sind aufgrund der wachsenden Beliebtheit der Haltung dieser Tiere in den Mittelpunkt des Interesses gerückt (**24, 25, 120**).

Bei den Spezies *C. suis* und *C. muridarum* handelt es sich nach der Taxonomie durch Everett et al. (**77**) um neu benannte Spezies bei Schweinen bzw. Mäusen, die aus Biovaren der Spezies *C. trachomatis* hervorgegangen sind. Beide Spezies werden als Modell-Keime für die Simulation einer Infektion des Menschen mit *C. trachomatis* benutzt. Über ihr zoonotisches Potential liegen bisher keine Berichte vor.

Da bei Tieren verschiedene Chlamydien-Spezies nachgewiesen werden können, besteht nicht nur bei der Psittakose, sondern bei Chlamydien-Infektionen generell ein wachsendes Interesse an Spezies-spezifischen Diagnostikverfahren, gerade auch um die Frage des zoonotischen Potentials der verschiedenen Chlamydienarten besser einschätzen zu können.

2.5 Tierseuchenrechtliche Bestimmungen in Deutschland

Ende des 19. und Anfang des 20. Jahrhunderts waren von eingeführten Psittaziden ausgehende Chlamydien-Infektionen für schwere Epidemien mit beinahe Pandemie-ähnlicher Ausbreitung in Europa und den USA verantwortlich. Weil noch keine Möglichkeiten zur kausalen Therapie vorhanden waren, verstarben damals noch bis zu 40 % der erkrankten Personen. Aufgrund von mehr als 800 Erkrankungsfällen und zahlreichen Todesfällen im Jahr 1930 (**194**) wurde diese als Papageienkrankheit bezeichnete Psittakose 1934 als anzeigepflichtige Tierseuche im internationalen Tierseuchenrecht verankert (**134, 217**). Die von anderen Vogelarten ausgehende und in der Regel durch mildere Krankheitsverläufe bei diesen Tieren gekennzeichnete Ornithose wurde im deutschen Recht hingegen in die Liste der meldepflichtigen Tierkrankheiten aufgenommen (**35**).

Die Psittakose, das heißt die *Cp. psittaci*-Infektion bei Psittaziden, wird in Deutschland mit staatlichen Mitteln bekämpft. Die entsprechenden Schutzmaßnahmen sind gesetzlich geregelt, insbesondere in den Paragraphen 9 und 17g des Tierseuchengesetzes (**33**) und in der Verordnung zum Schutz gegen die Psittakose und Ornithose (Psittakose-Verordnung, **36**).

So ist unter anderem vorgeschrieben, dass Personen, die Papageien oder Sittiche züchten oder mit ihnen handeln, hierzu eine behördliche Genehmigung nach § 17g Tierseuchengesetz benötigen. Diese Genehmigung darf nur erteilt werden, wenn die verantwortliche Person die für die Bekämpfung der Psittakose erforderliche Zuverlässigkeit und Sachkunde besitzt und über einen Quarantänerraum verfügt. Ferner sind alle Psittaziden mit einem amtlichen Fußring zu kennzeichnen, auf dem eine jeweils individuelle, zentral vergebene Ringnummer angegeben ist. Händler und Züchter haben außerdem ein Bestandsbuch zu führen, in dem neben Herkunft und Verbleib der Tiere auch etwaige Behandlungen wegen Psittakose einzutragen sind.

Die Psittakose-Verordnung gibt die Maßnahmen vor, die ergriffen werden müssen, wenn die Psittakose bei den Psittaziden eines Züchters oder Händlers ausbricht oder der Verdacht besteht, dass die Psittakose ausgebrochen ist. Die Maßnahmen zielen darauf ab, den (möglicherweise vorhandenen) Ausbruch zunächst möglichst rasch abzuriegeln, um eine Verschleppung des Erregers zu unterbinden, beispielsweise durch Verbringungsverbote sowie die Einschränkung des Personenverkehrs. Nachfolgend schreibt die Verordnung mehrere gezielte Maßnahmen vor, um den Erreger in dem gesperrten Ausbruchsbestand wieder zu eliminieren. Je nach Sachlage kann die zuständige Behörde hierzu auch die Tötung aller dort gehaltenen Vögel anordnen, insbesondere wenn die Gefahr der Verschleppung besteht. Andernfalls müssen alle Tiere einer mehrwöchigen chemotherapeutischen Behandlung unterzogen werden. Der Behandlung gibt man aus Gründen des Tierschutzes in der Regel den Vorrang. Bei Privathaltern können diese Vorschriften der Psittakose-Verordnung durch die zuständige Veterinärbehörde ebenfalls angewandt werden.

Die Psittakose-Verordnung definiert als Psittakose ausdrücklich Infektionen und Erkrankungen von Psittaziden durch die Spezies *Cp. psittaci*, was in der Konsequenz bedeutet, dass in allen Verdachtsfällen eine Spezies-spezifische Untersuchung auf *Cp. psittaci* durchzuführen ist (**32, 36**). In einem Gutachten des Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare wird ebenfalls bekräftigt, dass der nur bis zur

taxonomischen Ebene der Gattung oder Familie vorgenommene Nachweis von Chlamydien nicht mehr dazu ausreicht, um einen Psittakoseausbruch zu deklarieren (227).

Im Zuge der Umsetzung der EU-Richtlinie 2003/99/EG durch die Verordnung zur Änderung tierseuchen- und lebensmittelrechtlicher Vorschriften zur Überwachung von Zoonosen und Zoonoseerregern (Zoonosen-Verordnung) wurde die Verordnung meldepflichtiger Tierkrankheiten von 2005 geändert (35, 37). Meldepflichtig ist nun nicht nur die Infektion mit *Chlamydophila*-Spezies von Rindern, Schafen, Ziegen, Gänsen, Enten, Puten, Hühnern und Tauben sondern auch von Katzen.

2.6 Methoden zum Nachweis von Chlamydieninfektionen bei Tieren

2.6.1 Proben für die Chlamydiendiagnostik

Chlamydien sind obligat intrazelluläre Bakterien, so dass für den direkten Nachweis auf die Entnahme von erregerrhaltigen Zellen oder Gewebe zu achten ist. In Frage kommen hierfür überwiegend Zellen der Schleimhäute, des Respirations-, Genital- oder Verdauungstraktes (bei Vögeln Kloake) und der Konjunktiven (3). Wegen starker Verkeimungen erwiesen sich Kotproben allerdings als weniger gut geeignet, sind aber oftmals bei Vögeln diejenigen Proben, die am besten entnommen werden können (132), empfohlen wird bei diesen Tieren jedoch eine 3-fach Tupferprobennahme (Nasenöffnungen, Konjunktiven, Kloake). Aufgrund der intermittierenden Ausscheidung der Chlamydien hat sich eine mehrmalige Probennahme an verschiedenen Tagen als vorteilhaft erwiesen (3). Neben Tupferproben bieten sich bei verstorbenen oder getöteten Tieren Organe (Lunge, Luftsäcke, Leber, Milz, Niere, Herzbeutel) und bei Aborten die Nachgeburten als Proben an.

2.6.2 Direkte Nachweisverfahren

2.6.2.1 Zellkultur, Färbung, Immunfluoreszenz

Mit Hilfe direkter Nachweisverfahren werden Erreger, deren Antigene oder DNA nachgewiesen. Die Anzucht und damit der Nachweis vermehrungsfähiger Chlamydien ist ausschließlich in lebenden Zellen möglich. Hierfür eignen sich embryonierte Hühnereier oder auch Zelllinien wie BGM¹, McCoy² oder HeLa³ (217, 260, 261). Die Verwendung von BGM-Zellen hat bei der Untersuchung von Nachgeburten oder Genitalupferproben von Säugetieren den Vorteil, dass in diesen auch der Nachweis des Erregers *Coxiella burnetii* gelingen kann (226). Zur Verbesserung der Adhäsion der Chlamydien an die Zellen und damit zur Optimierung der Infektionsrate der Zellkulturen können die Chlamydien auf die Zellen zentrifugiert werden. Der Zusatz von Cycloheximid zum Nährmedium bewirkt eine Hemmung der Zellteilung, wodurch das Eindringen der Chlamydien in die Zelle erleichtert wird (57). Sich rasch vermehrende Chlamydien-Stämme ermöglichen eine Auswertung der Kulturen bereits nach 48 bis 72 Stunden, allerdings kann sich der Nachweis bei sich langsam vermehrenden Stämmen auf 2 bis 6 Wochen verzögern. Während dieser Zeit werden die Kulturen regelmäßig mittels Invertoskop kontrolliert. Der Nachweis der für Chlamydien typischen intrazellulären Einschlüsse erfolgt mit geeigneten Färbemethoden, wie z.B. der Giménez- oder der Stamp-Färbung oder der sensitiveren und spezifischeren direkten Immunfluoreszenz unter Verwendung erregerspezifischer monoklonaler Antikörper.

2.6.2.2 Antigen-ELISA

Für den Nachweis von Chlamydienantigenen in der humanmedizinischen Diagnostik sind kommerziell erhältliche Capture-ELISA Testsysteme, sog. Antigen-ELISA-Tests, zugelassen. Diese Tests beruhen auf dem Nachweis des Lipopolysaccharid (LPS)-

¹ Nierenzellen der grünen Meerkatze (Buffalo-Green-Monkey-Kidney)

² Maus Fibroblasten-Zellen

³ Menschliche Epithelzellen eines Zervixkarzinoms

Antigens und erlauben daher nur einen Familien-, nicht aber Spezies-spezifischen Chlamydien-Nachweis (257). Vorteile sind deren einfache Durchführbarkeit und die schnelle Untersuchung von großen Probenzahlen. Ein Nachteil ist jedoch deren reduzierte Spezifität, die auf Kreuzreaktionen mit anderen gramnegativen Bakterien zurück zu führen ist und zu falsch positiven Ergebnissen führen kann. Durch die Verwendung monoklonaler Antikörper gegen sorgfältig ausgewählte und definierte Epitope ist eine Verbesserung der Spezifität jedoch möglich. Die Nachweisgrenze von 10^2 bis 10^5 EBE/ml ist jedoch für viele Fragestellungen nicht ausreichend (217). In der Veterinärmedizin hat sich die Verwendung von Antigen-ELISA-Tests aufgrund zahlreicher falsch positiver Ergebnisse, die sich besonders bei Probenmaterial von Vögeln (Kloakentupferproben) als gravierender Nachteil erwiesen haben, nicht bewährt (230).

2.6.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für einen sensitiven und spezifischen Nachweis von Chlamydien-DNA haben PCR-Methoden immer mehr an Bedeutung gewonnen und sind mittlerweile unverzichtbar. Gründe hierfür liegen in deren schnellen Durchführbarkeit, den geringeren Anforderungen an das Probenmaterial hinsichtlich Transport und Lagerung und in der durch die Auswahl von geeigneten Primern verbesserten Spezifität. Die deutlich höhere Sensitivität der PCR-Methoden im Vergleich zu anderen Testsystemen bedeuten jedoch zugleich eine hohe Anfälligkeit gegenüber Kontaminationen (1, 165, 177).

Die PCR wird nicht nur in der humanmedizinischen (159), sondern auch in der veterinärmedizinischen Chlamydiendiagnostik immer häufiger als Routineverfahren genutzt (140, 217). Die **Tabelle 2** bietet einen Überblick über PCR-Methoden, die die Identifizierung und Differenzierung von Chlamydien ermöglichen. Die Familien Chlamydiaceae, Parachlamydiaceae, Simkaniaceae und Waddliaceae können anhand von 16S- und 23S-rRNA-Genabschnitten unterschieden werden (73, 76, 77, 184). Die kompletten 16S-rRNA-Gensequenzen einiger Parachlamydiaceae konnten mit Primern von Pudjiatmoko et al. (199) amplifiziert werden. Durch die Arbeit von Ossewaarde und Meijer (184) wurde das Vorkommen von vielen *Chlamydia*-like-Organismen ebenfalls anhand von Amplifikaten der 16S-rRNA-Gene belegt. Everett et al. (76) entwarfen eine Multiplex-PCR zum Nachweis der Chlamydiaceae, in der

neben den ribosomalen Genen auch die *ompA*-Gene als Zielsequenz genutzt wurden.

Eine 1997 nach Kaltenböck et al. (140) entwickelte nested PCR ermöglicht eine Differenzierung von vier Chlamydien-Spezies auf Basis der traditionellen Nomenklatur in zwei Schritten. Die Nachweisgrenze dieses PCR-Tests, deren Zielsequenz sich innerhalb des *ompA*-Gens befindet, liegt aus Zellkultur bei 1 EBE. Die Verwendung von Allel-spezifischen Primern (140) gestattet darüber hinausgehend teilweise eine Differenzierung in die neu eingeführten Spezies nach Everett et al. (77).

Eine exakte Differenzierung der Chlamydiaceae nach der neuen Klassifizierung wird mit Hilfe der PCR nach Everett und Andersen (75) ermöglicht. Es handelt sich um eine einstufige PCR mit Zielsequenz in der Spacerregion zwischen 16S- und 23S-rRNA-Genen mit anschließender Charakterisierung des Amplicons anhand des Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP). Da sich diese Methode in Versuchen im Vergleich zur PCR nach Kaltenböck als weniger sensitiv erwiesen hat, eignet sie sich zwar zur Differenzierung von angezüchteten Isolaten, weniger aber zur direkten Untersuchung von klinischem Material (217).

Tabelle 2: Nachweis und Differenzierung von Chlamydien mittels PCR, modifiziert nach Everett, 2000 (73).

PCR-Typ	Zielsequenzen	Nachweis von	Nachweisgrenze	Länge des Amplifikats	Referenz
Multiplex-PCR	<i>ompA</i> -Gen, tRNA und rRNA	Chlamydiaceae	170 IFU/Reaktion	320 bp 240 bp	76
PCR	23S-rRNA-Gen	Chlamydiales	170 IFU/Reaktion	600 bp	76, 77
PCR	16S-rRNA-Gen	Chlamydiales	k. A.	298 bp	77
PCR	16S-rRNA-Gen	Chlamydiales	k. A.	269 bp	184
PCR	16S-rRNA-Gen	Chlamydiales	k. A.	> 1500 bp	73
Nested PCR	<i>ompA</i> -Gen	<i>Chlamydia</i> ssp.	1 EBE aus Zellkultur	576-597 bp 434–455 bp 250 bp 244 bp 389-404 bp 426–441 bp	140
PCR und RFLP	16S- und 23S-rRNA-Gen	<i>Chlamydia</i> <i>Chlamydophila</i> 9 Spezies nach der Taxonomie von Everett et al. (77)	k. A. k. A.	600 bp 585 bp	75

Erklärung: * alte Taxonomie, EBE: Einschlusskörperchen-bildende Einheit, IFU: Inclusion Forming Unit, bp: Basenpaare, k. A.: keine Angabe

2.6.2.4 Real-Time PCR

Eine quantitative und zudem sehr sensitive Bestimmung der in Probenmaterial enthaltenen Chlamydie-DNA wurde durch die Anwendung der Real-Time PCR ermöglicht (76, 121). Die schnelle und einfache Durchführbarkeit hat dazu geführt, dass die klassische PCR in vielen Laboren bereits durch die Real-Time PCR abgelöst wurde (135). Als besonders geeignet für den spezifischen und sensitiven Nachweis von Chlamydien haben sich Real-Time PCR-Assays auf der Basis von SybrGreen® oder mit Fluoreszenzfarbstoffen markierten Gensonden erwiesen (76, 285). Gensonden wie beispielsweise die sog. TaqMan®-Sonden, die durch die 5'-Exonukleaseaktivität der DNA-Polymerase abgebaut werden (5'-Exonuklease-Assay), machen sich das physikalische Prinzip der Fluoreszenz nach Bestrahlung mit Licht geeigneter Wellenlänge zu Nutze (FRET: Fluorescence Resonance Energy Transfer). So wurden bereits im Rahmen verschiedener Studien Real-Time PCR-Assays sowohl zum Familien-übergreifenden Nachweis von Chlamydiaceae (67, 76), als auch zum Spezies-spezifischen Nachweis von Chlamydien entwickelt. Im Einzelnen wurden Real-Time PCR-Assays zur artspezifischen Identifizierung der Spezies *C. trachomatis* (78, 228), *Cp. pneumoniae* (98, 146, 208, 249), *Cp. psittaci* (84, 103, 166), *Cp. felis* (108) und *Cp. pecorum* (56) erstellt. Als besonders schwierig hat sich dabei allerdings eine sichere Differenzierung der beiden Spezies *Cp. psittaci* und *Cp. abortus* erwiesen, so dass eine Unterscheidung mit Hilfe nur einer Methode auf der Basis nur eines Gens bisher als nicht möglich gilt (255).

Die **Tabelle 3** bietet einen Überblick über Real-Time PCR-Methoden, die die Identifizierung und Differenzierung von Chlamydien ermöglichen. Zum Nachweis der Chlamydiaceae dienten 23S-rRNA-Gensequenzen als Zielsequenz, für die Identifizierung von Chlamydien-Spezies waren in den meisten Fällen das *ompA*-Gen (Gen für das MOMP, Major Outer Membran Protein), aber auch das *incA*-Gen (Gen für das Protein der Einschlussmembran, inclusion membrane protein A) sowie ribosomale Gene geeignet. In einigen Untersuchungen war es möglich, den Nachweis von Chlamydien mit dem Nachweis anderer Krankheitserreger mittels Multiplex-Real-Time PCR zu kombinieren (241, 275), wobei diese Assays jedoch oftmals eine reduzierte Sensitivität aufwiesen (76).

Tabelle 3: Real-Time PCR-Assays zum Nachweis und zur Differenzierung von Chlamydien.

Real-Time PCR-Typ	Zielsequenzen	Nachweis von	Nachweisgrenze	Länge des Amplifikats	Referenz
TM	23S-rRNA-Gen	Chlamydiaceae	2 IFU/ Reaktion	132 bp	76
TM	23S-rRNA-Gen	Chlamydiaceae	56 Kopien oder 1,87 IFU/ Reaktion	110 bp	67
SG	16S-rRNA-Gen	<i>Cp. pneumoniae</i>	170 IFU/ Reaktion	185 bp	43
TM	<i>ompA</i> -Gen	<i>Cp. pneumoniae</i>	1-5 Kopien/ Reaktion	79 bp	146
TM	16S-rRNA-Gen und Intergenic Spacer	<i>Cp. pneumoniae</i>	0,4 IFU/ Reaktion	197 bp	98
TM	<i>ompA</i> -Gen	<i>Cp. pneumoniae</i>	0,001 IFU/ Reaktion	108 bp 125 bp	249
HS	16S-rRNA-Gen	<i>Cp. pneumoniae</i>	0,02 IFU/ Reaktion	464 bp	208
Multiplex Q-PNA	16S-rRNA-Gen	<i>C. trachomatis</i>	10 Kopien/ Reaktion	429 bp	78
SG	<i>ompA</i> -Gen	<i>C. trachomatis</i>	1 Kopie/ Reaktion	123 bp	228
SG	<i>ompA</i> -Gen	<i>Chlamydophila</i> ssp.	10 Kopien/ Reaktion	287-293 bp	121
HS		<i>Cp. abortus</i> B577 (Genlocus M73036)	< 10 Kopien/ Reaktion		
HS	23S-rRNA-Gen	<i>Chlamydophila</i> ssp.		169 bp	55, 56
	<i>ompA</i> -Gen	{ <i>Cp. abortus</i> , <i>Cp. pneumoniae</i> , <i>Cp. pecorum</i>	< 10 Kopien/ Reaktion	} 287-293 bp	
MB	<i>ompA</i> -Gen	<i>Cp. felis</i>	7 Kopien/ Reaktion	129 bp	108

Fortsetzung der **Tabelle 3** auf der nächsten Seite

Fortsetzung der **Tabelle 3**

Real-Time PCR-Typ	Zielsequenzen	Nachweis von	Nachweisgrenze	Länge des Amplifikats	Referenz
SG	Intergenic Spacer	<i>Cp. psittaci</i> (Genotyp A-F und E/B)	10 Kopien/ μl DNA	151 bp	84
TM TM MGB TM+NFO	} <i>ompA</i> -Gen	Genotyp C, D, F	} 10 Kopien/ μl DNA	} 71–85 bp	
		Genotyp E/B			
		Genotyp A, B, E			
TM	<i>ompA</i> -Gen	<i>Cp. psittaci</i>	80 Kopien/ Reaktion	82 bp	103
TM MGB	<i>incA</i> -Gen	<i>Cp. psittaci</i>	1 Kopie/ Reaktion	74 bp	166

Erklärung: EBE: Einschusskörperchen-bildende Einheit; IFU: Inclusion Forming Unit; bp: Basenpaare; TM: TaqMan®; TM MGB: TaqMan® MGB (Minor Groove Binder); HS: Hybridisierungssonden; SG: SybrGreen®; MB: Molecular Beacon; NFO: Nicht fluoreszierende (konkurrierende) Oligonukleotide; Q-PNA: Quencher-labeled Peptide Nucleic Acid

2.6.2.5 DNA-Microarray

Als vielversprechende Methode für den differenzierten Nachweis von Chlamydien-Spezies hat sich die Anwendung der DNA-Microarray-Technik erwiesen. Eine beachtliche Auswahl an offenen und geschlossenen Systemen ist derzeit schon verfügbar (**105**). Ein von der Fa. Clondiag Chip Technologies in Jena in Zusammenarbeit mit dem NRL auf der Basis einer Biochip-Plattform entwickelter Test ermöglicht die Differenzierung aller bisher bekannten Chlamydien-Spezies unter Verwendung eines einzigen ArrayTubes (**216**). Der Test basiert auf einem Nukleotid-Sonden-Array, der auf einem 3 x 3 mm großen chemisch modifizierten Glasträger aufgebracht ist und 50 individuelle Hybridisierungssonden umfasst. Der Sonden-Array befindet sich als Boden integriert in einem den Standard-Laborgeräten angepassten Mikroreaktionsgefäß. Nach Hybridisierung und Waschschrinen erfolgt die Auswertung mittels eines speziellen ArrayTube-Auslesegerätes.

2.6.3 Indirekte Nachweisverfahren

2.6.3.1 Komplementbindungsreaktion

Bei der Komplementbindungsreaktion (KBR) handelt es sich um eine Methode zum Nachweis von Antikörpern, die auf der Bindung von Komplement an Antigen-Antikörper-Komplexe beruht. Die Bildung von Antikörper-Antigen-Komplexen kann nach Zugabe eines genau darauf abgestimmten Systems von Schaferythrozyten und gegen diese gerichteten Antikörpern, dem sog. hämolytischen System, sichtbar gemacht werden. Im Falle des Vorhandenseins von Antikörpern, die an ein vorgegebenes Antigen binden, kommt es nachfolgend zur Bindung, auch Verbrauch genannt, von Komplement. Das gebundene Komplement steht somit für eine Hämolyse des anschließend zugegeben hämolytischen Systems nicht mehr zur Verfügung. Eine Hemmung der Hämolyse zeigt somit das Vorhandensein von Antikörpern, d.h. ein positives serologisches Ergebnis an. Während die Methode bei akuten Krankheitsgeschehen als sehr spezifisch und sensitiv gilt, ist die Sensitivität bei chronischen Prozessen niedrig (54). Bei Vogelseren ist die geringe Sensitivität nach einer Chlamydieninfektion auf die Bildung von nicht Komplement-bindenden Antikörpern zurückzuführen (86). Als Problem bei der serologischen Chlamydiendiagnostik bei Rindern stellte sich heraus, dass das in der KBR verwendete Meerschweinchen-Komplement IgG1, aber nicht IgG2 bindet. Schmeer *et al.* (225) konnte jedoch aufzeigen, dass die IgG2-Antikörper-Titer sowohl bei natürlichen als auch bei experimentellen Chlamydieninfektionen des Rindes signifikant höher sind, als die IgG1-Antikörper-Titer.

2.6.3.2 Antikörper-ELISA und Immunoblot

Ein Antikörper-ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen Chlamydien ist relativ leicht durchzuführen, gestattet einen hohen Probendurchsatz und erweist sich als deutlich sensitiver und schneller als die Komplementbindungsreaktion (217). In Untersuchungen kommen kompetitive, rekombinante und indirekte Antikörper-ELISA-Tests zum Einsatz (266). Kommerzielle Antikörper-ELISA-Kits, die das Vollantigen oder das LPS der Chlamydien als Antigen benutzen, ermöglichen den Nachweis von überwiegend gattungsspezifischen Antikörpern. Die Spezifität dieser Tests ist aufgrund von Kreuzreaktionen mit gramnegativen Bakterien allerdings geringer

(217). Neuere serologische Tests, die auf aufgereinigten Proteinen der äußeren Membran (MOMP) basieren, erweisen sich als spezifischer und erlauben zudem den Nachweis von Spezies-spezifischen Antikörpern (136, 156). Hölzle et al. (115) entwickelten ein Protokoll zur Klonierung und Expression des *ompA*-Gens von *Cp. abortus*, *Cp. pecorum* und *C. suis* in *Escherichia coli*. Die aufgereinigten, rekombinaten Membranproteine zeigten mit definierten Seren von Schweinen und Rindern eine Spezies-spezifische Reaktion.

Weiterhin werden Mikroimmunfluoreszenz-Tests auf der Basis von gereinigten Elementarkörperchen zum Nachweis von *C. trachomatis*-, *Cp. pneumoniae*- und *Cp. psittaci*-spezifischen Antikörpern vor allem in der Humanmedizin eingesetzt. Diese Methode erlaubt den Spezies-spezifischen Nachweis von Antikörpern der Klassen IgG, IgA und IgM. Um Kreuzreaktionen zu vermeiden, werden die allen drei Spezies gemeinsamen LPS-Antigene entfernt oder inaktiviert.

Das Immunoblot-Verfahren stellt ebenfalls eine sehr sensitive Methode dar, wobei sowohl Gattungs-, als auch Spezies- und Serovar-spezifische Antikörper nachgewiesen werden können. Diese Technik wurde beispielsweise für Studien zur Prävalenz von Chlamydieninfektionen in Putenbeständen eingesetzt (259, 263, 266). Um weitere geeignete Proteine für Chlamydien-spezifische, serologische Tests ausfindig zu machen, kommen immer häufiger Immunoproteomics- (2D-SDS-PAGE mit anschließendem Immunoblot) oder Peptidomics-Technologien (Isolierung von Proteinen nach deren Separation durch SDS-PAGE, enzymatischen Verdau und anschließende Charakterisierung der entstandenen Peptide mittels massenspektrometrischer Analyse) zum Einsatz (144).

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Geräte, Instrumente und Verbrauchsmaterialien

- Vortex-Mischer (IKA-Labortechnik, Staufen i.Br.)
- Sterile Werkbank Klasse II (BDK, Sonnenbühl-Genkingen)
- automatische Pipettierhilfe (Pipettus akku, Hirschmann, Eberstadt)
- Bunsenbrenner (Fireboy, Integra, Fernwald)
- Wasserbad 37 °C (Memmert, Schwabach)
- Brutschrank 37 °C (Binder, Tuttlingen)
- Zentrifuge (Universal 32R, Hettich, Tuttlingen)
- Behälter für Flüssigstickstoff (Messer, Griesheim)
- Invertoskop (Hund, Wetzlar)
- Brutschrank 30 °C und 42 °C (Memmert, Schwabach)
- BBLTM GasPakTM Anaerobiertopf (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA, Best.-Nr. 260626)
- Zentrifuge J2-21 (Beckmann, München)
- Festwinkelrotor JA-20, bis 48.300 x g (Beckmann, München)
- Ultraschallstab Sonifier B-12 (Branson Sonic Power Company, Danbury, USA)
- Mikroskop (Leitz Ortholux II, Leica, Wetzlar)
- Zähllokular (Leica, Wetzlar)
- Zentrifuge (Mikrozentrifuge 5402; Eppendorf, Hamburg)
- Heizblock (Eppendorf, Hamburg)
- Real-Time PCR-Gerät (Thermocycler) (ABI PRISM[®] 7.000; Applied Biosystems, Darmstadt)
- PCR-Werkbank (BiocapTM RNA/DNA; Captair, Köln)

- Tischzentrifuge (bis 21.000 x g; Eppendorf, Hamburg)
- Zentrifuge mit Einsätzen für Mikrotiterplatten (Hettich, Tuttlingen)
- Mikrotiterplattenschüttler (Heidolph, Schwabach)
- Pipetten (0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl; Eppendorf, Hamburg)
- Sterile Filterpipettenspitzen (Eppendorf, Hamburg)
- Sterile Glasflaschen mit Schraubdeckel, 100 ml, 250 ml, 500 ml (Schott, Mainz)
- Sterile Plastikpipetten, gestopft, 1 ml und 10 ml (Corning, New York, USA, Best.-Nr. 4012 und 4101)
- Zellkulturflaschen 80 cm² (Nunc, Dänemark, Best.-Nr. 153732)
- Zellkulturröhrchen (Greiner Bio-one, Nürtingen, Best.-Nr. 175112)
- Deckgläschen (12 mm; Menzel, Best.-Nr. CB00120RA1)
- Spritzenvorsatzfilter 0,45 µm (Corning, New York, USA, Best.-Nr. 431220)
- Gefrierampullen (Greiner Bio-one, Nürtingen, Best.-Nr. 691261)
- Zentrifugenröhrchen 50 ml (Corning, New York, USA, Best.-Nr. 430921)
- Sterile Einmalspritzen, 2 ml, 5 ml mit Kanülen (Henke-Sass, Wolf GmbH, Tuttlingen, HSW SOFT-JECT®)
- Sterile Scheren und Pinzetten
- BBL™ CampyPak™ Microaerophilic System Envelopes für die Anzucht von *Campylobacter*-Keimen unter mikroaeroben Bedingungen (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA, Best.-Nr. 271034)
- Sterile Impfösen (Dunn Labortechnik, Asbach)
- Zentrifugenröhrchen mit Schraubkappe (30 ml; Sigma, Laborzentrifugen GmbH, Osterode, Best.-Nr. 15032)
- Objektträger
- Filterpapier (Filter paper grade 1; Whatman International, Best.-Nr. 1001-6508)
- Filterhalter
- Reaktionsgefäß (Safe lock tubes 1,5 ml; Eppendorf, Hamburg)

- Reaktionsgefäße 2,0 ml, 1,5 ml und 0,5 ml für die PCR (Eppendorf, Hamburg)
- Mikrotiterplatten für die PCR (MicroAmp Optical 96-well Reaction Plate; Applied Biosystems, Darmstadt)
- Optische Klebefolien für PCR-Mikrotiterplatten (ABI PRISM[®] Optical adhesive Covers; Applied Biosystems, Darmstadt)

3.2 Hard- und Software

- Primer Express Version 2.0 (Applied Biosystems, Darmstadt)
- NCBI-Blast-Programm (www.ncbi.nlm.nih.gov)
- The Sequence Manipulation Suite (www.ualberta.ca/~stothard/javascript/)
- ClustlW (www.ebi.ac.uk/clustalw/)
- BOXSHADE 3.21 (www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html)

3.3 Chemikalien und Nährmedien

- Zellkulturmedien
 - ⇒ Medium
 - Basismedium: Minimum Essential Medium mit Earle's Salzen ohne L-Glutamin (C.C. pro, Best.-Nr.FM-10-L)
 - L-Glutamin (Biochrom AG, Berlin, Best.-Nr. K0282)
 - Gentamicinsulfat (Cambrex, Best.-Nr. US17-518L)
 - Amphotericin B (lyophilisiert, Biochrom AG, Berlin, Best.-Nr. A2610)
 - MEM-Vitamine (Biochrom AG, Berlin, Best.-Nr. K0373). Zu dem Basismedium werden 10 ml/l L-Glutamin, 100 mg/l Gentamicinsulfat, 2,5 mg/l Amphotericin B und 10 ml/l MEM-Vitamine zugefügt.
 - ⇒ Anzuchtmedium
 - Medium
 - 10 % (v/v) Fetales Kälberserum (FKS; Biochrom AG, Berlin, Best.-Nr. S0125)
 - ⇒ Erhaltungsmedium
 - Medium

- 2 % (v/v) Fetales Kälberserum (FKS; Biochrom AG, Berlin, Best.-Nr. S0125)
- ⇒ Chlamydienanzuchtmedium
 - Medium
 - 2 % (v/v) Fetales Kälberserum (FKS; Biochrom AG, Berlin, Best.-Nr. S0125)
 - 2 µg/l Cycloheximid (Sigma-Aldrich, Steinheim, Best.-Nr. C7698)
- Trypsin/EDTA-Lösung (Biochrom AG, Berlin, Best.-Nr. L2143)
- Flüssigstickstoff (Messer, Griesheim)
- Blutagar (Blood-Agar-Base, Oxoid, Best.-Nr. CM55)
- Preston-Agar, hergestellt aus Campylobacter-Agar-Base (Oxoid, Best.-Nr. CM689), sterilem, defibriniertem Pferdeblut (Oxoid, Best.-Nr. SR048C) und Preston Supplement (Oxoid, Best.-Nr. SR 0204E)
- Spiritus
- 1 x PBS (Phosphate Buffered Saline, pH 7,4)
 - ⇒ 10 g NaCl
 - ⇒ 0,25 g KCl
 - ⇒ 0,25 g KH_2HPO_4
 - ⇒ 1,8 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$
 - ⇒ ad 1.000 ml A. dest.
- Methanol
- Färbelösungen
 - ⇒ Karbofuchsin-Stammlösung
 - 650 ml A. dest.
 - 100 ml Neofuchsin-Lösung (Merck, Darmstadt, Best.-Nr. 105226)
 - 250 ml Phenol
 - Zu dem A. dest. wurden 10 % (v/v) der Neofuchsin-Lösung und 4 % (v/v) Phenol zugefügt. Vor dem Gebrauch wurde die Karbofuchsin-Stammlösung für 48 h bei 4 °C inkubiert.
 - ⇒ Natrium-Phosphatpuffer (0,1 M)
 - 3,5 ml 0,2 M NaH_2PO_4
 - 15,5 ml 0,2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$

- 19 ml A. dest.

⇒ Karbolfuchsin-Färbelösung

- 6 ml Karbolfuchsin-Stammlösung
- 10 ml Natrium-Phosphatpuffer (0,1 M)

Die Karbolfuchsin-Stammlösung und der Natrium-Phosphatpuffer wurden vermischt und mit Filterpapier filtriert.

⇒ Malachitgrün-Färbelösung (0,8 %)

- 8 g Malachitgrün (Merck, Darmstadt, Best.-Nr. 1.15942)
- ad 1000 ml A. dest.

Die einzelnen Bestandteile wurden vermischt, anschließend mit Filterpapier filtriert und die fertige Malachitgrün-Färbelösung zur Verwendung bei 4 °C gelagert.

- QIAamp MinElute Virus Spin Kit (50), (Qiagen, Hilden, Best.-Nr. 57704)
- PCR-Wasser (Sigma, Steinheim, Best.-Nr. W4502)
- Tris-Puffer zum Auflösen der Primer und Sonden (100-faches Konzentrat, 1 mM Tris-HCl pH 8,0 mit 0,01 mM EDTA; Sigma, Steinheim, Best.-Nr. 57113)
- Mastermix (qPCR Master Mix; Euogentec, Köln, Best.-Nr. RT-QP2X-03)
- Mastermix für den Ringversuch: TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Best.-Nr. 4304437)
- Primeroligonukleotide [Forward (F-) und Reverse (R-) Primer] bereits gelöst in einer Gebrauchskonzentration von 100 µM (Eurogentec, Köln)
- FAM-markierte TaqMan®-Sonden, lyophilisiert (Eurogentec, Köln): Auflösung der Sonde in Tris-Puffer (100-fach verdünnt, siehe oben) zu einer Gebrauchskonzentration von 2,5 µM.
- FAM-markierte TaqMan® MGB-Sonden, bereits gelöst in einer Konzentration von 100 µM (Applied Biosystems, Darmstadt): Verdünnung der Sonde in Tris-Puffer (100-fach verdünnt, siehe oben) zu einer Gebrauchskonzentration von 2,5 µM.
- LNA-Sonden, lyophilisiert (Eurogentec, Köln): Auflösung der Sonde in Tris-Puffer (100-fach verdünnt, siehe oben) zu einer Gebrauchskonzentration von 2,5 µM.
- High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Best.-Nr. 11 796 828 001)

- Mastermix für die Multiplex PCR (QuantiTect Multiplex PCR Kit (40); Best.-Nr. 204541, Qiagen, Hilden)

3.4 Bakterienstämme

- Chlamydien-Stämme

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Chlamydien-Stämme sind in der **Tabelle 4** aufgeführt. Die mittels RFLP nach Everett und Andersen 1999 (75) typisierten Isolate der verschiedenen Chlamydien-Spezies wurden freundlicherweise vom Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Verfügung gestellt. Die Stämme waren in BGM-Zellkulturen angezüchtet und in Form von tiefgefrorenem (-70 °C) Zellkulturlysate übergeben worden.

Tabelle 4: Verwendete Chlamydien-Stämme

Stamm-Bezeichnung	Chlamydien-Spezies
Z 1904/82	<i>Chlamydophila psittaci</i>
Z 178/02	<i>Chlamydophila abortus</i>
Z 1215/86	<i>Chlamydophila abortus</i>
Z 114/02	<i>Chlamydophila pecorum</i>
Z 3202-II/91	<i>Chlamydophila felis</i>
432	<i>Chlamydophila caviae</i>
Z 359/02	<i>Chlamydia suis</i>

- Kulturell und biochemisch typisierte Feldstämme aus dem Chemischen und Veterinäruntersuchungsamt Stuttgart, Fellbach: *Pasteurella multocida* (Stamm 2852), *Bordetella bronchiseptica* (2851), *Streptococcus equi* spp. *equi* (322), *Streptococcus equi* spp. *zooepidemicus* (328), *Arcanobacterium pyogenes* (607), *Haemophilus parasuis* (8092/6), *Actinobacillus pleuropneumoniae* (136)
- Aus der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig): *Pseudomonas aeruginosa* (DSM 50071), *Escherichia coli* (DSM 85799), *Salmonella* Typhimurium (DSM 5569), *Enterococcus faecalis* (DSM 20478)

- Aus der American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA):
Staphylococcus aureus (ATCC 25923), *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* (ATCC 49943), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 10031)

3.5 DNA-Proben

Die DNA der nachfolgend genannten Proben lag in wässriger Lösung vor.

- DNA von 3 Chlamydien-Stämmen (siehe **Tabelle 5**)

Tabelle 5: Verwendete DNA von Chlamydien-Stämmen. Die Menge an DNA, die in 200 µl Lösung enthalten war, stammte von 10×10^6 EBE.

Stamm- Bezeichnung	Chlamydien-Spezies	Herkunft
C 12	<i>Chlamydophila psittaci</i>	} Nationales Referenzlabor für Psittakose, Friedrich- Loeffler-Institut, Jena
C 19	<i>Chlamydophila psittaci</i>	
C18198	<i>Chlamydophila abortus</i>	

Erklärung: EBE = Einschlusskörperchen-bildende Einheit

- DNA von *Mycoplasma hyopneumoniae* (AES, Bruz, Frankreich, Best.-Nr. ADI051-9)
- 10 Proben (aus dem Chemischen und Veterinäruntersuchungsamt Stuttgart), die im Chlamydiaceae-spezifischen Real-Time PCR- Assay 12 mit negativem Ergebnis getestet worden waren
- DNA der aufgereinigten Chlamydien-Stämme (positive Chlamydienkontrollen) (siehe Kapitel 3.9.1)
- DNA der Bakterienstämme (siehe Kapitel 3.9.1)
- Die Vet Med Labor GmbH (IDEXX), Ludwigsburg, und das Chemische und Veterinäruntersuchungsamt Stuttgart (CVUAS), Fellbach, stellten freundlicherweise DNA-Proben für Untersuchungen mit den entworfenen Real-Time PCR-Assays zur Verfügung (siehe **Tabelle 6**). Es handelte sich um DNA-Proben (je Tier eine Probe), die bereits im Herkunftslabor positiv auf Chlamydien-

DNA getestet worden waren. Hierzu waren zwei PCR-Tests nach den Standardarbeitsanweisungen des jeweiligen Labors zur Anwendung gekommen. Die Vet Med Labor GmbH verwendete eine PCR in Anlehnung an Pollard et al. (193), die nach der veralteten Taxonomie als *Chlamydia psittaci*-spezifisch zu bezeichnen ist. Das CVUAS wendete eine Chlamydiaceae-spezifische Real-Time PCR (67) an. Während die Proben von Rindern, Schafen, Ziegen und Pferden ausschließlich aus dem Genitalbereich oder von Nachgeburtmaterial stammten, waren die Tupferproben von Katzen, Hunden, Meerschweinchen und Kaninchen von den Konjunktiven entnommen worden. Die Proben von Schweinen stammten aus dem Genitalbereich oder aus Nachgeburtmaterial (n = 97), von den Konjunktiven (n = 28) oder der Nase (n = 3). Die genauen Entnahmeorte der Proben von Papageien, Sittichen und Tauben, die im Vet Med Labor untersucht worden waren, sind unbekannt, da hierzu leider Angaben der Einsender fehlten. Bei dem überwiegenden Anteil der Proben handelte es sich jedoch um Kloakentupfer oder Kot. Die Proben vom Vet Med Labor stammten hauptsächlich von Tieren privater Tierhalter, die Proben aus dem CVUAS wurden vorwiegend im Rahmen des Tiergesundheitsdienstes sowie aus Zoos und Zoofachgeschäften entnommen. Alle Proben wurden im Zeitraum von Juli 2004 bis Dezember 2006 gesammelt und bis zur Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

Tabelle 6: Anzucht und Herkunft der verwendeten DNA-Proben

Probenherkunft	Anzahl der Proben		
	Vet Med Labor GmbH (IDEXX)	CVUAS	Gesamt
Papageien/Sittiche	56	21	77
Tauben	7	2	9
Rinder	0	100	100
Schafe	0	38	38
Ziegen	0	4	4
Schweine	0	128	128
Pferde	0	11	11
Hunde	5	0	5
Katzen	138	0	138
Kaninchen	0	4	4
Meerschweinchen	12	0	12
Gesamt	218	308	526

3.6 Proben für den Ringversuch

- Proben Nr. 1 bis 25 (siehe **Tabelle 7**)
- Positivkontrolle (enthielt DNA von 10^4 EBE des *Cp. psittaci*-Stammes C 12) und Negativkontrolle (PCR-Wasser, das keine Chlamydien-DNA enthielt)
- DNA-Template in wässriger Lösung für die interne Amplifikationskontrolle IC 2 (117)

Tabelle 7: Proben, die vom NRL für den Ringversuch bereitgestellt wurden.

Probe Nr.	Art der Probe	Spezies	Herkunft	DNA-/ EBE-Gehalt (je Probe)
1	DNA-Lösung	<i>Cp. psittaci</i> DC5	Zellkulturlysate	250 ng DNA
2	Zellkulturmedium	Keine	entfällt	Keine
3	Zellkulturlysate	Keine	entfällt	Keine
4	DNA-Lösung	<i>Cp. psittaci</i> C12/98	Zellkulturlysate	250 ng DNA
5	DNA-Lösung	<i>Cp. psittaci</i> DC14	Zellkulturlysate	250 ng DNA
6	DNA-Lösung	<i>C. suis</i> DC20	Zellkulturlysate	250 ng DNA
7	DNA-Lösung	<i>Cp. pecorum</i> DC47	Zellkulturlysate	250 ng DNA
8	DNA-Lösung	<i>Cp. psittaci</i> C12/98	Zellkulturlysate	250 ng DNA
9	DNA-Lösung	<i>Cp. abortus</i> C18/98	Zellkulturlysate	250 ng DNA
10	Wasser	Keine	entfällt	Keine
11	Tupfer	<i>Cp. abortus</i> C18/98	Zellkulturlysate	25.000 EBE
12	Tupfer	<i>Cp. pneumoniae</i> DC9	Zellkulturlysate	25.000 EBE
13	Puffer	Keine	entfällt	Keine
14	Tupfer	<i>Cp. psittaci</i> DC15	Zellkulturlysate	2.500 EBE
15	Tupfer	<i>Cp. psittaci</i> DC5	Zellkulturlysate	25.000 EBE
16	Puffer	<i>Cp. psittaci</i> DC5	Zellkulturlysate	250 EBE
17	Tupfer	<i>C. trachomatis</i> DC10	Zellkulturlysate	25.000 EBE
18	Tupfer	<i>Cp. psittaci</i> DC15	Zellkulturlysate	25 EBE
19	Tupfer	<i>Cp. psittaci</i> DC11	Zellkulturlysate	25.000 EBE

Fortsetzung der **Tabelle 7** auf der nächsten Seite

Fortsetzung der **Tabelle 7**

Probe Nr.	Art der Probe	Spezies	Herkunft	DNA-/ EBE-Gehalt (je Probe)
20	Tupfer	<i>Cp. psittaci</i> DC24	Zellkulturlysate	25.000 EBE
21	Tupfer	<i>Cp. psittaci</i> DC15	Zellkulturlysate	250 EBE
22	Tupfer	<i>Cp. psittaci</i> DC15	Zellkulturlysate	0,025 EBE
23	Tupfer	<i>Cp. psittaci</i> DC15	Zellkulturlysate	2,5 EBE
24	Tupfer	<i>Cp. psittaci</i> DC15	Zellkulturlysate	25.000 EBE
25	Tupfer	<i>Cp. psittaci</i> DC15	Zellkulturlysate	0,25 EBE

Erklärung: - EBE: Einschlusskörperchen-bildende Einheit

Zellkulturlysate: Unbeimpfte oder mit Chlamydien infizierte BGM-Zellkulturen wurden nach dem Auszählen von EBE trypsinisiert, bei -70°C eingefroren, schnell wieder aufgetaut und mittels Ultraschall durchmischt.

- Stabilisierungspuffer: Bindungspuffer des High Pure PCR Template Preparation Kit; Roche Diagnostics, Mannheim, Best.-Nr. 11 796 828 001
- Proben Nr. 11-12, 14-15, 17-25: in 250 µl Stabilisierungspuffer getränkte Wattetupfer, auf die zuvor Zellkulturlysate mit einer definierten Menge EBE aufgeträufelt wurde.
- Probe Nr. 13: Stabilisierungspuffer
- Probe Nr. 16: Stabilisierungspuffer und Zellkulturlysate mit einer definierten Menge EBE.

3.7 Zelllinie

Buffalo-Green-Monkey-Kidney- (BGM-) Zellkulturen (Zellbank für Zelllinien des Nationales Referenzlabors, Insel Riems, Best.-Nr. RIE136, Aufbewahrung bis zur Verwendung in Flüssigstickstoff bei -196 °C)

3.8 Bakteriologische Methoden

3.8.1 Anzucht und Vermehrung von Chlamydien in Zellkulturen

Auftauen von BGM-Zellen. Für die Anzüchtung und Vermehrung der Chlamydien wurden Buffalo-Green-Monkey-Kidney-(BGM-) Zellkulturen verwendet. Zunächst wurde die in Flüssigstickstoff aufbewahrte Gefrierampulle mit BGM-Zellen zum schnellen Auftauen in 37 °C warmes Wasser verbracht. Anschließend wurde der Inhalt der Gefrierampulle steril mit einer Spritze und Kanüle entnommen und in einem Zentrifugenröhrchen mit 30 ml Anzuchtmedium vermischt. Nach Abzentrifugation der BGM-Zellen bei 200 x g für 10 min wurde das Zellsediment in 30 ml Anzuchtmedium aufgenommen und in einer Zellkulturflasche (80 cm²) ausgesät. Die Bebrütung erfolgte bei 37 °C. Nach dem Anwachsen der Zellen (ca. 24 h) wurde das Anzuchtmedium durch frisches Anzuchtmedium ausgetauscht. Sobald die Zellen zu einem geschlossenem (konfluenten) Zellrasen ausgewachsen waren (3 - 4 Tage), konnte entweder eine Subkultivierung oder die Erhaltung der Zellen erfolgen.

Subkultivierung oder Erhaltung von BGM-Zellen. Die Subkultivierung der Zellen erfolgte durch eine sog. Feuchtrypsinierung mit einer Umsatzrate von 1:3, mit dem Ziel, die BGM-Zellen abzulösen, zu vereinzeln und zu vermehren. Dazu wurde nach Abgießen des Anzuchtmediums der BGM-Zellkulturrasen 3-mal mit jeweils 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung gewaschen, anschließend mit 4 ml dieser Lösung bedeckt und bis zur vollständigen Ablösung der Zellen (ca. 5 - 7 min) bei 37 °C inkubiert. Dieser Vorgang wurde mikroskopisch kontrolliert. Durch die Zugabe von 5 ml Anzuchtmedium wurde die Trypsin/EDTA-Lösung inaktiviert. Eine Vereinzelnung der Zellen konnte durch mehrmaliges Auf- und Niederpipettieren des abgelösten Zellrasens erreicht werden. Anschließend wurden die Zellen in 90 ml Anzuchtmedium aufgenommen und nach gutem Durchmischen auf 3 Zellkulturflaschen (80 cm²) aufgeteilt. Sobald die Zellen wieder zu einem konfluenten Zellrasen ausgewachsen waren (3 - 4 Tage), konnte entweder das

Anzuchtmedium durch die gleiche Menge an Erhaltungsmedium ausgetauscht (Erhaltung der Zellen), oder die Zellen erneut subkultiviert werden.

Anzucht von BGM-Zellen in Zellkulturröhrchen. Für die Anzucht der BGM-Zellen in Zellkulturröhrchen wurde unter sterilen Bedingungen zunächst in jedes Röhrchen ein Deckgläschen eingelegt. Dann erfolgte eine Feuchtrypsinierung wie oben beschrieben, wobei die abgelösten Zellen allerdings nur in 30 ml Anzuchtmedium (Umsatzrate von 1:1) aufgenommen und auf die vorbereiteten Zellkulturröhrchen mit jeweils 1 ml verteilt wurden. Nach Inkubation der Röhrchen für 24 h bei 37 °C war der Zellrasen für eine Beimpfung mit den Chlamydien-Stämmen bereit.

Beimpfen von BGM-Zellen. Vorbereitend wurde das Anzuchtmedium aus den Zellkulturröhrchen abgeschüttet und durch jeweils 0,5 ml Chlamydienanzuchtmedium ersetzt. Die Beimpfung von je zwei mit BGM-Zellen bewachsenen Zellkulturröhrchen erfolgte nun mit jeweils 0,5 ml eines aufgetauten und auf 37 °C vorgewärmten Stammes (Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere der Justus-Liebig-Universität Gießen, siehe **Tabelle 4**) beimpft. Zusätzlich dienten als Negativkontrolle zwei Zellkulturröhrchen mit jeweils 0,5 ml Erhaltungsmedium. Zur Verbesserung der Infektionsrate folgte auf die Beimpfung eine Zentrifugation mit 1.000 x g für 30 min bei 37 °C. Daran schlossen sich eine Inkubation bei 37 °C und eine tägliche mikroskopische Kontrolle der beimpften Zellkulturen auf zytopathogene Effekte mittels Invertoskop an. Nach Eintreten zytopathogener Reaktionen, aber spätestens am 6. Tag nach der Beimpfung, wurden die Zellkulturröhrchen zum Ablösen und Zerstören der Zellen bei -70 °C eingefroren. Die anschließend wieder aufgetauten und auf 37 °C aufgewärmten Chlamydien-Zell-Suspensionen dienten nun als Inokulum zur Beimpfung von 4 neuen Zellkulturröhrchen. Zur Gewinnung größerer Mengen Chlamydien wurde je Chlamydien-Stamm eine mit BGM-Zellen bewachsene Zellkulturflasche (80 cm²) mit der Chlamydien-Zell-Suspension von 8 beimpften Zellkulturröhrchen (insgesamt 8 ml) beimpft. Als Negativkontrolle diente eine mit 8 ml Zellsuspension (Negativkontrollen der Zellkulturröhrchen) beimpfte Zellkulturflasche (80 cm²). Für die Nährstoffversorgung der Zellen wurden außerdem 16 ml Chlamydienanzuchtmedium hinzu gegeben. Die Zellkulturflaschen wurden bis zum Eintreten von zytopathogenen Reaktionen oder spätestens nach 14-tägiger Bebrütung bis zur weiteren Verwendung bei -70 °C eingefroren. Zusätzlich bewirkte

das Einfrieren, dass sich BGM-Zellen ablösten, zugrunde gingen und dabei Chlamydien freisetzen.

3.8.2 Anzucht und Vermehrung von anderen Bakterien

Jeweils eine Kolonie der im Kapitel 3.4 angegebenen Bakterienstämme (außer *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* und den Chlamydien-Stämmen) wurde mit einer sterilen Impföse im Verdünnungsausstrich auf jeweils eine Blutagar-Platte aufgetragen. Die Bebrütung der Agarplatten erfolgte für 24 h bei 37 °C. Eine Kolonie von *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* wurde im Verdünnungsausstrich auf eine Preston-Agar-Platte aufgetragen. Die Bebrütung dieser Platte erfolgte für 48 h bei 42 °C mittels BBL™ CampyPak™ Microaerophilic System Envelopes unter mikroaeroben Bedingungen.

3.8.3 Bestimmung der Chlamydien-Keimzahl

Aufreinigung der angezüchteten Chlamydien-Stämme. Die in Zellkultur vermehrten Chlamydien-Stämme (siehe Kapitel 3.8.1) wurden aufgetaut, jeweils unter sterilen Bedingungen in ein Zentrifugenröhrchen pipettiert und mit Hilfe eines Festwinkelrotors mit 30.000 x g für 45 min bei 4 °C zentrifugiert. Durch eine Ultraschallbehandlung des anschließend in 0,5 ml PBS resuspendierten Zellsediments konnten die BGM-Zellen aufgeschlossen werden. BGM-Zelltrümmer und freigesetzte Chlamydien wurden durch eine niedertourige Zentrifugation bei 500 x g für 10 min bei 4 °C getrennt. Nach einer Zentrifugation des chlamydienhaltigen Überstands mit 30.000 x g für 60 min bei 4 °C wurde der Überstand verworfen und das Chlamydienpellet in 1 ml PBS resuspendiert.

Giménez-Färbung. Zur Vereinzelung der Chlamydien wurden die hergestellten Chlamydien suspensionen (jeweils 1 ml) erneut beschallt und jeweils 1:10, 1:50 und 1:100 mit PBS verdünnt. Von jeder Verdünnungsstufe wurden nun 10 µl auf die Fläche von 1 cm² eines Objektträgers ausgestrichen. An eine einstündige Fixierung der luftgetrockneten Ausstriche in Methanol schloss sich eine Färbung nach Giménez an. Hierzu ließ man auf den Objektträger aufgebrauchte Karbolfuchsin-Färbelösung für 10 min und danach Malachitgrün-Färbelösung für 2 min einwirken.

Vor und nach den einzelnen Färbeschritten wurde der Objektträger mit A. dest. abgewaschen und anschließend an der Luft getrocknet.

Bestimmung der Chlamydienkonzentrationen. Hierfür wurde die Anzahl sichtbarer Chlamydien-Partikel in den gefärbten Objektträgersausstrichen mikroskopisch unter Zuhilfenahme eines 12,5-fach vergrößernden Zähllokulars und eines 100-fach vergrößernden Objektivs bestimmt. Dann wurden Chlamydien-Partikel in 10 Blickfeldern des Zähllokulars in jeweils 10 Kästchen einer Spalte gezählt (siehe **Abbildung 2**), wobei Chlamydien, die auf der unteren und der rechten Linie eines Zählkästchens lagen, nicht mitgezählt wurden.

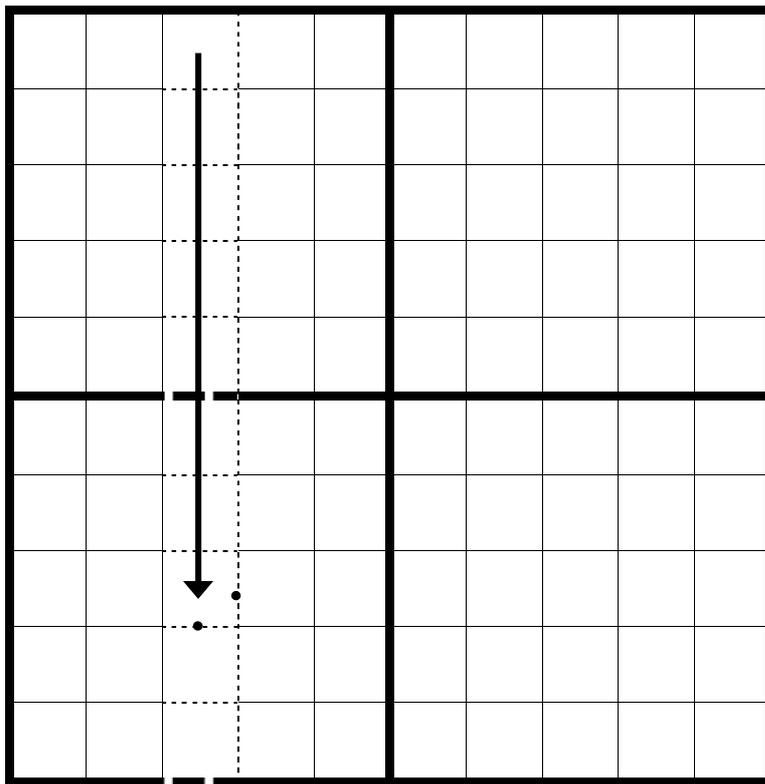


Abbildung 2: Schematische Darstellung eines Blickfelds des Zähllokulars: Beispiel für die Auszählung von Chlamydienpartikeln in Zählquadranten in Pfeilrichtung. Chlamydienpartikel (schwarze Punkte) auf den gestrichelten Linien der Kästchen wurden bei der Zählung nicht berücksichtigt.

Die Berechnung der Anzahl, der in der fraglichen Suspension enthaltenen Chlamydien-Partikel, erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{Partikelkonzentration [Chlamydien-Partikel/ml]} = \sum c_i \times M_x \times v_i \times 100$$

$\sum c_i =$ Anzahl der Chlamydienpartikel in 100 Kleinstquadraten (1 Kleinstquadrat entspricht einer Okularfläche von 1 mm^2)

$M_x =$ Multiplikationsfaktor zur Flächenkorrektur des Blickfeldes bei x-facher Vergrößerung (mittels Objektmikrometer für das verwendete Mikroskop bestimmt)

$$M_{(12,5 \times 100\text{-fach})} = \frac{1 \times 10^8 \mu\text{m}^2}{8.100 \mu\text{m}^2}$$

$v_i =$ Verdünnungsfaktor der Chlamydien suspension

3.9 Molekularbiologische Methoden

3.9.1 Gewinnung von genomischer DNA

DNA-Isolierung aus aufgereinigten Chlamydien-Stämmen. Die Isolierung von DNA aus den aufgereinigten Chlamydien-Stämmen (siehe Kapitel 3.8.3) wurde mit dem QIAamp MinElute Virus Spin Kit gemäß den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. In je ein Reaktionsgefäß wurden $200 \mu\text{l}$ des aufgereinigten Chlamydien-Stammes, $25 \mu\text{l}$ Protease und $200 \mu\text{l}$ AL Puffer, dem zuvor $28 \mu\text{g/ml}$ Carrier-RNA zugefügt worden war, pipettiert. Nach dem Mischen wurde der Reaktionsansatz für 15 min bei $56 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Darauf folgten die Zugabe von $250 \mu\text{l}$ Ethanol, Mischen und eine Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur. Das Lysat wurde auf die Säule, die sich in einem Sammelröhrchen befand, überführt und bei $6.000 \times g$ für 1 min zentrifugiert. Das auf diese Weise in dem Sammelröhrchen gewonnene Filtrat wurde verworfen, die Säule in ein neues Sammelröhrchen gesetzt, mit $500 \mu\text{l}$ AW2 Puffer befüllt und anschließend erneut bei $6.000 \times g$ für 1 min zentrifugiert. Auch dieses Filtrat wurde verworfen, die Säule in ein drittes

Sammelröhrchen gesetzt und diesmal mit 500 µl Ethanol befüllt. Es folgte wieder eine Zentrifugation bei 6.000 x g für 1 min und anschließend zum Trocknen der Säulenmembran eine Zentrifugation in einem viertem Sammelröhrchen bei 20.000 x g für 3 min, sowie nach erneutem Umsetzen der Säule eine Inkubation für 3 min bei 56 °C. Nach Umsetzen der Säule in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß und Befüllen mit 50 µl Elutionspuffer (AVE Puffer) folgte eine Inkubation bei Raumtemperatur für 1 min. Die Gewinnung der DNA gelang schließlich durch eine Zentrifugation bei 20.000 x g für 1 min. Die so gewonnene DNA wurde bis zur Verwendung bei -20 °C eingefroren.

DNA-Isolierung (Hitzeextraktion) aus anderen Bakterien Mit einer sterilen Impföse wurden von jedem angezüchteten Bakterienstamm (siehe Kapitel 3.8.2) 1 - 2 Kolonien in je 100 µl PCR-Wasser in einem Reaktionsgefäß suspendiert. Der Aufschluss der Bakterienzellen zur Freisetzung von DNA erfolgte bei 100 °C für 15 min. Der nach Zentrifugation bei 16.000 x g für 15 min gewonnene klare Überstand wurde bis zur Verwendung bei -20 °C eingefroren.

3.9.2 Design von Spezies-spezifischen Real-Time PCR-Assays

Erstellen von Alignments. Die DNA-Sequenzen der *ompA*-, 23S-rRNA- und 16S-rRNA-Gene, sowie der Intergenic Spacer Regionen einer möglichst großen Anzahl von Stämmen der Spezies *Cp. psittaci*, *Cp. abortus*, *Cp. pecorum*, *Cp. felis*, *Cp. caviae* und *C. suis* wurden aus dem NCBI-Blast-Programm www.ncbi.nlm.nih.gov bezogen. Zur Erstellung der Alignments wurde mit den Programmen www.ualberta.ca/~stothard/javascript/ (DNA-Filter), www.ebi.ac.uk/clustalw/ (Vergleich der Sequenzen miteinander) und www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html (verbesserte Darstellung der Unterschiede zwischen den Stämmen) gearbeitet. Auszüge der erstellten Alignments und die Lage der selbst entworfenen Gensonden und Primer innerhalb der Gensequenzen des *ompA*- und der 23S-rRNA-Gene sind in den **Abbildungen 17 bis 23** im Anhang dargestellt.

Entwurf von Spezies-spezifischen Real-Time PCR-Assays. Für die Entwürfe Spezies-spezifischer Gensonden und Primer wurden die DNA-Sequenzen der *ompA*-

16S- und 23S-rRNA-Gene der ausgewählten Chlamydien-Spezies sowohl auf Gemeinsamkeiten als auch auf Abweichungen in ihren Nukleotidsequenzen geprüft. Ziel war es, für jede Chlamydien-Spezies Nukleotidsequenzen herauszuarbeiten, die bei allen Stämmen einer Spezies gleich, zu allen Stämmen der anderen Spezies aber verschieden waren. Diese Nukleotidsequenzabschnitte waren die Grundlage für das anschließende Design von Spezies-spezifischen Gensonden und Primern unter Zuhilfenahme des Programms „Primer Express“. Der intensive Vergleich der angefertigten Alignments ergab, dass das *ompA*-Gen mit Ausnahme von *C. suis* für das Design von Spezies-spezifischen Real-Time PCR-Assays geeignet war. Für *Cp. psittaci* bestand die Möglichkeit mit Hilfe des *ompA*-Gens auf der Basis mehrerer Nukleotidabweichungen 18 von 26 Stämmen oder auf der Basis einer Nukleotidabweichung (SNP) in dem 23S-rRNA-Gen nahezu alle *Cp. psittaci*-Stämme von anderen Chlamydien-Spezies zu unterscheiden. Für den Nachweis von *C. suis* erwies sich eine Sequenz im Bereich des 23S-rRNA-Gens als geeignet.

Aufgrund der sehr großen Übereinstimmung zwischen *Cp. psittaci* und *Cp. abortus* in der Nukleotidsequenz des *ompA*-Gens beschränkten sich die Unterschiede auf einzelne Nukleotide (Single Nucleotide Polymorphism = SNP). Deshalb mussten zum Nachweis von *Cp. psittaci* sog. TaqMan[®]MGB-Sonden entworfen werden. Für den Nachweis von *Cp. abortus* wurde neben einer klassischen TaqMan[®]-Sonde ebenfalls eine TaqMan[®]MGB-Sonde entworfen. TaqMan[®]MGB-Sonden unterscheiden sich zu den preisgünstigeren klassischen TaqMan[®]-Sonden durch ihre sehr stabile Bindung an die Ziel-DNA (Template), die durch einen sog. „Minor Groove Binder“ (MGB) ermöglicht wird. Aufgrund der damit einhergehenden Erhöhung der Schmelztemperatur können diese Gensonden im Vergleich zu klassischen TaqMan[®]-Sonden kürzer sein und deshalb an Nukleotidsequenzen mit einer Abweichung von nur einem Nukleotid (SNP) unterschiedlich stark binden (147). Als Alternative zu den entworfenen TaqMan[®]MGB-Sonden wurde für den Nachweis von *Cp. psittaci* zusätzlich eine sog. LNA-Sonde (LNA = Locked Nucleic Acid) auf der Basis einer bereits entworfenen TaqMan[®]MGB-Sonde bei der Firma Eurogentec in Auftrag gegeben. Der Einbau von sog. LNA-Nukleotiden in eine Gensonde steigert deren Stabilität und Spezifität. Damit ist der PCR-gestützte Nachweis eines SNP ähnlich wie bei der Verwendung einer TaqMan[®]MGB-Sonde möglich. Für den Nachweis der übrigen Chlamydien-Spezies konnten hingegen aufgrund mehrerer

Nukleotidabweichungen in den ausgewählten Genabschnitten klassische TaqMan[®]-Sonden entworfen werden. Die Schmelztemperaturen (T_m) betragen gemäß des Primer Express-Programms für alle Vorwärts- (F-Primer) und Rückwärtsprimer (R-Primer) 58 - 60 °C sowie für die TaqMan[®]-Sonden 68 - 70 °C und den Vorgaben des Herstellers für die TaqMan[®]MGB-Sonden entsprechend 65 - 67 °C. Die Schmelztemperatur der LNA-Sonde betrug nach Vorgabe der Fa. Eurogentec 50 °C (errechnet nach der Methode $T_m(^{\circ}\text{C}) = 2(N_A+N_T) + 4(N_G+N_C)$, N_x = Anzahl der Basen vom Typ x). Die Nukleotidsequenzen der Primer und Gensonden für die verschiedenen entworfenen Real-Time PCR-Assays sowie die Länge der Amplifikate sind in den **Tabellen 8 bis 14** dargestellt.

Tabelle 8: Nukleotidsequenzen der verwendeten Primer und der Gensonden der Real-Time PCR-Assays 1, 2, 3 und 4 für das *ompA*-Gen zum Nachweis von *Cp. psittaci*.

Real-Time PCR-Assay	Bezeichnung	Nukleotidsequenzen (5' - 3')	Länge des Amplifikats [bp]
1	F-Primer	Cp.ps.OMPA-F	77
	R-Primer	Cp.ps.OMPA-R	
	TaqMan [®] MGB-Sonde	Cp.ps.OMPA-S	
2	F-Primer	C.ps.mOMPA-F	77
	R-Primer	C.ps.mOMPA-R	
	TaqMan [®] MGB-Sonde	C.ps.mOMPA-S	
3	F-Primer	Cp.ps.OMP2-F	66
	R-Primer	Cp.ps.OMP2-R	
	TaqMan [®] MGB-Sonde	Cp.ps.OMP2-S	
4	F-Primer	Cp.ps.LNA-F	77
	R-Primer	Cp.ps.LNA-R	
	LNA-Sonde	Cp.ps.LNA-S	

Erklärung: FAM = 6-Carboxy-Fluorescein
 Y = unspezifische Nukleinbasen C oder T
 LNA = Locked Nucleic Acid (verbrückte Nukleinsäure)
 7 = C-LNA
 8 = G-LNA
 bp = Basenpaare

Tabelle 9: Nukleotidsequenzen der verwendeten Primer und der Gensonde im Real-Time PCR-Assay 5 für das 23S-rRNA-Gen zum Nachweis von *Cp. psittaci*.

Real-Time PCR-Assay	Bezeichnung	Sequenzen (5' - 3')	Länge des Amplifikats [bp]
5	F-Primer	Cp.ps.23S-F GAAATAGAACCTGAAACCAGTAGCT TATAA	83
	R-Primer	Cp.ps.23S-R AAAAGGCACGCCGTCAAC	
	TaqMan [®] - MGB-Sonde	Cp.ps.23S-S FAM-ACTTCTTAGGAAGTCATG	

Erklärung: siehe Tabelle 8

Tabelle 10: Nukleotidsequenzen der verwendeten Primer und der Gensonden der Real-Time PCR-Assays 6 und 7 für das *ompA*-Gen zum Nachweis von *Cp. abortus*.

Real-Time PCR-Assay	Bezeichnung	Sequenzen (5' - 3')	Länge des Amplifikats [bp]
6	F-Primer	Cp.a.OMPA-F GCAACTGACACTAAGTCGGCTACA	83
	R-Primer	Cp.a.OMPA-R ACAAGCATGTTCAATCGATAAGAGA	
	TaqMan [®] - Sonde	Cp.a.OMPA-S FAM-TAAATACCACGAATGGCAAGT TGGTTTAGCG-TAMRA	
7	F-Primer	Cp.a.OMP2-F GAACAGCATTTCCTTTACCTCTAAC A	108
	R-Primer	Cp.a.OMP2-R GATAAGAGAGCGCTAAACCAACTTG	
	TaqMan [®] - MGB-Sonde	Cp.a.OMP2-S FAM-CAACTGACACTAAGTC	

Erklärung: siehe Tabelle 8

Tabelle 11: Nukleotidsequenzen der verwendeten Primer und der Gensonde im Real-Time PCR-Assay 8 für das *ompA*-Gen zum Nachweis von *Cp. pecorum*.

Real-Time PCR-Assay	Bezeichnung	Sequenzen (5' - 3')	Länge des Amplifikats [bp]
8	F-Primer	Cp.pec.-F CCATGTGATCCTTGCGCTACT	76
	R-Primer	Cp.pec.-R TGTCGAAAACATAATCTCCGTAATAAT	
	TaqMan [®] - Sonde	Cp.pec.-S FAM-TGCGACGCGATTAGCTTACGCG TAG-TAMRA	

Erklärung: siehe Tabelle 8

Tabelle 12: Nukleotidsequenzen der verwendeten Primer und der Gensonde im Real-Time PCR-Assay 9 für das *ompA*-Gen zum Nachweis von *Cp. felis*.

Real-Time PCR-Assay	Bezeichnung	Sequenzen (5' - 3')	Länge des Amplifikats [bp]
9	F-Primer	Cp.f.-F	TCGGATTGATTGGTCTTGCA
	R-Primer	Cp.f.-R	GCTCTACAATGCCTTGAGAAATTC
	TaqMan [®] -Sonde	Cp.f.-S	FAM-ACTGATTTGCGCAA TCAGCGTCCAA-TAMRA

Erklärung: siehe Tabelle 8

Tabelle 13: Nukleotidsequenzen der verwendeten Primer und der Gensonde im Real-Time PCR-Assay 10 für das *ompA*-Gen zum Nachweis von *Cp. caviae*.

Real-Time PCR-Assay	Bezeichnung	Sequenzen (5' - 3')	Länge des Amplifikats [bp]
10	F-Primer	Cp.cav.-F	GAATAACATAGCCTACGGCAAACATA
	R-Primer	Cp.cav.-R	CGATCCCAAATGTTTAATGCTAAGA
	TaqMan [®] -Sonde	Cp.cav.-S	FAM-CAAGATGCAGAATGGTCCAC AAACGC-TAMRA

Erklärung: siehe Tabelle 8

Tabelle 14: Nukleotidsequenzen der verwendeten Primer und der Gensonde im Real-Time PCR-Assay 11 für das 23S-rRNA-Gen zum Nachweis von *C. suis*.

Real-Time PCR-Assay	Bezeichnung	Sequenzen (5' - 3')	Länge des Amplifikats [bp]
11	F-Primer	C.suis-F	CCTGCCGAAGTCAAACATCTTA
	R-Primer	C.suis-R	CCCTACAACCCCTCGCTTCT
	TaqMan [®] -Sonde	C.suis-S	FAM-CGAGCGAAAGGGGAAGAG CCTAAACC-TAMRA

Erklärung: siehe Tabelle 8

3.9.3 Chlamydiaceae-spezifischer Real-Time PCR-Assay

Zum Zwecke vergleichender Untersuchungen kam eine bereits etablierte Chlamydiaceae-spezifische Real-Time PCR nach Angaben von Ehrlich et al. (67) zur Anwendung. Die Nukleotidsequenzen der Primer und der Gensonde des Real-Time PCR-Assays sind in **Tabelle 15** dargestellt.

Tabelle 15: Nukleotidsequenzen der verwendeten Primer und der Gensonde im Real-Time PCR-Assay 12 für das 23S-rRNA-Gen zum Nachweis von Bakterien der Familie **Chlamydiaceae** [Ehrlich et al. (67)].

Real-Time PCR-Assay	Bezeichnung	Sequenzen (5' - 3')
12	F-Primer	Ch23S-F CTGAAACCAGTAGCTTATAAGCGGT
	R-Primer	Ch23S-R ACCTCGCCGTTTAACTTAACTCC
	TaqMan [®] -Sonde	Ch23S-S FAM-CTCATCATGCAAAGGCACGCCG

Erklärung: siehe **Tabelle 8**

3.9.4 Real-Time PCR-Assays

Reaktionsansatz und Zyklusbedingungen. Jeder Reaktionsansatz (Gesamtvolumen 25 µl) setzte sich aus 12,5 µl qPCR Master Mix, jeweils 0,225 µl F-Primer und R-Primer (Endkonzentration jeweils 0,9 µM), 2 µl TaqMan[®]-, TaqMan[®]MGB- oder LNA-Sonde (Endkonzentration 0,2 µM), 8,05 µl sterilem Wasser und entweder 2 µl der jeweiligen DNA-Probe (Template), oder der positiven (DNA der aufgereinigten Chlamydien-Stämme) oder der negativen Kontrolle (Wasser) zusammen. Danach wurde die PCR-Mikrotiterplatte mit einer optischen Klebefolie versiegelt, auf einem Mikrotiterplattenschüttler zum Zwecke einer vollständigen Durchmischung geschüttelt und danach zum Entfernen von Luftblasen und Sammeln des Reaktionsgemisches bei 800 x g für 2 min zentrifugiert. Vor dem Verbringen der PCR-Mikrotiterplatte in das Real-Time PCR-Gerät (Thermocycler) wurde zum Schutz

der optischen Folie ein Schutzkissen (compression pad) nach Angaben des Herstellers direkt auf die Folie gelegt.

Das Real-Time PCR-Protokoll sah nach einer Aktivierung der DNA-Polymerase (Hot Start PCR) für 10 min bei 95 °C 45 Zyklen mit jeweils 15 sec bei 95 °C (Denaturierung) und 1 min bei 60 °C (Annealing und Elongation) mit abschließender Abkühlung auf Raumtemperatur vor.

Prinzip der Real-Time PCR mit TaqMan[®], TaqMan[®]MGB- und LNA-Sonden.

Während der DNA-Amplifikation des Real-Time PCR-Laufs bindet die mit Reporter- (5' - Ende) und Quencher-Farbstoff (3' - Ende) markierte Sonde komplementär am gleichen DNA-Strang wie einer der beiden Primer. Die durch Lichtbestrahlung hervorgerufene Fluoreszenz des Reporter-Farbstoffs wird bei intakter Sonde durch Energietransfer auf den Quencher unterdrückt. Während jedes PCR-Zyklus baut die 5' - 3'-Exonukleaseaktivität der TaqPolymerase die an den DNA-Strang spezifische gebundene Sonde ab und trennt damit den Reporter- vom Quencher-Farbstoff. Somit entfällt die Unterdrückung der Fluoreszenz des Reporter-Farbstoffs durch den Quencher-Farbstoff, so dass es durch Bestrahlung mit UV-Licht geeigneter Wellenlänge zu einer messbaren Fluoreszenz kommt (FRET = Fluorescence Resonance Energy Transfer). Die Stärke der Fluoreszenz ist dabei proportional zum Abbau der Sonde und somit zur amplifizierten DNA-Menge.

Die eingesetzten Farbstoffe weisen ebenso wie die verwendeten Materialien bei Bestrahlung mit UV-Licht eine gewisse Grundfluoreszenz auf. Der im Master-Mix enthaltene passive Referenzfarbstoff ROX dient der Normalisierung des Reportersignals bei nicht PCR-bedingten Schwankungen wie z. B. Volumen- und Konzentrationsveränderungen. Das normalisierte Reportersignal (R_n) wird aus dem Quotient der Emissionsintensität von Reporter- und Referenzfarbstoff gebildet. R_n^+ ist der R_n -Wert einer Reaktion, die alle Komponenten einschließlich Template enthält und R_n^- ist der R_n -Wert aus frühen Zyklen der Reaktion (Basislinie) oder eines Leerwertes (Reaktionsansatz ohne Template). Delta R_n (ΔR_n) wird aus der Differenz von R_n^+ und R_n^- gebildet und gibt die Größe des Signals der Real-Time PCR wider (siehe **Abbildung 3**).

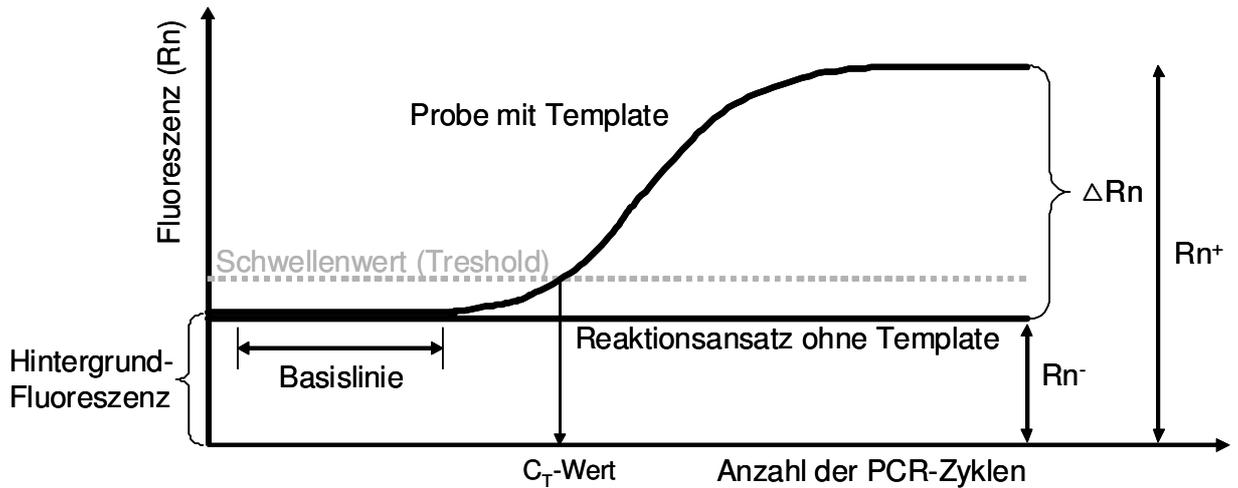


Abbildung 3: Beispiel für die Veränderung der Fluoreszenzintensität eines Reaktionsansatzes während eines Real-Time PCR-Laufs. Die nach jedem Zyklus gemessene Fluoreszenzintensität (Ordinate) wird gegen die Anzahl der Zyklen (Abszisse) aufgetragen. Der C_T -Wert ist identisch mit der Mindestzahl der PCR-Zyklen, die erforderlich waren, damit die Fluoreszenzintensität den Schwellenwert überschritt. R = Emissionsintensität, $R_n = R_{\text{Reporter}}/R_{\text{ROX}}$ (zur Normalisierung des Reportersignals gebildeter Quotient aus Emissionsintensität des Reporters und des Referenzfarbstoffs ROX), $\Delta R_n = R_n^+ - R_n^-$ (R_n^+ ist der R_n -Wert einer Reaktion, die alle Komponenten einschließlich Template enthält und R_n^- ist der R_n -Wert aus frühen Zyklen der Reaktion oder eines Reaktionsansatzes ohne Template).

Auswertung der Untersuchungsergebnisse. Das Fluoreszenzsignal wird während des Real-Time PCR-Laufs kontinuierlich gemessen und mittels speziell entwickelter Computersoftware analysiert. Die Auswertung der Messdaten erfolgt anhand von Amplifikationskurven (siehe **Abbildung 3**) und automatisch vom System errechneten C_T -Werten (C_T -Wert = Anzahl der Zyklen nach denen das Fluoreszenz-Signal einen automatisch errechneten Schwellenwert zum ersten Mal übersteigt). Zur Bestimmung des Schwellenwertes (Treshold) wird aus der Standardabweichung der Fluoreszenz zwischen Zyklus 3 bis 15 multipliziert mit dem Faktor 10 ein Fluoreszenzwert errechnet, der zur Grundfluoreszenz addiert wird.

Untersuchungen zu Sonden- und Primerkonzentrationen. Zur Bestimmung geeigneter Primer- und Sondenkonzentrationen im Reaktionsansatz für jeden Real-Time PCR-Assay (Assay 1 - 12), wurden unterschiedliche Primerkonzentrationen von 0,3 μM , 0,6 μM und 0,9 μM jeweils in Kombination mit den Sondenkonzentrationen (TaqMan[®]- oder TaqMan[®]MGB-Sonden) 0,1 μM , 0,2 μM oder 0,4 μM im Doppelansatz ausgetestet. Als DNA-Template diente jeweils eine positive Chlamydienkontrolle und eine negative Kontrolle (Wasser). Die Durchführung der Assays erfolgte wie oben unter Reaktionsansatz und Zyklusbedingungen angegeben.

3.9.5 Real-Time PCR-Untersuchung von DNA-Proben aus klinischem Probenmaterial

Chlamydiaceae-spezifische Real-Time PCR. Alle Proben wurden zunächst mit Hilfe des Chlamydiaceae-spezifischen Real-Time PCR-Assays 12 getestet (**Tabelle 15**). Reaktionsansatz und Zyklusbedingungen entsprachen den unter 3.9.4 beschriebenen Bedingungen, wobei als positive Kontrolle DNA des Chlamydien-Stammes Z 1904/82 und als negative Kontrolle Wasser eingesetzt wurden. Weiterführende Untersuchungen mittels Spezies-spezifischer Real-Time PCR-Assays kamen ausschließlich bei Proben mit positivem Ergebnis zur Anwendung.

Spezies-spezifische Real-Time PCR. Die DNA-Proben aus klinischem Probenmaterial wurden mit den im Kapitel 3.9.2 aufgeführten Real-Time PCR-Assays 1, 5, 6, 8, 9, 10 und 11 gemäß den in Kapitel 3.9.4 beschriebenen Bedingungen auf DNA von *Cp. psittaci*, *Cp. abortus*, *Cp. pecorum*, *Cp. felis*, *Cp. caviae* und *C. suis* untersucht. Dabei wurden jeweils alle Proben von Tauben, Schafen, Ziegen, Pferden, Hunden, Kaninchen und Meerschweinchen mit allen genannten PCR-Assays getestet (siehe **Tabelle 16**).

Von Psittaziden, Rindern, Schweinen und Katzen lagen so viele Proben vor, dass zunächst jeweils nur 20 Proben zufällig ausgewählt wurden und diese ebenfalls mit allen genannten PCR-Assays getestet wurden. Die jeweils restlichen Proben wurden nach einem tierartlich unterschiedlichen Schema untersucht: alle Proben von Psittaziden wurden der Prüfung mit den Assays 1, 5 und 6 (*Cp. psittaci*, *Cp. abortus*),

alle Rinder- und Schweineproben den Assays 1, 5, 6, 8, 11 (*Cp. psittaci*, *Cp. abortus*, *Cp. pecorum*, *C. suis*) und alle Katzenproben dem Assay 9 (*Cp. felis*) unterzogen (siehe **Tabelle 16**). Jeweils 10 dieser nach dem Schema getesteten und zufällig ausgewählten Proben einer Tierart, darunter Proben, die ein positives Ergebnis in der Chlamydiaceae-spezifischen Real-Time PCR, aber ein negatives Ergebnis in den ausgewählten Spezies-spezifischen Real-Time PCR-Assays zeigten, wurden ergänzend mit allen oben genannten Real-Time PCR-Assays nachuntersucht, so dass insgesamt jeweils 30 Proben einer Tierart mit allen oben genannten Real-Time PCR-Assays getestet wurden.

Tabelle 16: Auswahl der DNA-Proben für die Untersuchung auf Chlamydien-DNA mittels verschiedener Spezies-spezifischer Real-Time PCR-Assay.

Probenherkunft	Anzahl der ausgewählten DNA-Proben						
	<i>Cp. psittaci</i> A. 1 u. 5	<i>Cp. abortus</i> A. 6	<i>Cp. pecorum</i> A. 8	<i>Cp. felis</i> A. 9	<i>Cp. caviae</i> A. 10	<i>C. suis</i> A. 11	Chlamydiaceae A. 12
Psittaziden	77	77	30	30	30	30	77
Tauben	9	9	9	9	9	9	9
Rinder	100	100	100	30	30	100	100
Schafe	38	38	38	38	38	38	38
Ziegen	4	4	4	4	4	4	4
Schweine	128	128	128	30	30	128	128
Pferde	11	11	11	11	11	11	11
Hunde	5	5	5	5	5	5	5
Katzen	30	30	30	138	30	30	138
Kaninchen	4	4	4	4	4	4	4
Meerschweinchen	12	12	12	12	12	12	12

Erklärung: A. = Assay

3.9.6 Ringversuch der AVID-Arbeitsgruppe "Molekularbiologische Methoden in der Tierseuchendiagnostik" zum Nachweis von *Cp. psittaci* (Psittakose-Ringversuch) mit dem entworfenen Assay 1

Materialvergabe und Anleitung. Die Proben für den Ringversuch wurden am 13.06.2006 anlässlich einer vorbereitenden Sitzung in Jena an die Ringversuchsteilnehmer (siehe Teilnehmerliste im **Anhang**) zusammen mit einer Anleitung zur Probenbearbeitung ausgeteilt. Die FAM-markierte TaqMan[®]MGB-Sonde für den Nachweis von *Chlamydophila psittaci* (Assay 1) wurde vom NRL für Psittakose vom 17. bis 20.07.2006 an die Teilnehmer verschickt. Die zusätzlich für den Ringversuch benötigten Materialien wurden von den Teilnehmern selbst gestellt.

Geräte. Folgende Real-Time PCR-Geräte wurden von den Ringversuchsteilnehmern eingesetzt: Mx3000 bzw. Mx3005, Stratagene (n = 9), ABI Prism 7000 bzw. 7300, Applied Biosystems (n = 4), LightCycler, Roche (n = 1), Rotor Gene, Corbett (n = 1), i-Cycler, Bio-Rad (n = 1).

DNA-Gewinnung aus den Proben 11 - 25 des Ringversuchs. Die Tupfer der Proben 11 - 12, 14 - 15 und 17 - 25 wurden zunächst jeweils im spitz zulaufenden, vorderen Teil einer abgeschnittenen blauen Pipettenspitze (100 - 1.000 µl) gesteckt und in einem 2 ml Eppendorf-Gefäßes bei 12.000 x g für 1 min zentrifugiert, um sämtliche Flüssigkeit aus dem Tupfer zu pressen. Die weiteren Arbeitsschritte wurden für alle Proben des Ringversuchs (11 - 25), einschließlich der Proben 13 und 16 einheitlich durchgeführt. Als erster Schritt wurden in jedes Reaktionsgefäß 40 µl Proteinase pipettiert. Nach dem Mischen folgte eine Inkubation für 10 min bei 72 °C. Nach Zugabe von 100 µl Isopropanol und Mischen wurde das Lysat auf eine Säule, die sich in einem Sammelröhrchen befand, überführt und bei 6.000 x g für 1 min zentrifugiert. Das auf diese Weise in einem Sammelröhrchen gewonnene Filtrat wurde verworfen, die Säule in ein neues Sammelröhrchen gesetzt, mit 500 µl Inhibitor Removal Puffer befüllt und anschließend erneut bei 6.000 x g für 1 min zentrifugiert. Auch dieses Filtrat wurde verworfen, die Säule in ein neues Sammelröhrchen gesetzt und diesmal mit 500 µl Waschpuffer befüllt. Es folgte

wieder eine Zentrifugation bei 6.000 x g für 1 min. Dieser mit Hilfe von Zentrifugation durchgeführte Waschschrift wurde in einem neuen Sammelröhrchen wiederholt, wobei die durch die Säule durchgelaufenen Waschlösungen verworfen wurden. Nach dem letzten Waschschrift wurde die Säule in dem gleichen Sammelröhrchen bei 10.000 x g für 10 s zentrifugiert, um den Waschpuffer vollständig von der Säulenmembran zu entfernen. Nach dem Umsetzen der Säule in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß, Befüllen der Säule mit 200 µl auf 70 °C vorgewärmtem Elutionspuffer und Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur folgte eine Zentrifugation bei 6.000 x g für 1 min zur Gewinnung der DNA. Die DNA (Eluat) wurde bis zur Verwendung spätestens am nächsten Tag bei 4 °C gelagert.

Chlamydiaceae-spezifische Real-Time PCR im Test mit interner Amplifikationskontrolle IC 2. Alle Proben für den Psittakose-Ringversuch (1 - 25) wurden zunächst im Doppelansatz mit Hilfe des Chlamydiaceae-spezifischen Real-Time PCR-Assays 12, der nach dem Prinzip einer Duplex-PCR durch eine interne Amplifikationskontrolle ergänzt wurde, untersucht. Hierzu wurde gemäß den Angaben des NRL pro Reaktionsansatz (Gesamtvolumen 25 µl) zu 12,5 µl Master Mix für die Multiplex-PCR jeweils 1,5 µl F-Primer und R-Primer (Endkonzentration jeweils 0,3 µM), 1 µl TaqMan[®]-Sonde (Endkonzentration 0,2 µM) und für die interne Amplifikationskontrolle 0,5 µl F-Primer und R-Primer (Endkonzentration jeweils 0,2 µM) und 1 µl TaqMan[®]-Sonde (Endkonzentration 0,2 µM) und 4 µl steriles Wasser in je eine Vertiefung einer PCR-Mikrotiterplatte pipettiert. Anschließend wurden 2 µl der jeweiligen DNA-Probe (Template), der positiven oder negativen Kontrolle und 0,5 µl des Templates für die interne Amplifikationskontrolle IC 2 zu jeder der Vertiefungen hinzu gegeben. Nach dem Versiegeln der PCR-Mikrotiterplatte mit einer optischen Klebefolie und nach der vollständigen Durchmischung mit Hilfe eines Mikrotiterplattenschüttlers folgte eine Zentrifugation bei 800 x g für 2 min. Vor dem Verbringen der PCR-Mikrotiterplatte in das Real-Time PCR-Gerät (Thermocycler) wurde zum Schutz der optischen Folie ein Schutzkissen (compression pad) nach Angaben des Herstellers direkt auf die Folie gelegt. Im Real-Time PCR-Protokoll folgte einer Uracyl-N-Glykosylase-Reaktion für 2 min bei 50 °C die Aktivierung der DNA-Polymerase (Hot Start PCR) für 15 min bei 95 °C und anschließend 45 Zyklen mit jeweils 15 sec bei 95 °C (Denaturierung) und 1 min bei 60 °C (Annealing und Elongation).

Tabelle 17: Nukleotidsequenzen der beiden Primer und der Gensonde für die interne Amplifikationskontrolle IC 2 (kloniert und präpariert von Dr. Bernd Hoffmann, Friedrich-Loeffler-Institut, Insel Riems, **117**) des Real-Time PCR-Assays 13.

Real-Time PCR Assay	Bezeichnung	Sequenzen (5' - 3')
F-Primer	EGFP-1-F	GACCACTACCAGCAGAACAC
13 R-Primer	EGFP-10-R	CTTGTACAGCTCGTCCATGC
TaqMan [®] -Sonde	EGFP-HEX	HEX-AGCACCCAGTCCGCCCTGAGCA-BHQ1

Erklärung: BHQ1 = BlackHoleTM Dark Quencher

Befundung und Auswertung der Ergebnisse. Die Befundung der Proben wurde nach den vom NRL ausgegebenen Richtlinien, die in **Tabelle 18** aufgeführt sind, durchgeführt. Bis zum 19.10.2006 lagen die Ergebnisse von 15 der 16 teilnehmenden Laboratorien vor. Ein Teilnehmer legte seine Ergebnisse am 10.11.2006 vor. Die abschließende Auswertung des Ringversuches erfolgte am 13.11.2006 durch das NRL.

Tabelle 18: Vom Nationalen Referenzlabor für Psittakose des Friedrich-Loeffler-Instituts in Jena ausgegebene Richtlinien zur Befundung der Untersuchungsergebnisse von 25 Proben des Psittakose-Ringversuchs.

C_T-Wert	Befund*
2x \leq 40	positiv
2x > 40	fraglich positiv
1x \leq 40, 1x kein C _T / > 40	fraglich positiv
1x > 40, 1x kein C _T	fraglich negativ
2x kein C _T	negativ

Erklärung: Die DNA jeder Probe wurde einmal aufgereinigt und im Doppelansatz mittels Real-Time PCR getestet.

* Bei C_T-Wert der internen Amplifikationskontrolle (IC 2) \leq 40, Befund bei C_T-Wert der internen Amplifikationskontrolle > 40: inhibiert

***Cp. psittaci*- spezifische Real-Time PCR im Test mit interner Amplifikationskontrolle.** Die Proben 1 - 25 für den Ringversuch wurden nach der Untersuchung in der Chlamydiaceae-spezifischen Real-Time PCR in der *Cp. psittaci*- spezifischen Real-Time PCR (Assay 1) mit Einbindung der internen Amplifikationskontrolle getestet. Reaktionsansatz und Zyklusverlauf entsprachen den oben angegebenen Bedingungen, wobei abweichend anstelle von jeweils 1,5 μ l jeweils 2,25 μ l des F- und R-Primers (Endkonzentration 0,9 μ M) und anstelle von 4 μ l nur 2,5 μ l Wasser verwendet wurden. Die Befundung wurde ebenfalls nach den in **Tabelle 18** aufgeführten Kriterien vorgenommen.

3.9.7 DNA-Microarray-Assay

Einige der von der Vet Med Labor GmbH oder dem CVUAS zur Verfügung gestellten DNA-Proben wurden zur Abklärung an das NRL geschickt, um sie mit Hilfe der DNA-Microarray-Methode zu testen. Zum Einsatz kam die von Sachse et al. (216) beschriebene Microarray-Technik, die am NRL auch für Routineproben eingesetzt

wird. Diese Methode diente der Abklärung und Bestätigung von Ergebnissen die mittels Chlamydiaceae- und Spezies-spezifischen Real-Time PCR-Assays erzielt worden waren (siehe Kapitel **3.9.5**). Insgesamt wurde eine Auswahl von 15 DNA-Proben mit positiven Ergebnissen in der Chlamydiaceae-spezifischen und positiven, fraglichen oder negativen Ergebnissen in den Spezies-spezifischen Real-Time PCR-Assays an das NRL geschickt. Darüber hinaus wurde eine Proben eingeschendet, die in Spezies-spezifischen Real-Time PCR-Assays eine Chlamydien-Spezies ergab, bei der entsprechenden Tierart bisher aber noch nicht beschrieben worden war. Zusätzlich wurden 2 Proben von Schafen eingeschendet, die sehr niedrige C_T -Werte (< 25) in der *Cp. abortus*-Real-Time PCR (Assay 6) aufgewiesen und zusätzlich in Assay 5 (*Cp. psittaci*) mit C_T -Werten < 30 , nicht aber in Assay 1 für den Nachweis von *Cp. psittaci* positiv reagiert hatten.

3.9.8 Statistische Auswertung

Der Variationskoeffizient wurde wie folgt berechnet:

Variationskoeffizient = Standardabweichung s / Mittelwert \bar{x} :

$$\text{Standardabweichung } s = \pm \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n f_i^2}{n-1}},$$

wobei $f_i = x_i - \bar{x}$ (Abweichung der Messung x_i vom Mittelwert \bar{x})

n : Anzahl der Messungen

$$\text{Mittelwert } \bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n}$$

4 ERGEBNISSE

4.1 Eigenschaften der Spezies-spezifischen Real-Time PCR-Assays

4.1.1 Sonden- und Primerkonzentration

Zur Bestimmung geeigneter Primer- und Sondenkonzentrationen im Reaktionsansatz der Real-Time PCR-Assays 1, 5, 6 und 8 bis 12 wurden Primerkonzentrationen von 0,3 μM , 0,6 μM oder 0,9 μM in Kombination mit Sondenkonzentrationen (TaqMan[®]- oder TaqMan[®]MGB-Sonden) von jeweils 0,1 μM , 0,2 μM oder 0,4 μM im Reaktionsansatz jeweils im Doppelansatz getestet. Eingesetzt wurde als Template für die Assays die jeweilige positive Chlamydienkontrolle (DNA-Äquivalent zu 80.000 Chlamydien-Partikeln pro Reaktion) sowie Wasser als negative Kontrolle. Die Testergebnisse sind in der **Tabelle 19** dargestellt.

Die niedrigsten C_T -Werte konnten bei Kombinationen der höchsten gewählten Konzentrationen von Primern (0,9 μM) und Sonden (0,4 μM) erzielt werden. Da die Verwendung der kostenaufwändigen Sonden in einer Konzentration von 0,4 μM im Vergleich zu 0,2 μM in Verbindung mit Primerkonzentrationen von 0,9 μM keine wesentlich Veränderung der C_T -Werte ergab, wurden diese Konzentrationen gemäß den Angaben des Herstellers (Fa. Applied Biosystems) für weitere Versuche verwendet.

Tabelle 19: C_T-Werte (gerundeter Mittelwert von jeweils 2 C_T-Werten) der in Spezies-spezifischen Real-Time PCR-Assays getesteten positiven Chlamydienkontrollen (Chlamydien-Stämme) bei Verwendung unterschiedlicher Primer- und TaqMan®MGB-Sondenkonzentrationen. Die nach den Empfehlungen des Herstellers (Fa. Applied Biosystems) erzielten C_T-Werte sind grau hinterlegt.

Real-Time PCR-Assay	Chlamydien-Stamm (Spezies)	Primer-konzentration [µM]	C _T -Werte TaqMan®MGB-Sondenkonzentrationen		
			0,1 µM	0,2 µM	0,4 µM
1	Z 1904/82 (<i>Cp. psittaci</i>)	0,3	26,1	25,4	25,3
		0,6	25,7	25,2	25,1
		0,9	25,5	25,1	25,0
5	Z 1904/82 (<i>Cp. psittaci</i>)	0,3	27,2	26,2	26,0
		0,6	26,7	26,0	25,8
		0,9	26,4	25,8	25,6
6	Z 178/02 (<i>Cp. abortus</i>)	0,3	26,1	25,6	25,5
		0,6	25,7	25,5	25,4
		0,9	25,6	25,3	25,2
8	Z 114/02 (<i>Cp. pecorum</i>)	0,3	28,5	28,0	27,8
		0,6	28,3	27,7	27,5
		0,9	27,9	27,2	27,0
9	Z 3202-II/91 (<i>Cp. felis</i>)	0,3	31,0	30,6	30,3
		0,6	30,6	30,3	30,1
		0,9	30,4	29,8	29,7
10	432 (<i>Cp. caviae</i>)	0,3	27,9	27,4	27,2
		0,6	27,7	27,2	27,0
		0,9	27,3	26,8	26,6
11	Z 359/02 (<i>C. suis</i>)	0,3	27,7	26,7	26,4
		0,6	27,2	26,4	26,1
		0,9	26,8	26,0	25,7
12	Z 1904/82 (<i>Cp. psittaci</i>)	0,3	26,6	26,0	25,5
		0,6	26,3	25,7	25,3
		0,9	25,8	25,3	25,2

4.1.2 Spezifität und Sensitivität

Zur Bestimmung von Spezifität und Sensitivität der entwickelten Spezies-spezifischen Real-Time PCR-Assays wurden DNA-Präparate der verschiedenen Chlamydien-Stämme (siehe **Tabelle 4** und **Tabelle 5**) und anderer Bakterienstämme sowie der 10 Proben, die mit negativem Ergebnis in der Chlamydiaceae-spezifischen Real-Time PCR (Assay 12) getestet worden waren, in jedem der Spezies-spezifischen Real-Time PCR-Assays (Assays 1 - 11) einzeln untersucht. Die Ergebnisse zu diesen Untersuchungen sind in **Tabelle 20** zusammengefasst.

In den Versuchen mit den anderen Bakterienkulturen sowie mit den 10 negativen Proben konnten bei allen 11 Assays keine positiven Signale in Form von C_T -Werten in den Real-Time PCR-Läufen in 45 Zyklen ermittelt werden. Für den Nachweis von *Cp. psittaci* wurden 3 *Cp. psittaci*- Stämme (Z 1904/82, C12 und C19) in den *Cp. psittaci*-Assays 1 bis 5 getestet. In diesen Assays konnten für den Stamm Z 1904/82 C_T -Werte von ca. 25 bis 26, für den Stamm C12 C_T -Werte von ca. 28 bis 30 und für den Stamm C19 C_T Werte von ca. 30 bis 32 ermittelt werden. Die niedrigsten C_T -Werte wurden hierbei im Assay 1, die höchsten im Assay 5 erzielt. In den Assays 6 bis 11 erzielten die drei genannten *Cp. psittaci*-Stämme keine C_T -Werte.

Für *Cp. abortus* wurden die drei *Cp. abortus*-Stämme Z 178/02, Z 1215/86 und C18198 in allen Spezies-spezifischen Real-Time PCR-Assays untersucht. In den *Cp. abortus*-Assays 6 und 7 erreichten alle drei Stämme C_T -Werte von ca. 24 bis 25, wobei die Werte dicht beieinander lagen. Während die beiden *Cp. abortus*-Stämme Z 178/02 und Z 1215/86 auch in den *Cp. psittaci*-Assays 4 und 5 positiv reagierten und C_T -Werte von ca. 40 aufwiesen, waren in den Assays 1 - 3 und 8 - 11 mit allen drei *Cp. abortus*- Stämmen keine C_T -Werte nachweisbar.

Für den Nachweis von *Cp. pecorum* (Assay 8), *Cp. felis* (Assay 9), *Cp. caviae* (Assay 10) und *C. suis* (Assay 11) erzielten die Real-Time PCR-Assays eindeutige Ergebnisse. So wiesen die genannten Assays starke Reaktionen mit C_T -Werten von ca. 27 bis 30 mit den jeweils gewünschten Stämmen, nicht aber mit heterologen Chlamydien-Stämmen auf.

Tabelle 20: C_T-Werte der in den Spezies-spezifischen Real-Time PCR-Assays getesteten DNA-Präparate von Chlamydien-Stämmen

Spezies	Stamm	C _T -Werte					
		<i>Cp.</i>	<i>Cp.</i>	<i>Cp.</i>	<i>Cp.</i>	<i>Cp.</i>	<i>C.</i>
		<i>psittaci</i>	<i>abortus</i>	<i>pecorum</i>	<i>felis</i>	<i>caviae</i>	<i>suis</i>
	A. 1 - 5 ¹⁾	A. 6 - 7 ²⁾	A. 8	A. 9	A. 10	A. 11	
<i>Cp. psittaci</i>	Z 1904/82	25,4/25,4/25,4/ 26,0/26,1	*/*	*	*	*	*
	C12	28,3/29,0/29,0/ 29,6/29,7	*/*	*	*	*	*
	C19	30,1/30,2/30,6/ 31,7/31,8	*/*	*	*	*	*
<i>Cp. abortus</i>	Z 178/02	*/*/40,5/40,1	25,3/25,3	*	*	*	*
	Z 1215/86	*/*/40,3/40,2	24,4/24,3	*	*	*	*
	C18198	*/*/*/*	25,1/25,1	*	*	*	*
<i>Cp. pecorum</i>	Z 114/02	*/*/*/*	*/*	27,1	*	*	*
<i>Cp. felis</i>	Z 3202-II/91	*/*/*/*	*/*	*	29,8	*	*
<i>Cp. caviae</i>	432	*/*/*/*	*/*	*	*	26,9	*
<i>C. suis</i>	Z 359/02	*/*/*/*	*/*	*	*	*	26,1

Erklärung: ¹⁾ = 5 Assays für den Nachweis von *Cp. psittaci* (Assays 1/ 2/ 3/ 4/ 5)

²⁾ = 2 Assays für den Nachweis von *Cp. abortus* (Assays 6/ 7)

* = kein C_T-Wert innerhalb von 45 Zyklen messbar

A. = Assay

4.1.3 Nachweisgrenze

Zur Bestimmung der Nachweisgrenze der Real-Time PCR-Assays 1 - 12 wurde sowohl die DNA der gemäß Kapitel 3.8.3 ausgezählten Chlamydien suspensionen als auch die vom NRL zur Verfügung gestellte DNA von bereits ausgezählten Chlamydien-Stämmen (siehe **Tabelle 5**) in Verdünnungsstufen mit Hilfe der für die jeweilige Spezies entworfenen Real-Time PCR-Assays getestet. Dabei wurde vereinfachend angenommen, dass die in den eingesetzten Chlamydien suspensionen enthaltene DNA bei der Aufreinigung auch vollständig gewonnen werden konnte. Zunächst wurde die Chlamydien-Suspension des Stammes Z 1904/82 (*Cp. psittaci*) mit Wasser ausgehend von 10^8 Chlamydien-Partikeln/ml in \log_{10} -Schritten verdünnt.

- 1) Aus jeweils 200 μ l der einzelnen Verdünnungsstufen der Chlamydien-Suspensionen wurde wie unter 3.9.1 beschrieben 50 μ l DNA gewonnen. Durch den Einsatz von lediglich 2 μ l pro Reaktionsansatz, wurde somit in jedem Assay die DNA von 8×10^{-1} bis 8×10^5 Chlamydien-Partikeln in \log_{10} -Schritten getestet.
- 2) Zusätzlich wurde die aus der Chlamydien-Suspension Z 1904/82 mit 10^8 Chlamydien-Partikeln/ml gewonnene DNA (50 μ l mit dem DNA-Gehalt von 2×10^7 Chlamydien-Partikeln) in \log_{10} -Schritten verdünnt. Auch hier wurden 2 μ l pro Reaktionsansatz eingesetzt.

Somit konnte einerseits die DNA, die aus einzelnen Verdünnungsstufen der Chlamydien suspensionen gewonnen worden war, und andererseits die aus 2×10^7 Chlamydien-Partikeln gewonnene und anschließend verdünnte DNA in 2 Real-Time PCR-Assays (Assays 1 und 5) vergleichend getestet werden. Beide Verdünnungsreihen ergaben in jeweils einem der beiden Real-Time PCR-Assays vergleichbare Ergebnisse, so dass die Nachweisgrenzen der übrigen Real-Time PCR-Assays ausschließlich mit DNA-Verdünnungsreihen der jeweiligen Chlamydien-Stämme (siehe Kapitel 3.8.3) bestimmt wurden. Aus den vom NRL zur Verfügung gestellten Chlamydien-DNA-Lösungen wurden \log_{10} -Verdünnungsreihen hergestellt, wobei die einzelnen Verdünnungen DNA von 1×10^1 bis 1×10^7 EBE/ 50 μ l enthielten, um diese ebenfalls mit jeweils 2 μ l in den für die jeweilige Spezies entworfenen Real-Time PCR-Assays zu testen.

Die Messwerte (C_T -Werte) der in den Real-Time PCR-Assays getesteten Verdünnungsstufen der DNA sind in **Tabelle 21** bzw. **Tabelle 22** aufgeführt. In **Abbildung 4** ist der Verlauf der Amplifikationskurven dieser unterschiedlichen Verdünnungsstufen beispielhaft für den *Cp. psittaci*-Stamm Z 1904/82 unter Anwendung des Assays 1 dargestellt. Die mit Hilfe derartiger Amplifikationskurven errechneten Regressionsgeraden der Assays 1 - 12 sind einzeln in den **Abbildungen 5 bis 16** grafisch aufgearbeitet. Für die Assays 1, 5, 6, 7, 8 und 12 konnte eine Nachweisgrenze von 8 Chlamydien-Partikeln je Reaktionsansatz bzw. 4 EBE je Ansatz, für die Assays 2, 3, 4 und 9, 10, 11 eine Nachweisgrenze von 80 Chlamydien-Partikeln je Reaktionsansatz bzw. 40 EBE je Ansatz bestimmt werden.

Tabelle 21: Bestimmung von Nachweisgrenzen. C_T-Werte (gerundeter Mittelwert von jeweils 2 C_T-Messwerten) der in den Real-Time PCR-Assays getesteten Verdünnungsstufen von DNA-Extrakten, die aus ausgezählten Chlamydien-Suspensionen gewonnen worden sind.

Chlamydien-Spezies	Chlamydien-Stamm	Real-Time PCR-Assay	C _T -Werte						
			DNA-äquivalente Chlamydien-Partikel je Reaktionsansatz						
			8 x 10 ⁵	8 x 10 ⁴	8 x 10 ³	8 x 10 ²	8 x 10 ¹	8 x 10 ⁰	8 x 10 ⁻¹
<i>Cp. psittaci</i>	Z 1904/82	1	22,2	25,4	29,0	32,0	36,0	39,2	*
		2	23,0	26,3	29,3	33,0	36,2	*	*
		3	22,7	26,1	29,0	33,4	36,3	*	*
		4	22,0	25,3	28,7	32,3	35,5	*	*
		5	22,0	26,3	30,7	34,3	37,6	40,6	*
<i>Cp. abortus</i>	Z 178/02	6	21,3	25,3	28,1	32,1	35,5	39,4	*
		7	21,4	25,2	28,1	32,0	35,3	39,0	*
<i>Cp. pecorum</i>	Z 114/02	8	21,1	24,3	28,1	32,0	35,3	38,3	*
<i>Cp. felis</i>	Z 3202-II/91	9	23,9	27,1	30,3	33,8	37,0	*	*
<i>Cp. caviae</i>	432	10	23,2	26,0	30,0	33,2	36,2	*	*
<i>C. suis</i>	Z 359/02	11	22,6	25,3	29,1	32,5	35,9	*	*
<i>Cp. psittaci</i>	Z 1904/82		22,5	25,9	28,9	33,2	36,0	39,2	*
<i>Cp. abortus</i>	Z 178/02	12	22,1	25,6	29,5	32,8	35,7	38,9	*
<i>Cp. pecorum</i>	Z 114/02		22,2	25,5	29,4	32,8	35,8	39,0	*

Erklärung: * = kein C_T-Wert innerhalb von 45 Zyklen messbar

Tabelle 22: Bestimmung von Nachweisgrenzen. C_T -Werte (gerundeter Mittelwert von jeweils 2 C_T -Messwerten) der in den Real-Time PCR-Assays getesteten Verdünnungsstufen von Extrakten, die aus Einschlusskörperchen bildenden Einheiten (EBE) gewonnen worden sind.

Chlamydien-Spezies	Chlamydien-Stamm	Real-Time PCR-Assay	C_T -Werte						
			DNA-äquivalente EBE je Reaktionsansatz						
			4 x 10^5	4 x 10^4	4 x 10^3	4 x 10^2	4 x 10^1	4 x 10^0	4 x 10^{-1}
<i>Cp. psittaci</i>	C 12	1	22,4	25,8	29,0	32,9	35,8	39,1	*
	C 19		23,1	25,9	29,9	33,0	36,1	40,1	*
	C 12	2	23,3	26,0	29,2	33,1	36,3	*	*
	C 19		24,1	27,9	31,8	35,1	38,3	*	*
	C 12	3	22,9	25,9	28,7	32,9	36,1	*	*
	C 19		23,8	26,9	30,1	34,0	37,6	*	*
	C 12	4	22,2	25,4	29,1	32,1	35,9	*	*
	C 19		23,2	26,0	29,8	33,1	36,2	*	*
	C 12	5	22,8	25,9	29,6	33,2	36,4	40,1	*
	C 19		23,2	26,4	30,2	33,6	37,3	40,6	*
<i>Cp. abortus</i>	C18198	6	21,2	25,1	28,0	31,9	35,3	39,0	*
		7	21,2	25,0	27,9	31,9	35,1	39,0	*

Erklärung: * = kein C_T -Wert innerhalb von 45 Zyklen messbar

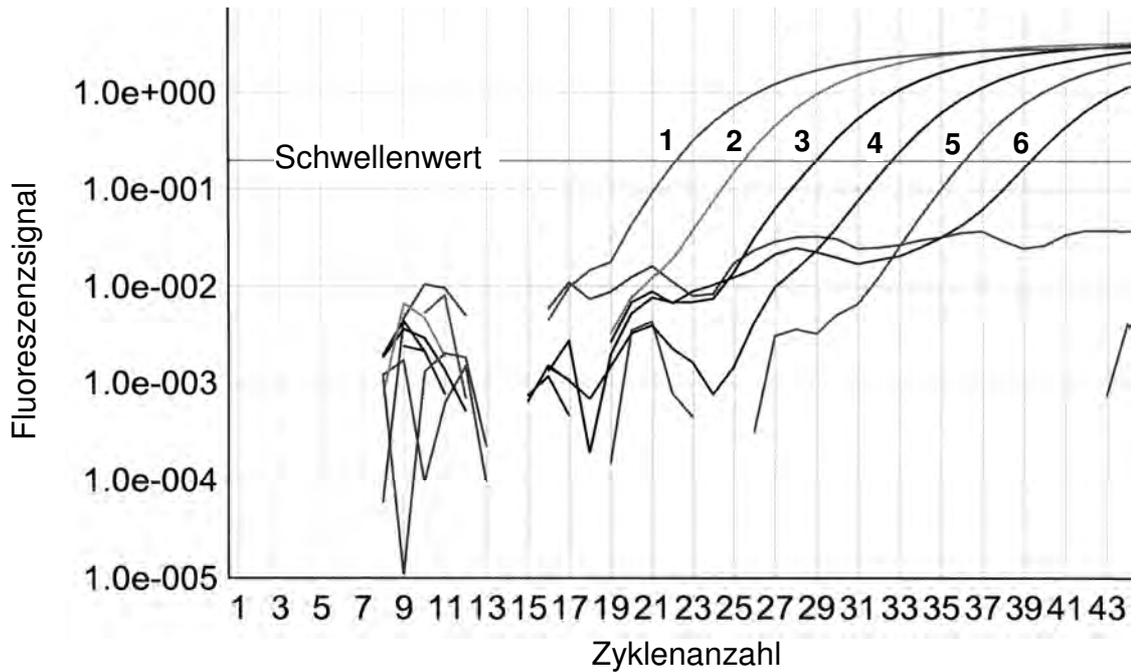


Abbildung 4: Amplifikationskurven der in Assay 1 getesteten DNA-Verdünnungsreihe des Stammes Z 1904/82 (*Cp. psittaci*) mit 6 Verdünnungsstufen. Die Reaktionsansätze enthielten DNA-Extrakte, die einer Chlamydien-Partikelanzahl von 8×10^5 (1), 8×10^4 (2), 8×10^3 (3), 8×10^2 (4), 8×10^1 (5), 8×10^0 (6) je Reaktionsansatz entsprachen.

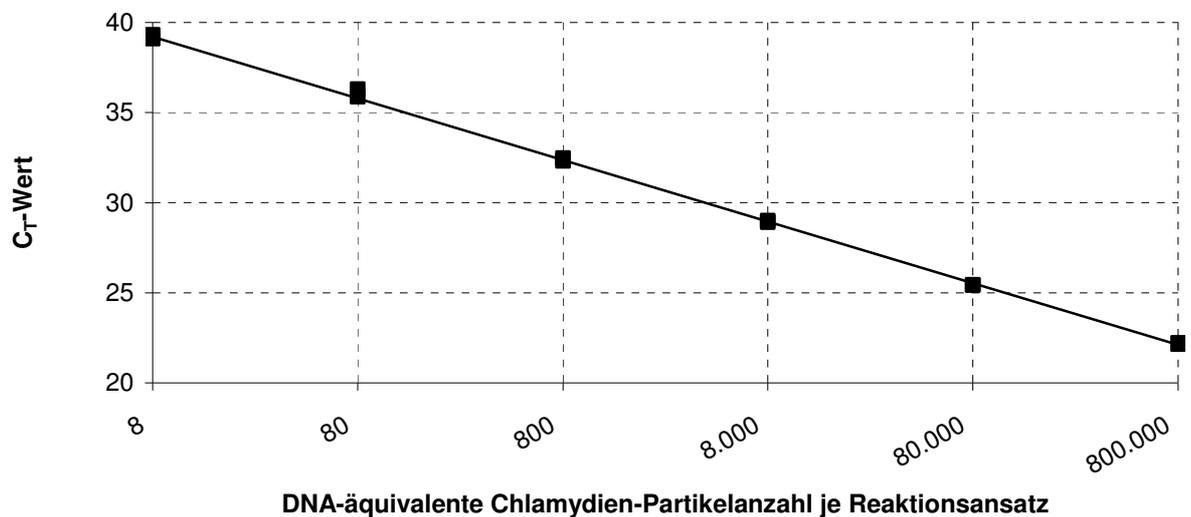


Abbildung 5: Aus den C_T -Messwerten ermittelte Regressionsgerade der mit dem Real-Time PCR-Assay 1 im Doppelansatz getesteten DNA-Verdünnungsreihe des Chlamydien-Stammes Z 1904/82 (*Cp. psittaci*). $R^2 = 0,9998$ (= Linearität der C_T -Werte), $y = -3,42 \times \log(x) + 39,207$, Effizienz = $10^{(-1/\text{Steigung})} - 1 = 96 \%$

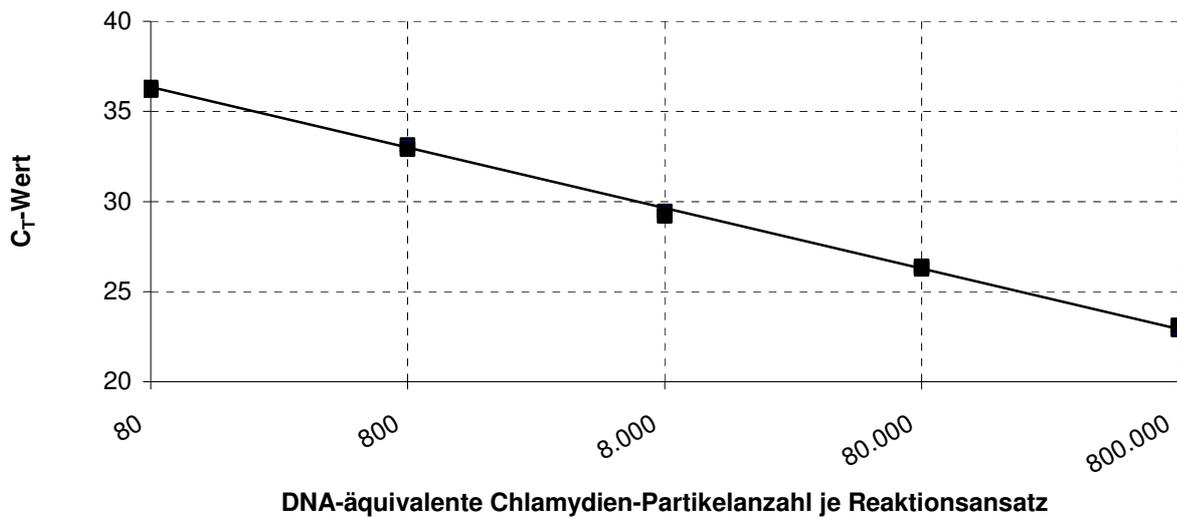


Abbildung 6: Aus den C_T-Messwerten ermittelte Regressionsgerade der mit dem Real-Time PCR-Assay 2 im Doppelansatz getesteten DNA-Verdünnungsreihe des Chlamydien-Stammes Z 1904/82 (*Cp. psittaci*). $R^2 = 0,9993$ (= Linearität der C_T-Werte), $y = -3,359 \times \log(x) + 39,713$, Effizienz = $10^{(-1/\text{Steigung})} - 1 = 98 \%$

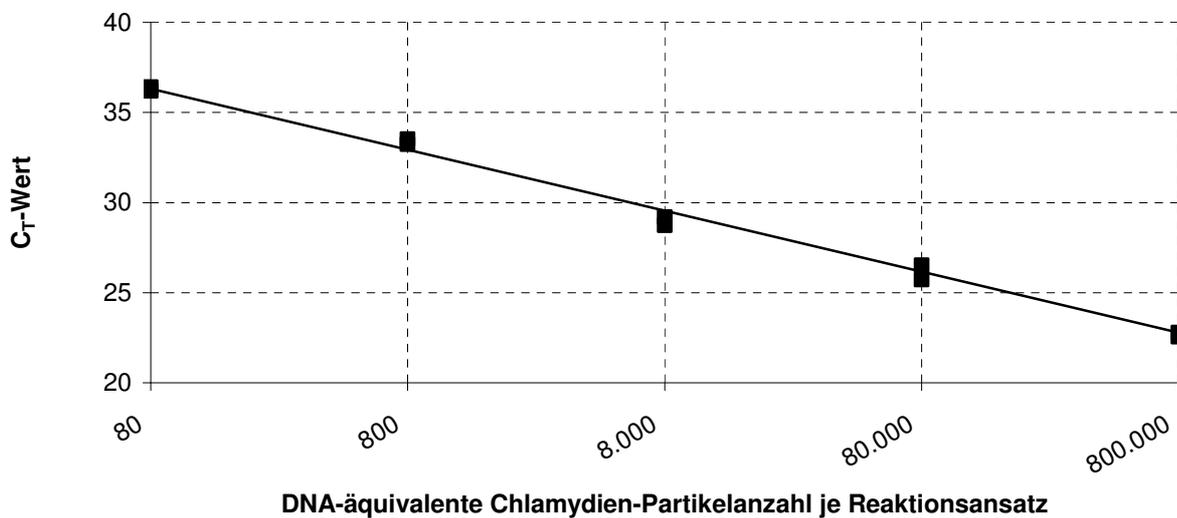


Abbildung 7: Aus den C_T-Messwerten ermittelte Regressionsgerade der mit dem Real-Time PCR-Assay 3 im Doppelansatz getesteten DNA-Verdünnungsreihe des Chlamydien-Stammes Z 1904/82 (*Cp. psittaci*). $R^2 = 0,994$ (= Linearität der C_T-Werte), $y = -3,383 \times \log(x) + 39,699$, Effizienz = $10^{(-1/\text{Steigung})} - 1 = 97 \%$

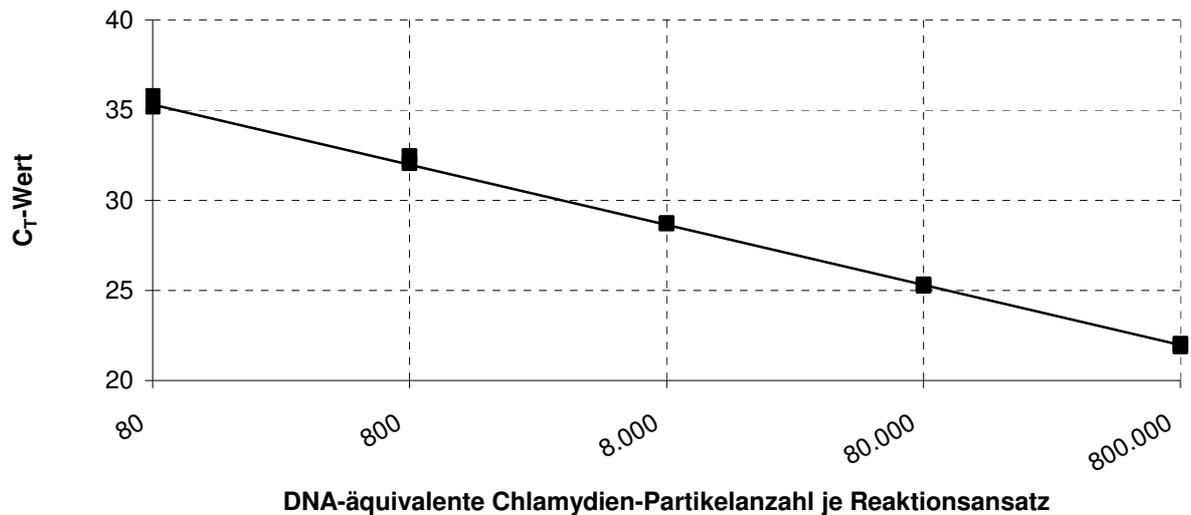


Abbildung 8: Aus den C_T-Messwerten ermittelte Regressionsgerade der mit dem Real-Time PCR-Assay 4 im Doppelansatz getesteten DNA-Verdünnungsreihe des Chlamydien-Stammes Z 1904/82 (*Cp. psittaci*). $R^2 = 0,9996$ (= Linearität der C_T-Werte), $y = -3,333 \times \log(x) + 38,631$, Effizienz = $10^{(-1/\text{Steigung})} - 1 = 99\%$

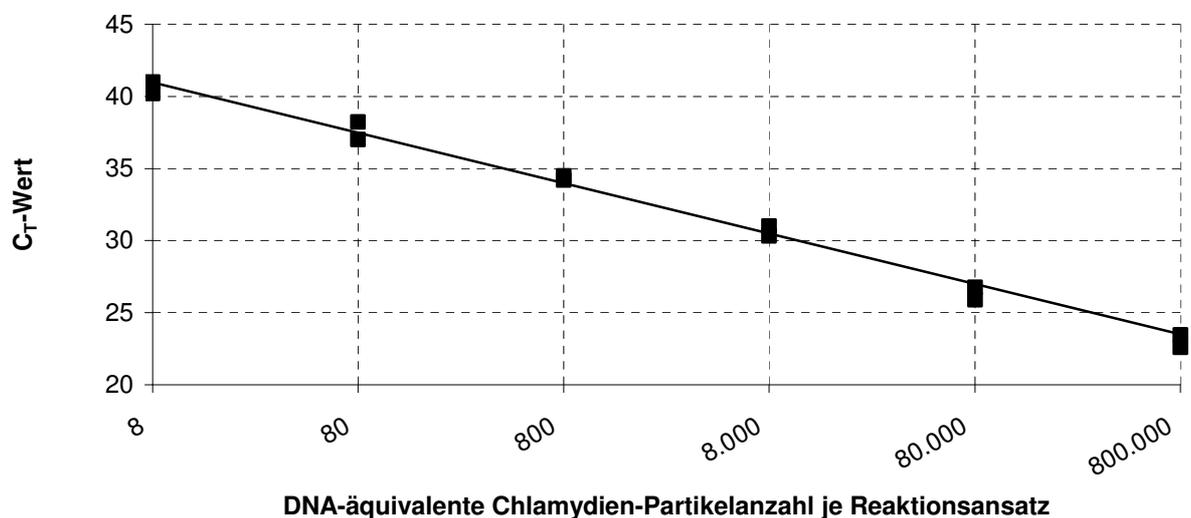


Abbildung 9: Aus den C_T-Messwerten ermittelte Regressionsgerade der mit dem Real-Time PCR-Assay 5 im Doppelansatz getesteten DNA-Verdünnungsreihe des Chlamydien-Stammes Z 1904/82 (*Cp. psittaci*). $R^2 = 0,993$ (= Linearität der C_T-Werte), $y = -3,4963 \times \log(x) + 40,979$, Effizienz = $10^{(-1/\text{Steigung})} - 1 = 93\%$

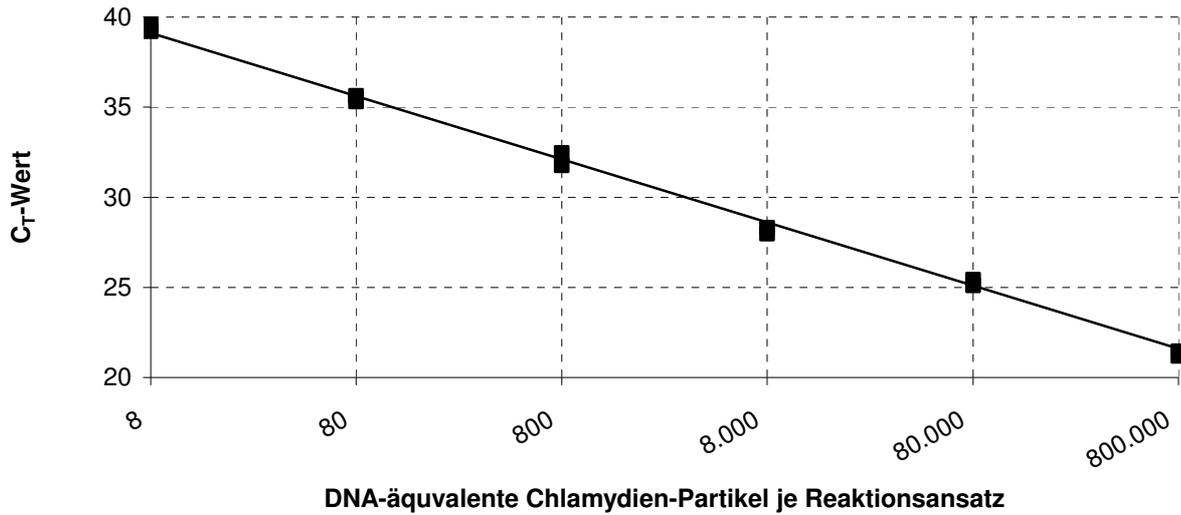


Abbildung 10: Aus den C_T-Messwerten ermittelte Regressionsgerade der mit dem Real-Time PCR-Assay 6 im Doppelansatz getesteten DNA-Verdünnungsreihe des Chlamydien-Stammes Z 178/02 (*Cp. abortus*). $R^2 = 0,998$ (= Linearität der C_T-Werte), $y = -3,5017 \times \log(x) + 39,111$, Effizienz = $10^{(-1/\text{Steigung})} - 1 = 93 \%$

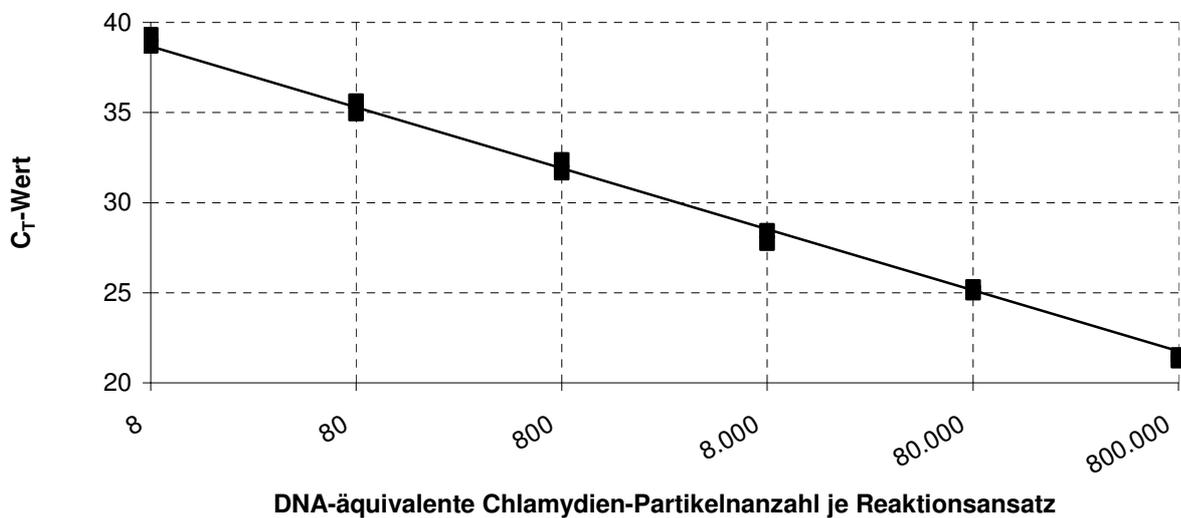


Abbildung 11: Aus den C_T-Messwerten ermittelte Regressionsgerade der mit dem Real-Time PCR-Assay 7 im Doppelansatz getesteten DNA-Verdünnungsreihe des Chlamydien-Stammes Z 178/02 (*Cp. abortus*). $R^2 = 0,998$ (= Linearität der C_T-Werte), $y = -3,3851 \times \log(x) + 38,68$, Effizienz = $10^{(-1/\text{Steigung})} - 1 = 97 \%$

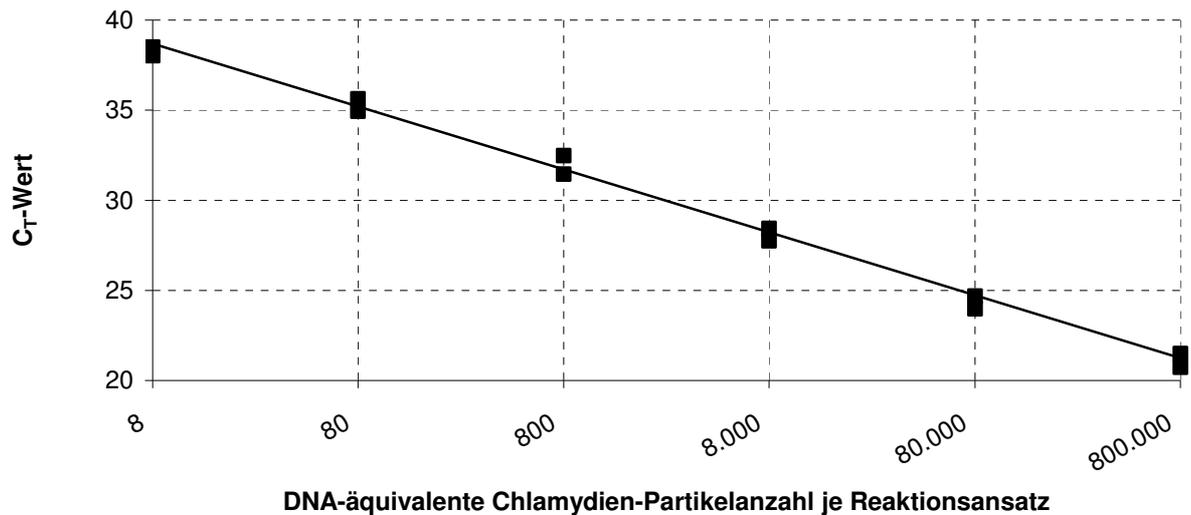


Abbildung 12: Aus den C_T-Messwerten ermittelte Regressionsgerade der mit dem Real-Time PCR-Assay 8 im Doppelansatz getesteten DNA-Verdünnungsreihe des Chlamydien-Stammes Z 114/02 (*Cp. pecorum*). $R^2 = 0,9935$ (= Linearität der C_T-Werte), $y = -3,4866 \times \log(x) + 38,681$, Effizienz = $10^{(-1/\text{Steigung})} - 1 = 94\%$

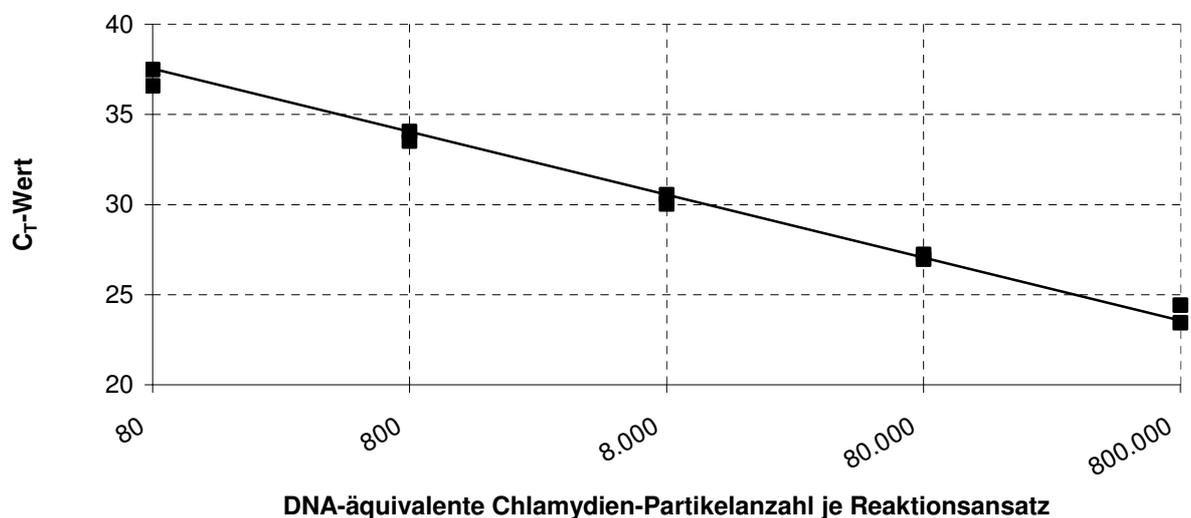


Abbildung 13: Aus den C_T-Messwerten ermittelte Regressionsgerade der mit Real-Time PCR-Assay 9 im Doppelansatz getesteten DNA-Verdünnungsreihe des Chlamydien-Stammes Z 3202-II/91 (*Cp. felis*). $R^2 = 0,9996$ (= Linearität der C_T-Werte), $y = -3,493 \times \log(x) + 41,025$, Effizienz = $10^{(-1/\text{Steigung})} - 1 = 93\%$

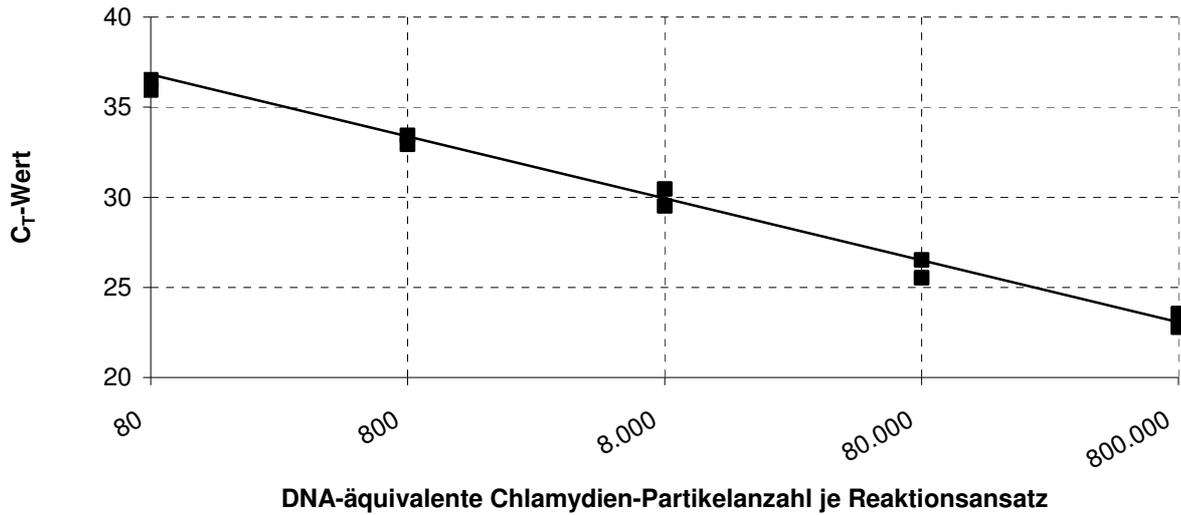


Abbildung 14: Aus den C_T-Messwerten ermittelte Regressionsgerade der mit dem Real-Time PCR-Assay 10 im Doppelansatz getesteten DNA-Verdünnungsreihe des Chlamydien-Stammes 432 (*Cp. caviae*). $R^2 = 0,9963$ (= Linearität der C_T-Werte), $y = -3,437 \times \log(x) + 40,249$, Effizienz = $10^{(-1/\text{Steigung}) - 1} = 95 \%$

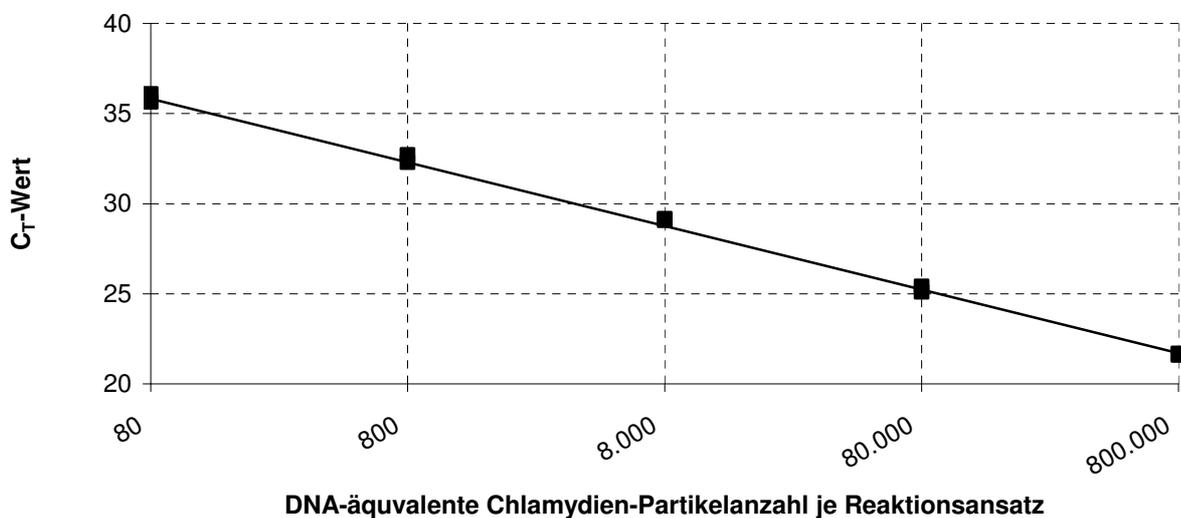


Abbildung 15: Aus den C_T-Messwerten ermittelte Regressionsgerade der mit dem Real-Time PCR-Assay 11 im Doppelansatz getesteten DNA-Verdünnungsreihe des Chlamydien-Stammes Z 359/02 (*C. suis*). $R^2 = 0,9984$ (= Linearität der C_T-Werte), $y = -3,529 \times \log(x) + 39,349$, Effizienz = $10^{(-1/\text{Steigung}) - 1} = 92 \%$

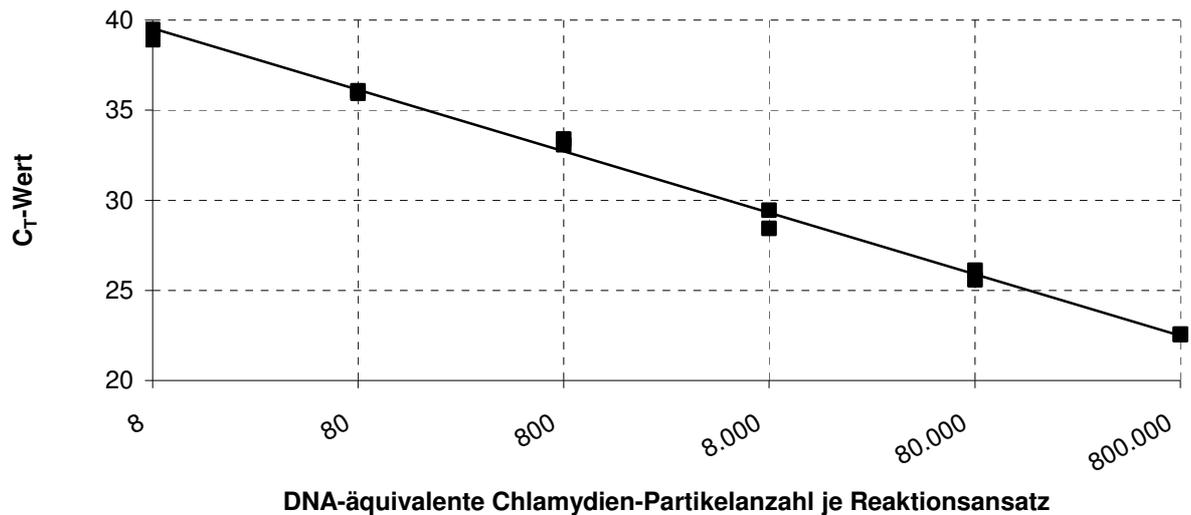


Abbildung 16: Aus den C_T-Messwerten ermittelte Regressionsgerade der mit dem Real-Time PCR-Assay 12 im Doppelansatz getesteten DNA-Verdünnungsreihe des Chlamydien-Stammes Z 1904/82 (*Cp. psittaci*). $R^2 = 0,9937$ (= Linearität der C_T-Werte), $y = -3,4094 \times \log(x) + 39,532$, Effizienz = $10^{(-1/\text{Steigung})} - 1 = 96 \%$

4.1.4 Reproduzierbarkeit

Als Maß für die Reproduzierbarkeit von Ergebnissen der Real-Time PCR-Assays 1 bis 12 wurden Variationskoeffizienten sowohl für die C_T-Werte einer Probe, die mehrfach in demselben PCR-Lauf geprüft wurde (Intra-Assay-Variationskoeffizienten) als auch für C_T-Werte voneinander unabhängig durchgeführter PCR-Läufe einer Probe (Inter-Assay-Variationskoeffizienten) errechnet. Datengrundlagen hierfür lieferten einerseits 5 C_T-Werte von je 3 DNA-Verdünnungsstufen äquivalent zu 8×10^1 , 8×10^2 und 8×10^4 Chlamydien-Partikeln pro Reaktionsansatz aus einem Real-Time PCR-Lauf (Intra-Assay-Variationskoeffizient) und andererseits die C_T-Werte dieser 3 DNA-Verdünnungsstufen von insgesamt jeweils 5 PCR-Läufen (Inter-Assay-Variationskoeffizient).

Die ermittelten Intra-Assay-Variationskoeffizienten sind in **Tabelle 23**, die Inter-Assay-Variationskoeffizienten in **Tabelle 24** dargestellt. Es wird ersichtlich, dass für jeden Real-Time PCR-Assay der niedrigste Intra- wie auch Inter-Assay-

Variationskoeffizient bei der höchsten Chlamydien-Konzentration erzielt wurde und umgekehrt mit sinkender Chlamydien-Konzentration deutlich steigt.

Tabelle 23: Intra-Assay-Variation der Real-Time PCR-Assays 1 bis 12. Variationskoeffizienten errechnet aus jeweils 5 C_T-Messwerten eines Real-Time PCR-Laufs für jeweils 3 DNA-Verdünnungsstufen.

Real-Time PCR-Assay	Spezies	Stamm	Variationskoeffizient [%]		
			DNA-äquivalente Chlamydien-Partikelanzahl je Reaktionsansatz		
			8 x 10 ⁴	8 x 10 ²	8 x 10 ¹
1	<i>Cp. psittaci</i>	Z 1904/82	3,9	15,4	28,4
2	<i>Cp. psittaci</i>	Z 1904/82	7,5	20,6	31,0
3	<i>Cp. psittaci</i>	Z 1904/82	8,3	18,9	31,5
4	<i>Cp. psittaci</i>	Z 1904/82	10,2	25,8	33,1
5	<i>Cp. psittaci</i>	Z 1904/82	13,5	27,5	48,8
6	<i>Cp. abortus</i>	Z 178/02	6,4	17,5	29,3
7	<i>Cp. abortus</i>	Z 178/02	5,6	18,3	35,2
8	<i>Cp. pecorum</i>	Z 114/02	12,0	23,9	31,8
9	<i>Cp. felis</i>	Z 3202-II/91	9,3	21,1	30,7
10	<i>Cp. caviae</i>	432	9,4	19,0	29,8
11	<i>C. suis</i>	Z 359/02	12,7	23,5	32,7
12	<i>Cp. psittaci</i>	Z 1904/82	8,1	20,1	28,3

Tabelle 24: Inter-Assay-Variation der Real-Time PCR-Assays 1 bis 12. Variationskoeffizienten errechnet aus C_T -Messwerten von 5 Real-Time PCR-Läufen für jeweils 3 DNA-Verdünnungsstufen.

Real-Time PCR-Assay	Spezies	Stamm	Variationskoeffizient [%]		
			DNA-äquivalente Chlamydien-Partikelanzahl je Reaktionsansatz		
			8×10^4	8×10^2	8×10^1
1	<i>Cp. psittaci</i>	Z 1904/82	8,4	27,2	35,4
2	<i>Cp. psittaci</i>	Z 1904/82	10,5	30,3	39,0
3	<i>Cp. psittaci</i>	Z 1904/82	9,8	31,8	38,7
4	<i>Cp. psittaci</i>	Z 1904/82	15,1	36,2	42,3
5	<i>Cp. psittaci</i>	Z 1904/82	17,0	35,3	50,9
6	<i>Cp. abortus</i>	Z 178/02	11,2	29,4	36,5
7	<i>Cp. abortus</i>	Z 178/02	11,5	27,1	32,3
8	<i>Cp. pecorum</i>	Z 114/02	19,2	32,6	46,7
9	<i>Cp. felis</i>	Z 3202-II/91	16,5	30,4	41,2
10	<i>Cp. caviae</i>	432	14,6	34,3	40,0
11	<i>C. suis</i>	Z 359/02	18,3	33,5	47,1
12	<i>Cp. psittaci</i>	Z 1904/82	9,8	26,7	37,6

4.2 Nachweis von *Chlamydia* und *Chlamydophila* spp. bei Haustieren

4.2.1 Richtlinien für die Befundung der Untersuchungsergebnisse

Die von der Vet Med Labor GmbH (IDEXX) und vom Chemischen und Veterinäruntersuchungsamt Stuttgart (CVUAS) zur Verfügung gestellten DNA-Proben (n = 526) wurden zunächst mit dem Chlamydiaceae-spezifischen Real-Time PCR-Assay 12 untersucht. Mit Hilfe der Spezies-spezifischen Real-Time PCR-Assays 1, 5, 6, 8, 9, 10 und 11 wurden die Proben dann auf das Vorkommen der DNA von *Cp. psittaci*, *Cp. abortus*, *Cp. pecorum*, *Cp. felis*, *Cp. caviae* und *C. suis* getestet. Proben, die ein positives Ergebnis in dem Chlamydiaceae-spezifischen Real-Time PCR-Assay, aber ein negatives Ergebnis in den in **Tabelle 16** je nach Tierart ausgewählten Spezies-spezifischen Real-Time PCR-Assays zeigten, wurden ergänzend mit allen oben genannten Real-Time PCR-Assays nachuntersucht.

Grundlagen für die Bewertungen der einzelnen Assays bildeten die C_T -Werte. Reaktionen mit C_T -Werten von ≤ 40 wurden als positive, und Reaktionen mit C_T -Werten von > 40 oder nicht nachweisbaren C_T -Werten als negative Reaktion bewertet. Da für den Nachweis von *Cp. psittaci* zwei Assays (Assay 1 und 5) zum Einsatz kamen, wurden die in **Tabelle 25** aufgeführten Bewertungskriterien unter Einbindung der Reaktionen beider Testsysteme festgelegt.

Tabelle 25: Schlüssel für die Ergebnisbewertungen beim Nachweis von *Cp. psittaci*-DNA.

Ergebnis Assay 1 (<i>Cp. psittaci</i>)	Ergebnis Assay 5 (<i>Cp. psittaci</i>)	Ergebnis Assay 6 (<i>Cp. abortus</i>)	Befund
positiv	positiv	negativ oder positiv	<i>Cp. psittaci</i> -positiv
positiv	negativ	negativ oder positiv	<i>Cp. psittaci</i> -positiv
negativ	positiv	positiv (C _T -Wert ≤ 30)	<i>Cp. psittaci</i> -negativ <i>Cp. abortus</i> -positiv *
negativ	positiv	positiv (C _T -Wert > 30 - ≤ 40)	<i>Cp. psittaci</i> und <i>Cp. abortus</i> (nicht unterscheidbar)
negativ	positiv	negativ	<i>Cp. psittaci</i> -positiv
negativ	negativ	negativ oder positiv	<i>Cp. psittaci</i> -negativ

Erklärung: * Bei diesen Proben lagen sehr niedrige C_T-Werte (< 30) für den Nachweis von *Cp. abortus*-DNA (Assay 6) vor. Aufgrund der Untersuchungen zur Spezifität des Real-Time PCR-Assays 5 (siehe Kapitel 4.1.2) und der Vergleichsuntersuchungen dieser Proben mit der Spezies-spezifischen Microarray-Technik (siehe S. 86 Probe 7 und 8) wurden diese Proben als *Cp. psittaci*-negativ bewertet.

4.2.2 Übersicht über die Ergebnisse in den verschiedenen Real-Time PCR-Assays

Sowohl die von der Vet Med Labor GmbH (IDEXX) als auch die vom Chemischen und Veterinäruntersuchungsamt Stuttgart (CVUAS) zur Verfügung gestellten DNA-Proben (n = 526) erzielten im Chlamydiaceae-spezifischen Real-Time PCR-Assay 12 C_T-Werte zwischen 15 und 39 und konnten somit eindeutig als positiv bewertet werden. Dabei handelte es sich um Proben von 77 Papageien, 9 Tauben, 100 Rindern, 38 Schafen, 4 Ziegen, 128 Schweinen, 11 Pferden, 5 Hunden, 138 Katzen, 12 Meerschweinchen und 4 Kaninchen, die im Vorfeld bereits positiv auf

Chlamydiaceae (308 Proben) bzw. *Chlamydia psittaci* (alte Taxonomie, 218 Proben) getestet worden waren. Die Untersuchungsergebnisse der DNA-Proben mit Hilfe der Spezies-spezifischen Real-Time PCR-Assays 1, 5, 6, 8, 9, 10 und 11 sind in **Tabelle 26** und **Tabelle 27** zusammengefasst. In jedem der entwickelten Spezies-spezifischen Real-Time PCR-Assays wurden sowohl positive als auch negative Ergebnisse erzielt. Der Assay 6 (*Cp. abortus*) reagierte 220-mal, der Assay 9 (*Cp. felis*) 139-mal, der Assay 1 99-mal und der Assay 5 95-mal (beide *Cp. psittaci*) und der Assay 11 (*C. suis*) 89-mal positiv. Einzig die Probe einer Taube erzielte in keinem Spezies-spezifischen Real-Time PCR-Assay ein positives Ergebnis.

Von insgesamt 277 Proben von Schweinen, Rindern, Schafen und Pferden reagierten insgesamt 56 in Spezies-spezifischen Real-Time PCR-Assays für den Nachweis von 2 verschiedenen Chlamydien-Spezies positiv (siehe **Tabelle 26**).

Tabelle 26: Nachweis von *Chlamydophila* ssp. und *C. suis* bei Schweinen, Rindern, Schafen und Pferden.

Chlamydien-Spezies	Anzahl positiver Reagenten				
	Schweine	Rinder	Schafe	Pferde	Summe
<i>Cp. psittaci</i>	2	9	0	0	11
<i>Cp. abortus</i>	44	76	30	8	158
<i>Cp. pecorum</i>	0	4	1	0	5
<i>C. suis</i>	45	1	0	1	47
<i>Cp. felis</i>	0	0	0	0	0
<i>Cp. psittaci/Cp. abortus</i>	5	2	0	0	7
<i>Cp. abortus/Cp. pecorum</i>	1	0	7	0	8
<i>Cp. abortus/C. suis</i>	27	7	0	2	36
<i>Cp. pecorum/C. suis</i>	4	1	0	0	5
Summe	128	100	38	11	277

Tabelle 27: Nachweis von *Chlamydia*- und *Chlamydophila* spp. (*C./Cp.*-Spezies) bei Haustieren mittels Spezies-spezifischer Real-Time PCR-Assays.

Tierart bzw. Tiergruppe	Labor	Anzahl der Proben	Anzahl der Proben in den Real-Time PCR-Assays für den Nachweis von												
			<i>Cp. psittaci</i> A. 1 und 5 (vgl. Tabelle 28)		<i>Cp. abortus</i> A. 6		<i>Cp. pecorum</i> A. 8		<i>Cp. felis</i> A. 9		<i>Cp. caviae</i> A. 10		<i>C. suis</i> A. 11		
			US	+	US	+	US	+	US	+	US	+	US	+	
Papageien/ Sittiche	CVUAS	21	21	15	21	6	14	0	14	0	14	0	14	0	0
Papageien/ Sittiche	Vetmedlab	56	56	56	0	16	0	16	0	16	0	16	0	0	
Tauben	CVUAS	2	2	2	0	2	0	2	0	2	0	2	0	0	
Tauben	Vetmedlab	7	7	5	1	7	0	7	0	7	0	7	0	1	
Rinder	CVUAS	100	100	11	100	85	100	5	30	0	30	0	100	9	
Schafe	CVUAS	38	38	0	38	37	38	8	38	0	38	0	38	0	
Ziegen	CVUAS	4	4	1	4	3	4	0	4	0	4	0	4	0	
Schweine	CVUAS	128	128	7	128	77	128	5	30	0	30	0	128	76	
Pferde	CVUAS	11	11	0	11	10	11	0	11	0	11	0	11	3	
Hunde	Vetmedlab	5	5	0	5	0	5	0	5	4	5	1	5	0	
Katzen	Vetmedlab	138	30	2	30	0	30	0	138	135	30	0	30	1	
Kaninchen	CVUAS	4	4	0	4	0	4	0	4	0	4	4	4	0	
Meerschweinchen	Vetmedlab	12	12	0	12	0	12	0	12	0	12	12	12	0	
Summe		526	418	99	418	219	371	18	311	139	203	17	371	89	

Erklärung: CVUAS = Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Stuttgart

Vetmedlab = Vet Med Labor GmbH (IDEXX)

US = untersucht

+ = positiv

A = Assay

In **Tabelle 28** sind insgesamt 99 Proben, die als *Cp. psittaci*-positiv beurteilt wurden, aufgeführt. Darunter befinden sich 71 Proben von Papageien und Sittichen, 11 von Rindern, 7 von Tauben, 7 von Schweinen, 2 von Katzen und eine Probe von einer Ziege. Von diesen Proben reagierten alle Vogelproben (Papageien, Sittiche und Tauben), 8 Rinder-, 6 Schweine- und 2 Katzenproben sowie die Probe der Ziege sowohl in Assay 1 als auch in Assay 5 positiv. Positiv in Assay 1 und negativ in Assay 5 reagierten 3 Proben von Rindern und die Probe eines Schweins. Keine Probe reagierte ausschließlich in Assay 5 positiv. Bei 2 Rinder- und 5 Schweineproben wurden zusätzlich zu den positiven Reaktionen in den *Cp. psittaci*-spezifischen Real-Time PCR-Assays 1 und 5 eine positive Reaktion im Real-Time PCR-Assay 6 (*Cp. abortus*) festgestellt.

Tabelle 28: Nachweis von *Cp. psittaci* bei Haustieren unter Anwendung der Real-Time PCR Assays 1 und 5.

Probenherkunft	Anzahl an Proben mit positivem <i>Cp. psittaci</i> -Befund	Anzahl der Proben mit positivem Ergebnis		
		in Assay 1 und Assay 5	nur in Assay 1	nur in Assay 5
Papageien/Sittiche	71	71	0	0
Tauben	7	7	0	0
Rinder	11	8	3	0
Schweine	7	6	1	0
Katzen	2	2	0	0
Ziegen	1	1	0	0
Summe	99	95	4	0

Am häufigsten reagierte der Real-Time PCR-Assay 6 (*Cp. abortus*) bei Nutztieren positiv. So wiesen 97,4 % der Schaf-, 90,1 % der Pferde-, 85,0 % der Rinder-, 75 % der Ziegen- und 60,2 % der Schweineproben positive Ergebnisse auf. Auffallend ist auch der Nachweis von *Cp. abortus*-DNA bei immerhin 7,8 % der Chlamydiaceae-positiven Papageien und Sittichen (Proben des CVUAS) sowie bei einer von 9 Tauben (Probe der Vet Med Labor GmbH). Des Weiteren war in 33 von 77 *Cp. abortus*-positiven Schweine-, in 7 von 37 *Cp. abortus*-positiven Schaf-, in 9 von

85 *Cp. abortus*-positiven Rinder- und in 2 von 10 *Cp. abortus*-positiven Pferdeproben zusätzlich DNA einer anderen Spezies nachweisbar.

DNA von *Cp. pecorum* wurde nur bei insgesamt drei Tierarten (Rind, Schwein und Schaf) mit Anteilen von 3,9 - 21,1 % nachgewiesen. Bei 18,4 % der Schafproben und bei 0,8 % der Schweineproben waren zusätzlich positive Reaktionen im Real-Time PCR-Assay 6 (*Cp. abortus*) feststellbar.

Die Spezies *C. suis* stand bei den Chlamydiaceae-positiven Proben von Schweinen im Vordergrund, wo deren DNA in 59,4 % der Proben nachgewiesen wurde. *C. suis*-DNA war aber auch bei Pferden (27,3 % der Proben), Rindern (9,0 %) und einer Katze nachweisbar. Das Schwein fällt auch in Hinblick auf den Nachweis von DNA zwei verschiedenen Chlamydien-Spezies auf. So sind 21,1 % der *C. suis*-positiven Proben mit dem Nachweis von *Cp. abortus*-DNA und 3,1 % mit dem Nachweis von *Cp. pecorum*-DNA vergesellschaftet.

DNA von *Cp. felis* und *Cp. caviae* wurde ausschließlich bei den Heimtieren Katze, Hund, Meerschweinchen und Kaninchen nachgewiesen. *Cp. felis*-DNA kam in 97,8 % der untersuchten Chlamydiaceae-positiven Katzenproben vor, aber auch in 4 der 5 untersuchten Hundeproben (80,0 %). Alle untersuchten Meerschweinchen- und Kaninchenproben, sowie die Probe eines Hundes reagierten im Real-Time PCR-Assay 10 (*Cp. caviae*) positiv. DNA von anderen Chlamydien-Spezies war im Zusammenhang mit positiven Befunden in den Real-Time PCR-Assays 9 und 10 (*Cp. caviae* und *Cp. felis*) nicht nachweisbar.

Die Verteilung der positiven Befunde bei den einzelnen Tierarten ist in den Kapiteln 4.2.3 bis 4.2.7 beschrieben.

4.2.3 Papageien, Sittiche und Tauben

Es wurden 20 von 77 DNA-Proben von Papageien und Sittichen sowie 9 DNA-Proben von Tauben, die bereits in der Chlamydiaceae-spezifischen Real-Time PCR (Assay 12) positiv getestet worden waren, unter Anwendung aller zur Verfügung stehender Spezies-spezifischer Real-Time PCR-Assays untersucht (*Cp. psittaci*-Assays 1 und 5, *Cp. abortus*-Assay 6, *Cp. pecorum*-Assay 8, *Cp. felis*-Assay 9, *Cp. caviae*-Assay 10 und *C. suis*-Assay 11). Bei weiteren 57 von Papageien und Sittichen stammenden und auf Chlamydiaceae positiv getesteten DNA-Proben wurden aufgrund der Ergebnisse der zuvor aufgeführten PCR-Assays nur noch die

Untersuchungen auf *Cp. psittaci*-DNA (Assays 1 und 5) und *Cp. abortus* (Assay 6) durchgeführt, wobei 10 zufällig hiervon ausgewählte Proben abschließend in den Assays 8 bis 11 nachgetestet wurden.

In 71,4 % der Proben vom CVUAS und in 100 % der Proben von der Vet Med Labor GmbH war DNA von *Cp. psittaci* enthalten. Insgesamt wurde in 71 (92,2 %) der 77 von Papageien und Sittichen untersuchten DNA-Proben *Cp. psittaci*-DNA nachgewiesen. In 7 (77,8 %) der 9 untersuchten Tauben-Proben konnte DNA von *Cp. psittaci* festgestellt werden. In 6 Proben (7,8 %) von Papageien und Sittichen (alle vom CVUAS) sowie in der Probe einer Taube (11,1 %) von der Vet Med Labor GmbH war der positive Chlamydiaceae-Befund auf DNA der Spezies *Cp. abortus* zurück zu führen. Bei der Probe einer weiteren Taube vom CVUAS konnte allerdings keine Chlamydien-Spezies mit Hilfe der zur Verfügung stehenden Spezies-spezifischen Real-Time PCR-Assays differenziert werden, obwohl die Untersuchung im Chlamydiaceae-spezifischen Real-Time PCR-Assay einen C_T-Wert von 34,6 ergeben hatte.

Weder bei den untersuchten papageienartigen Vögeln noch bei den Tauben konnte DNA von 2 verschiedenen Chlamydien-Spezies in derselben Probe nachgewiesen werden.

4.2.4 Wiederkäuer

Rinder

Es wurden 100 von Rindern stammende und in der Chlamydiaceae-spezifischen Real-Time PCR positiv getestete DNA-Proben mit Spezies-spezifischen Real-Time PCR-Assays nachuntersucht. In einem ersten Arbeitsschritt wurden hierfür 20 zufällig ausgewählte Proben mit allen zur Verfügung stehenden Spezies-spezifischen Real-Time PCR-Assays getestet (*Cp. psittaci*-Assays 1 und 5), *Cp. abortus*-Assay 6, *Cp. pecorum*-Assay 8, *Cp. felis*-Assay 9, *Cp. caviae*-Assay 10 und *C. suis*-Assay 11). In einem zweiten Schritt kamen aufgrund der Ergebnisse der vorangegangenen Untersuchungen für die übrigen 80 Proben nur noch die Assays 1, 5 und 6, 8 und 11 zum Einsatz, wobei 10 zufällig hiervon ausgewählte Proben abschließend mit den Assays 9 und 10 nachgetestet wurden.

In 85 DNA-Proben (85,0 %) konnte *Cp. abortus*-DNA festgestellt werden, in 11 Proben (11,0 %) *Cp. psittaci*-, in 5 Proben (5,0 %) *Cp. pecorum*- und in 9 Proben

(9,0 %) *C. suis*-DNA. Auffallend war, dass in 10 Proben DNA von 2 verschiedenen Spezies nachweisbar war. Hierbei handelte es sich bei 7 Proben um DNA von *Cp. abortus* und *C. suis*, bei 2 Proben um DNA von *Cp. abortus* und *Cp. psittaci* und bei einer Probe um DNA von *C. suis* und *Cp. pecorum*.

Schafe

Es wurden 38 von Schafen stammende Proben mit Hilfe aller zur Verfügung stehenden Real-Time PCR-Assays untersucht. Hierbei war mit 37 von 38 (97,4 %) positiven *Cp. abortus*-Nachweisen in Schafnachgeburten der Anteil *Cp. abortus* positiver Reagenten mit Abstand am höchsten. Deutlich geringer war mit 8 Proben (21,1 %) der Anteil der Nachweise von *Cp. pecorum*. Bei 7 Proben gelang der Nachweis der DNA von *Cp. abortus* und *Cp. pecorum*, bei einer Probe lag ausschließlich DNA von *Cp. pecorum* vor.

Ziegen

Insgesamt wurden 4 von Ziegen stammende Proben mit Hilfe aller zur Verfügung stehenden Real-Time PCR-Assays untersucht. Nachgewiesen wurden in 3 Proben DNA von *Cp. abortus* und in einer Probe DNA von *Cp. psittaci*.

4.2.5 Schweine

Die Auswahl der verwendeten Spezies-spezifischen Real-Time PCR-Assays entsprach derjenigen bei den Rindern. In 77 Proben (60,2 %) war der Nachweis von *Cp. abortus*-DNA und in 76 Proben (59,4 %) von *C. suis*-DNA möglich. Außerdem verliefen bei 7 Proben (5,5 %) die Untersuchungen auf *Cp. psittaci*-DNA und bei 5 Proben (3,9 %) auf *Cp. pecorum*-DNA mit positivem Ergebnis. Der einzelne Nachweis von *C. suis*-DNA kam in 45 Proben (35,2 %) vor, wobei 19 der Proben von den Konjunktiven, 24 vom Genitalbereich und von Nachgeburten und 3 aus dem Nasenbereich entnommen worden waren. In 44 Proben (34,4 %, von denen 43 aus dem Genitalbereich oder Nachgeburten und eine Probe aus dem Nasenbereich stammten, wurde DNA von *Cp. abortus* festgestellt.

Das gleichzeitige Vorhandensein von *C. suis*- und *Cp. abortus*-DNA betraf 27 von 128 Proben, wobei 21 Proben vom Genitalbereich oder Nachgeburtmaterial und 6 Proben von den Konjunktiven entnommen worden waren. Weitere Doppelreaktionen konnten bei 5 Proben (Genitalbereich oder Nachgeburtmaterial) mit den Assays für

Cp. psittaci und *Cp. abortus*, in 4 Fällen mit den Assays für *Cp. pecorum* und *C. suis* (3-mal von den Konjunktiven und einmal aus dem Genitalbereich oder aus Nachgeburtmaterial entnommen) und in einem Fall (Genitalbereich) mit dem Assay für *Cp. abortus* und *Cp. pecorum* festgestellt werden.

4.2.6 Pferde

Die Proben von Pferden stammten ausschließlich von Nachgeburtmaterial. Bei insgesamt 11 Proben gelang 10-mal (90,1 %) der Nachweis von *Cp. abortus*-DNA und 3-mal (27,3 %) der Nachweis von *C. suis*-DNA. Zur Anwendung kamen hierbei alle zur Verfügung stehenden Spezies-spezifischen Real-Time PCR-Assays (Assay 1, 5 und 6 sowie 8 - 11). Bei zwei Proben war sowohl DNA von *Cp. abortus* als auch von *C. suis* vorhanden.

4.2.7 Heimtiere

Hunde

Es wurden 5 von Hunden stammende Konjunktivaltupferproben unter Anwendung aller zur Verfügung stehender Spezies-spezifischer Real-Time PCR-Assays untersucht (Assays 1, 5 und 6 sowie 8 - 11). In vier Proben konnte *Cp. felis*- und in einer *Cp. caviae*-DNA nachgewiesen werden. Keine Probe wies DNA von zwei verschiedenen Chlamydien-Spezies auf.

Katzen

In 138 DNA-Proben von Katzen wurde 135-mal (97,8 %) *Cp. felis*-, 2-mal (1,4 %) *Cp. psittaci*- und einmal (0,7 %) *C. suis*-DNA nachgewiesen. Dabei waren zunächst 20 Proben mit den Assays 1, 5 und 6 sowie 8 - 11 und anschließend aufgrund der Ergebnisse der Vorauswahl 118 weitere Proben nur noch mit dem *Cp. felis*-spezifischen Assay 9 untersucht worden, wobei 10 zufällig hiervon ausgewählte Proben abschließend in den Assays 1, 5, 6, 8,10 und 11 nachgetestet wurden.

Meerschweinchen und Kaninchen

Es wurden 12 Proben von Meerschweinchen und 4 Proben von Kaninchen in den Assays 1, 5 und 6 sowie 8 - 11 untersucht. Die Kaninchen stammten aus

gemeinsamer Haltung mit Meerschweinchen. In allen Proben konnte DNA der Spezies *Cp. caviae* nachgewiesen werden.

4.3 Vergleich von Real-Time PCR- und DNA-Microarray-Ergebnissen

Zur Überprüfung der mit den Spezies-spezifischen Real-Time PCR-Assays erzielten Ergebnisse wurden 15 ausgewählte DNA-Proben im NRL mittels Microarray-Technik untersucht. Die Ergebnisse der beiden Methoden sind vergleichend in **Tabelle 29** dargestellt.

Bei 4 von 15 Proben (Proben Nr. 2 - 4 und 9) zeigt sich eine vollständige Übereinstimmung der Ergebnisse beider Testverfahren, während bei 11 Proben (Probe Nr. 1, 5 - 8 und 10 - 15) eine Abweichung der Ergebnisse vor allem hinsichtlich des Vorhandenseins der DNA von zwei Erregern festzustellen war. Bei 6 dieser 11 Proben weisen die Real-Time PCR-Ergebnisse auf einen Nachweis von *Cp. abortus*- und *C. suis*-DNA in einer Probe hin, mit Hilfe der Microarray-Technik konnte bei 5 dieser 6 Proben nur das Signal einer Chlamydien-Spezies (entweder *Cp. abortus*- oder *C. suis*), bei einer Probe kein Signal (Probe 14) gemessen werden. Es fällt auf, dass die Microarray-Technik bei Proben, in denen nach dem PCR-Ergebnis die DNA von zwei Spezies vorhanden war, immer nur das jeweils stärkere Real-Time PCR-Signal (kleinerer C_T-Wert) bestätigte (siehe **Tabelle 29**).

In den beiden von Schafen stammenden Proben (Probe 7 und 8) hatten sowohl der Assay 6 mit C_T-Werten von ca. 20 für den Nachweis von *Cp. abortus*, als auch der Assay 5 mit C_T-Werten von 26 bzw. 27 für den Nachweis von *Cp. psittaci* positiv reagiert. In den Microarray-Untersuchungen gelang allerdings nur der Nachweis von *Cp. abortus*. Die Real-Time PCR-Ergebnisse dieser beiden Proben waren gemäß der Bewertungskriterien der **Tabelle 25** („Ergebnisbewertungen für den Nachweis von *Cp. psittaci*-DNA“) als *Cp. abortus*-positiv und *Cp. psittaci*-negativ beurteilt worden.

Mit negativem Ergebnis verliefen die Microarray-Untersuchungen der Proben einer Amazone und einer Taube, obwohl in dem *Cp. abortus*- bzw. Chlamydiacee-spezifischen Real-Time PCR-Assay Signale messbar waren.

Tabelle 29: Ergebnisse der Spezies-spezifischen Real-Time PCR-Assays im Vergleich zu den Ergebnissen im Microarray-Assay

Probe Nr.	Herkunft	Ergebnis im Real-Time PCR Assay 12 [C _T -Wert]	Ergebnis im Real-Time PCR-Assay ¹ [Spezies (C _T -Wert)]	Ergebnis im Microarray-Assay
1	Katze	35,8	<i>C. suis</i> (35,2)	<i>C. suis</i> und <i>C. trachomatis</i>
2	Katze	34,2	<i>Cp. psittaci</i> (34,0)	<i>Cp. psittaci</i>
3	Wellensittich	34,4	<i>Cp. abortus</i> (34,4)	<i>Cp. abortus</i>
4	Sittich	34,9	<i>Cp. abortus</i> (34,8)	<i>Cp. abortus</i>
5	Amazone	35,6	<i>Cp. abortus</i> (35,5)	negativ
6	Taube	34,6	Kein Ergebnis **	negativ
7	Schaf	21,3	<i>Cp. abortus</i> (20,3), <i>Cp. psittaci</i> (27)*	<i>Cp. abortus</i>
8	Schaf	20,4	<i>Cp. abortus</i> (19,4), <i>Cp. psittaci</i> (26)*	<i>Cp. abortus</i>
9	Rind	34,6	<i>C. suis</i> (33,9), <i>Cp. pecorum</i> (35,2)	<i>C. suis</i> , <i>Cp. pecorum</i>
10	Rind	35,3	<i>Cp. abortus</i> (35,1), <i>C. suis</i> (37,0)	<i>Cp. abortus</i>
11	Rind	28,3	<i>Cp. abortus</i> (28,2), <i>C. suis</i> (37,3)	<i>Cp. abortus</i>
12	Rind	32,8	<i>Cp. abortus</i> (32,4), <i>C. suis</i> (37,0)	<i>Cp. abortus</i>
13	Rind	31,1	<i>Cp. abortus</i> (31,2), <i>C. suis</i> (37,7)	<i>Cp. abortus</i>
14	Rind	33,3	<i>Cp. abortus</i> (33,3), <i>C. suis</i> (37,9)	negativ
15	Pferd	32,6	<i>C. suis</i> (32,0), <i>Cp. abortus</i> (35,5)	<i>C. suis</i>

¹ Spezies-spezifische Real-Time PCR-Assays 1, 5 und 6 sowie 8-11

* Positives Signal für den Nachweis von *Cp. psittaci* nur in Assay 5 und nicht in Assay 1, der Nachweis von *Cp. psittaci* ist daher negativ (vgl. **Tabelle 25**)

** Kein C_T-Wert in den Spezies-spezifischen Real-Time PCR-Assays zu bestimmen

4.4 Ergebnisse des Psittakose-Ringversuchs

Gesamtergebnisse des Psittakose-Ringversuchs nach Auswertung durch das NRL Ziel des Ringversuchs war es, zwei Real-Time-PCR-Methoden (Assays 1 und 12) hinsichtlich deren Eignung für die veterinärmedizinische Chlamydiendiagnostik unter besonderer Berücksichtigung der Psittakose-/Ornithose-Diagnostik zu prüfen. Da es nicht Ziel des Ringversuchs war, die in den einzelnen Laboren angewendeten Methoden des Chlamydien-Nachweises vergleichend darzustellen, sondern der Schwerpunkt im Vergleich der Labore bei der Arbeit mit dem hier entworfenen *Cp. psittaci*-spezifischen Real-Time PCR (Assay 1) lag, einigte man sich im Vorfeld auf die Verwendung derselben Arbeitsprotokolle und Reagenzien.

Für den Ringversuch wurden nach vorheriger gemeinsamer Absprache und Planung insgesamt 25 Einzelproben sowie eine Positiv- und eine Negativ-Kontrolle vom NRL an die Teilnehmer verschickt. In **Tabelle 7** sind diese Proben näher beschrieben.

Von den 16 Versuchsteilnehmern wurden verschiedene Real-Time PCR-Geräte eingesetzt. Davon wurden 9-mal die Gerätetypen Mx3.000 bzw. 3.005 des Herstellers Stratagene, 4-mal die Gerätetypen ABI Prism 7.000 bzw. 7.300 des Herstellers Applied Biosystems und jeweils 1-mal der Gerätetyp LightCycler des Herstellers Roche, der Gerätetyp RotorGene des Herstellers Corbett Research sowie das Modell i-Cycler des Herstellers Bio-Rad verwendet.

Für die Beurteilung der Ergebnisse hatten die Teilnehmer eine Richtlinie vom NRL erhalten, die zunächst vorsah, alle C_T -Werte unter 40 als positiv zu bewerten. Bei Versuchsreihen im NRL lagen die C_T -Werte im Simplex-Modus, d.h. ohne die Einbeziehung der internen Amplifikationskontrolle IC2, um 2 bzw. 4 Einheiten niedriger als im Duplex-Modus. Außerdem wurden im *Cp. psittaci*-spezifischen Real-Time PCR-Assay für die Reagenzienkontrollen (NTC = Negativkontrolle) häufig C_T -Werte zwischen 40 und 45 gemessen. Bei der Chlamydiaceae-spezifischen Real-Time PCR wurden für die Negativkontrollen C_T -Werte unter 45 beobachtet. Die Daten veranlassten das NRL, später dann folgende Cutoff-Werte für die Auswertung des Ringversuchs zu benutzen:

$C_T \leq 38,0$ für den Chlamydiaceae- spezifischen Real-Time PCR-Assay

$C_T \leq 36,0$ für den *Cp. psittaci*- spezifischen Real-Time PCR-Assay

Bei der Auswertung des Ringversuchs durch das NRL wurden die o. g. neuen Cutoff-Werte zugrunde gelegt, wobei auf der Grundlage der von den Teilnehmern mitgeteilten C_T -Werte in einigen Fällen eine Korrektur der Befunde durch den Ringversuchskoordinator vorgenommen wurde.

Chlamydiaceae- spezifischer Real-Time PCR-Assay

Die Zusammenstellung der auf der Grundlage von C_T -Mittelwerten mitgeteilten Ringversuchsergebnisse zeigt, dass 14 von 25 Proben von allen Laboren richtig beurteilt wurden (siehe **Tabelle 30**). Wichtig erscheint, dass die Proben 16 und 21, beide enthielten DNA von 250 EBE, noch von 81,3 % der Teilnehmer als positiv erkannt wurden. Proben, die DNA von weniger als 25 EBE oder 25 EBE enthielten (Proben Nr. 18, 22, 23 und 25) wurden nahezu ausnahmslos als negativ bewertet.

In **Tabelle 32** ist zu erkennen, dass neun der 16 Teilnehmer alle 21 Proben mit mehr als 25 EBE oder 250 ng DNA korrekt erkannten. Ein weiteres Labor, welches nur 19 Proben erhalten hatte, lieferte ebenfalls vollständig korrekte Befunde. Zwei Teilnehmer erkannten jeweils eine Probe nicht richtig, drei weitere Teilnehmer zwei Proben und ein Teilnehmer 4 Proben nicht richtig.

***Cp. psittaci*- spezifischer Real-Time PCR-Assay**

Die Ergebnisse der *Cp. psittaci*-spezifischen Real-Time PCR sind in **Tabelle 31** zusammengestellt. Bei Anwendung dieses PCR-Assays wurden 12 der 21 Proben mit DNA von mehr als oder 25 EBE von allen Teilnehmern richtig erkannt. Alle verdünnten Proben mit weniger als 25 EBE wurden einheitlich als negativ befundet.

Ferner hatten alle Teilnehmer Probleme mit den Proben 6 und 7 (*C. suis* bzw. *Cp. pecorum*). Nach Berücksichtigung des neuen Cutoff-Wertes von 36 durch die Ringversuchsauswerter erkannten 75 % der Labore diese Proben richtigerweise als *Cp. psittaci*-negativ.

In einem Labor wurden durch die Herabsetzung des Cutoff-Wertes auf 36 die Proben mit DNA von 250 und 2.500 EBE nicht bzw. nicht mehr sicher erkannt. Die Nachweisgrenze, die bei den meisten Teilnehmern im gleichen Bereich wie bei der Chlamydiaceae-spezifischen Real-Time PCR lag, war durch die Herabsetzung des Cutoff-Wertes von 40 auf 36 somit allerdings vereinzelt höher als im Assay 12.

Insgesamt lieferten 7 Labore mit dem *Cp. psittaci*-spezifischen Assay korrekte Befunde für alle Proben (**Tabelle 32**). Fünf Teilnehmer erkannten nur jeweils eine Probe nicht richtig, 2 Teilnehmer 2 Proben und 2 Teilnehmer 3 Proben nicht richtig.

Tabelle 30: Ergebnisse der 16 am Ringversuch teilnehmenden Labore bei Anwendung des Chlamydiaceae-spezifischen Real-Time PCR-Assays 12.

Probe Nr.	Spezies (Herkunft)	DNA- bzw. EBE-Gehalt je 250 µl Probe	Korrektes Ergebnis ¹	Anzahl der Teilnehmer mit richtiger Beurteilung	Anteil [%]
1	<i>Cp. psittaci</i> DC5 (ZKL)	250 ng DNA	+	16/16	100,0
2	Keine	Keine	-	16/16	100,0
3	Keine	Keine	-	13/16	81,2
4	<i>Cp. psittaci</i> C12/98 (ZKL)	250 ng DNA	+	16/16	100,0
5	<i>Cp. psittaci</i> DC14 (ZKL)	250 ng DNA	+	16/16	100,0
6	<i>C. suis</i> DC20 (ZKL)	250 ng DNA	+	16/16	100,0
7	<i>Cp. pecorum</i> DC47 (ZKL)	250 ng DNA	+	16/16	100,0
8	<i>Cp. psittaci</i> C12/98 (ZKL)	250 ng DNA	+	16/16	100,0
9	<i>Cp. abortus</i> C18/98 (ZKL)	250 ng DNA	+	16/16	100,0
10	Keine	Keine	-	15/16	93,8
11	<i>Cp. abortus</i> C18/98 (ZKL)	25.000 EBE	+	16/16	100,0
12	<i>Cp. pneumoniae</i> DC9 (ZKL)	25.000 EBE	+	16/16	100,0
13	Keine	Keine	-	13/14	92,9
14	<i>Cp. psittaci</i> DC15 (ZKL)	2.500 EBE	+	16/16	100,0
15	<i>Cp. psittaci</i> DC5 (ZKL)	25.000 EBE	+	16/16	100,0
16	<i>Cp. psittaci</i> DC5 (ZKL)	250 EBE	+	13/14	92,9
17	<i>C. trachomatis</i> DC10 (ZKL)	25.000 EBE	+	15/16	93,8
18	<i>Cp. psittaci</i> DC15 (ZKL)	25 EBE	+	1/16	6,3
19	<i>Cp. psittaci</i> DC11 (ZKL)	25.000 EBE	+	16/16	100,0
20	<i>Cp. psittaci</i> DC24 (ZKL)	25.000 EBE	+	16/16	100,0
21	<i>Cp. psittaci</i> DC 15 (ZKL)	250 EBE	+	13/16	81,3
22	<i>Cp. psittaci</i> DC 15 (ZKL)	0,025 EBE	+	0/16	0
23	<i>Cp. psittaci</i> DC 15 (ZKL)	2,5 EBE	+	0/16	0
24	<i>Cp. psittaci</i> DC 15 (ZKL)	25.000 EBE	+	16/16	100,0
25	<i>Cp. psittaci</i> DC 15 (ZKL)	0,25 EBE	+	1/16	6,3

Erklärung: += positiver Befund in der jeweiligen Real-Time PCR

- = negativer Befund in der jeweiligen Real-Time PCR

ZKL = Zellkulturlysate

¹ = unter Anwendung des neuen Cutoff-Wertes von 38,0

Tabelle 31: Ergebnisse der 16 am Ringversuch teilnehmenden Labore bei Anwendung des *Cp. psittaci*-spezifischen Real-Time PCR-Assays 1.

Probe Nr.	Spezies (Herkunft)	DNA- bzw. EBE-Gehalt je 250 µl Probe	Korrektes Ergebnis ¹	Anzahl der Teilnehmer mit richtiger Beurteilung	Anteil [%]
1	<i>Cp. psittaci</i> DC5 (ZKL)	250 ng DNA	+	16/16	100,0
2	Keine	Keine	-	16/16	100,0
3	Keine	Keine	-	15/16	93,8
4	<i>Cp. psittaci</i> C12/98 (ZKL)	250 ng DNA	+	16/16	100,0
5	<i>Cp. psittaci</i> DC14 (ZKL)	250 ng DNA	+	16/16	100,0
6	<i>C. suis</i> DC20 (ZKL)	250 ng DNA	-	12/16	75,0
7	<i>Cp. pecorum</i> DC47 (ZKL)	250 ng DNA	-	12/16	75,0
8	<i>Cp. psittaci</i> C12/98 (ZKL)	250 ng DNA	+	16/16	100,0
9	<i>Cp. abortus</i> C18/98 (ZKL)	250 ng DNA	-	15/16	93,8
10	Keine	Keine	-	15/16	93,8
11	<i>Cp. abortus</i> C18/98 (ZKL)	25.000 EBE	-	16/16	100,0
12	<i>Cp. pneumoniae</i> DC9 (ZKL)	25.000 EBE	-	16/16	100,0
13	Keine	Keine	-	13/14	92,3
14	<i>Cp. psittaci</i> DC15 (ZKL)	2.500 EBE	+	15/16	93,8
15	<i>Cp. psittaci</i> DC5 (ZKL)	25.000 EBE	+	16/16	100,0
16	<i>Cp. psittaci</i> DC5 (ZKL)	250 EBE	+	12/14	85,7
17	<i>C. trachomatis</i> DC10 (ZKL)	25.000 EBE	-	16/16	100,0
18	<i>Cp. psittaci</i> DC15 (ZKL)	25 EBE	+	0/16	0
19	<i>Cp. psittaci</i> DC11 (ZKL)	25.000 EBE	+	16/16	100,0
20	<i>Cp. psittaci</i> DC24 (ZKL)	25.000 EBE	+	16/16	100,0
21	<i>Cp. psittaci</i> DC 15 (ZKL)	250 EBE	+	15/16	93,8
22	<i>Cp. psittaci</i> DC 15 (ZKL)	0,025 EBE	+	0/16	0
23	<i>Cp. psittaci</i> DC 15 (ZKL)	2,5 EBE	+	0/16	0
24	<i>Cp. psittaci</i> DC 15 (ZKL)	25.000 EBE	+	16/16	100,0
25	<i>Cp. psittaci</i> DC 15 (ZKL)	0,25 EBE	+	0/16	0

Erklärung: += positiver Befund in der jeweiligen Real-Time PCR

- = negativer Befund in der jeweiligen Real-Time PCR

ZKL= Zellkulturlysate

¹ = unter Anwendung des neuen Cutoff-Wertes von 36,0

Tabelle 32: Ergebnisse der 16 am Ringversuch teilnehmenden Labore (A - Q) bei Anwendung der Chlamydiaceae- bzw. *Cp. psittaci*-spezifischen Real-Time PCR-Assays 12 und 1 (Es wurden nur die Proben mit DNA von mehr als 25 EBE oder 250 ng DNA berücksichtigt).

Teilnehmer	Anzahl der Proben (richtig erkannte/getestete)	
	Chlamydiaceae-spezifische Real-Time PCR	<i>Cp. psittaci</i> -spezifische Real- Time PCR
Labor A	21/21	21/21
Labor B	21/21	20/21
Labor C	21/21	21/21
Labor D	21/21	18/21 ****
Labor E	20/21	21/21
Labor F	21/21	19/21
Labor G	17/19 *	19/19 *
Labor H	20/21	20/21
Labor J	19/21	19/21
Labor K	19/21	20/21
Labor L **	21/21	18/21
Labor M	21/21	20/21
Labor N	19/21	21/21
Labor O	21/21	20/21
Labor P	19/19 ***	19/19 ***
Labor Q	21/21	21/21

Erklärung:

- * = Labor G hat zwei Proben nicht befundet.
- ** = Labor L hat als einziger Teilnehmer die Probe 18 (25 EBE) noch als positiv erkannt.
- *** = Labor P hat zwei Proben nicht erhalten.
- **** = Bei Labor D sind durch die Herabsetzung des Cutoff-Wertes auf 36 für die *Cp. psittaci*-spezifische Real-Time PCR 3 falsch-negative Beurteilungen für Proben mit DNA von 250 EBE und 2.500 EBE aufgetreten.

Ergebnisse des Ringversuchs im CVUAS

Nach der Korrektur des Cutoff-Wertes durch das NRL konnten in der Chlamydiaceae-spezifischen Real-Time PCR 21 (100 %) und in der *Cp. psittaci*-spezifischen Real-Time PCR 20 (95 %) von 21 Proben, die mehr als 25 EBE oder 250 ng DNA enthielten, richtig befundet werden (siehe „Labor O“ in **Tabelle 32**). Aus der **Tabelle 33** geht hervor, dass trotz Korrektur des Cutoff-Wertes die Probe Nr. 6 (*C. suis*) in der *Cp. psittaci*-spezifischen Real-Time PCR mit dem C_T-Mittelwert von 35,4 fälschlicherweise als positiv bewertet wurde.

Tabelle 33: Ringversuchsergebnisse des Chemischen und Veterinäruntersuchungsamts Stuttgart im Vergleich zu den vom Nationalen Referenzlabor für Psittakose des Friedrich-Loeffler-Instituts vorgegebenen Ergebnissen.

Probe Nr.	Chlamydiaceae-spezifischer Real-Time PCR-Assay 12			<i>Cp. psittaci</i> -spezifischer Real-Time PCR-Assay 1		
	C _T -Mittelwert	Befund	Korrekturer Befund	C _T -Mittelwert	Befund	Korrekturer Befund
1	15,8	+	+	16,8	+	+
2	Kein C _T -Wert	-	-	Kein C _T -Wert	-	-
3	Kein C _T -Wert	-	-	Kein C _T -Wert	-	-
4	25,4	+	+	27,8	+	+
5	16,4	+	+	18,0	+	+
6	23,5	+	+	35,4	+	-
7	24,8	+	+	36,2	-	-
8	27,9	+	+	29,6	+	+
9	16,7	+	+	Kein C _T -Wert	-	-
10	Kein C _T -Wert	-	-	Kein C _T -Wert	-	-
11	29,0	+	+	Kein C _T -Wert	-	-
12	28,7	+	+	Kein C _T -Wert	-	-
13	Kein C _T -Wert	-	-	Kein C _T -Wert	-	-
14	30,7	+	+	30,9	+	+
15	26,8	+	+	27,6	+	+
16	32,6	+	+	32,8	+	+
17	24,5	+	+	Kein C _T -Wert	-	-
18	Kein C _T -Wert	-	+	Kein C _T -Wert	-	+
19	25,9	+	+	26,3	+	+
20	27,3	+	+	27,6	+	+
21	35,7	+	+	35,1	+	+
22	Kein C _T -Wert	-	+	Kein C _T -Wert	-	+
23	Kein C _T -Wert	-	+	Kein C _T -Wert	-	+
24	27,2	+	+	28,5	+	+
25	Kein C _T -Wert	-	+	Kein C _T -Wert	-	+

Erklärung: += positiver Befund in der jeweiligen Real-Time PCR

- = negativer Befund in der jeweiligen Real-Time PCR

5 DISKUSSION

Ziel dieser Arbeit war es, einen auf der Real-Time PCR-Technik basierenden Assay zu entwickeln und zu evaluieren, mit dem die Chlamydien-Spezies *Cp. psittaci* gemäß den Anforderungen der aktuellen Psittakose-Verordnung sicher identifiziert oder sogar Spezies-spezifisch in klinischem Probenmaterial nachgewiesen werden kann. Nach der seit dem 23.12.2005 gültigen Neufassung der Psittakose-Verordnung ist der bloße Nachweis von Chlamydien für die Diagnose „Psittakose“ oder „Ornithose“ nicht mehr ausreichend, sondern verlangt hierfür den validen Nachweis von *Cp. psittaci* nach der aktuellen Spezies-Beschreibung von Everett et al. (77).

Um diese Anforderung erfüllen zu können, benötigt die Routinediagnostik eine ebenso genaue wie robuste Nachweismethode, mit der die anzeigepflichtige Psittakose wie auch die meldepflichtige Ornithose sicher erkannt werden können. Um die Spezies-spezifische Chlamydiendiagnostik zu vervollständigen, wurden in der vorliegenden Arbeit die mit der Entwicklung der *Cp. psittaci*-spezifischen PCR gewonnenen Erfahrungen genutzt, um die Entwicklung zusätzlicher Real-Time PCR-Assays zum Nachweis aller wichtigen, bei unseren Haustieren vorkommenden Chlamydien-Spezies umzusetzen.

5.1 Methodik der Spezies-spezifischen Real-Time PCR-Assays

Die Basis der derzeit aktuellen und akzeptierten Einteilung der Chlamydien in Spezies basiert auf Angaben von Everett et al. (77). Diese sieht eine weitergehende Aufgliederung der vormals einheitlichen Spezies *Chlamydia psittaci* in die Spezies *Cp. psittaci*, *Cp. abortus*, *Cp. felis* und *Cp. caviae* vor. In der Psittakose-VO wird diese aktuelle Spezies-Differenzierung aufgegriffen und somit zum Standard. Eine dementsprechende Differenzierung der Chlamydien-Spezies, die für bestimmte Spezies eine Unterscheidung einzelner Nukleotidsequenzen erfordert, ist mit Hilfe von RFLP-Analysen, DNA-Sequenzierung, Microarray-Technik oder Real-Time PCR möglich. Während die drei erstgenannten Methoden zurzeit nur in spezialisierten Laboratorien durchgeführt werden, bietet die Real-Time PCR-Technik vielversprechende Möglichkeiten, die bereits bei der Spezies-Differenzierung anderer

Bakterien erfolgreich genutzt werden (72). Neben der hohen Sensitivität und Spezifität bietet die Real-Time PCR Chancen zur SNP-Analyse sowie zum quantitativen Erregernachweis. Auf der Basis von Nukleotidsequenzen der *ompA*-, 16S- und 23S-rRNA- oder der Spacer Region zwischen 16S- und 23S-rRNA-Genen, die für verschiedene Chlamydien-Spezies und Stämme in öffentlichen Datenbanken verfügbar sind, können Real-Time PCR-Assays eben auch zur Spezies-Differenzierungen von Chlamydien verwendet werden (76). So wurden in dieser Arbeit erfolgreich Primer und Sonden für Real-Time PCR-Assays entworfen, die eine in der Veterinärmedizin bisher noch nicht beschriebene Differenzierung der Spezies *Cp. psittaci*, *Cp. caviae* und *C. suis* ermöglichen. Darüber hinaus wurde die Palette der Spezies-spezifischen Real-Time PCR-Assays durch Tests für *Cp. abortus*, *Cp. pecorum* und *Cp. felis* vervollständigt.

Real-Time PCR-Assays wurden bereits erfolgreich zum Nachweis der Familie Chlamydiaceae (67, 76), aber auch verschiedener Chlamydien-Spezies (211) und sogar Genotypen (84, 170) eingesetzt. In der Humanmedizin sind entsprechende Tests zur Identifizierung der Spezies *C. trachomatis* (68, 228), *Cp. pneumoniae* (98, 146, 249, 275) und *Cp. psittaci* (103, 166), sowie in der Veterinärmedizin zum spezifischen Nachweis von *Cp. felis* (53, 107, 108, 241), *Cp. abortus* (190), *Cp. pecorum* (56) und der Genotypen von *Cp. psittaci* (84) bekannt. Doch gerade die für die Humanmedizin entwickelten Real-Time PCR-Assays für *Cp. psittaci* ermöglichen keine deutliche Abgrenzung gegenüber der nahe verwandten in der Veterinärmedizin äußerst wichtigen Spezies *Cp. abortus* (103). Dies konnte sowohl durch eigene Untersuchungen (Ergebnisse nicht dargestellt) und durch den Abgleich der beschriebenen Primer- und Sondensequenzen mit Gensequenzen in der NCBI-Datenbank gezeigt werden. Aufgrund der ausgeprägten Nukleotidsequenz-Homologie dieser beiden Spezies gehen von Van Loock et al. (255) davon aus, dass *Cp. abortus*-Stämme im Laufe der Geschichte aus *Cp. psittaci*-Stämmen hervorgegangen sind. Für eine sichere Differenzierung dieser sehr nahe verwandten Spezies müssen deshalb Sequenzen mehrerer Gene und verschiedene Methoden herangezogen werden. So entwickelten Geens et al. (84) eine PCR zum Nachweis von *Cp. psittaci* auf der Basis der Spacerregion zwischen den 16S- und 23S-rRNA-Genen und zusätzlich Real-Time PCR-Assays zur Differenzierung der *Cp. psittaci*-Genotypen A, B, C, D, E, F und E/B auf der Basis des *ompA*-Gens. Auch Heddema et al. (103) kommen bei ihren Untersuchungen mittels Real-Time PCR-Assay im

Light Cycler-System zu dem Schluss, dass auf der Basis des *ompA*-Gens eine Differenzierung der aus *C. psittaci* (alte Taxonomie) hervorgegangenen Spezies *Cp. psittaci*, *Cp. abortus*, *Cp. felis* und *Cp. caviae* nicht möglich sei. In den vorliegenden Untersuchungen hat sich jedoch gezeigt, dass mit Hilfe umfassender und akribisch ausgewerteter Alignments zum Vergleich der DNA-Sequenzen von *ompA*- und 23S-rRNA-Genen ausgewählter Chlamydien-Spezies durchaus Sequenzbereiche gefunden werden können, die eine Spezies-Differenzierung erlauben. Dies bestärken auch andere Untersuchungen, in denen sich das *ompA*-Gen über die Spezies-Differenzierung hinaus zur Differenzierung von Stämmen, Sero- und Genotypen aufgrund variabler Abschnitte innerhalb hochkonservierter Bereiche als geeignet erwiesen hat (**13, 76, 123, 286**).

Während eine eindeutige Unterscheidung der Chlamydien-Spezies *Cp. abortus*, *Cp. pecorum*, *Cp. felis* und *Cp. caviae* auf der Grundlage der *ompA*-Gene möglich war, konnte für alle derzeit in der NCBI-Datenbank genannten *Cp. psittaci*- und *C. suis*-Stämme eine solche Spezies-spezifische Sequenz innerhalb der *ompA*-Gene nicht gefunden werden, so dass hier dann doch auch Sequenzen der ribosomalen RNA-Gene genutzt werden mussten. Deshalb wurden zum Nachweis von *Cp. psittaci* zunächst in einem ersten Schritt drei Real-Time PCR-Assays auf der Grundlage der *ompA*-Gene entwickelt, wobei gemäß der amplifizierten Gensequenzen jeder dieser Assays jeweils dieselben 18 der 26 in NCBI erfassten Stämme nachweist (Assays 1, 2 und 3). Da einerseits die zur Speziesdifferenzierung geeigneten *ompA*-Genabschnitte sehr kurz sind (max. 40 Nukleotide) und andererseits Sequenz-Unterschiede zu anderen Spezies auf nur einzelnen Nukleotiden beruhen (Single Nucleotide Polymorphism = SNP), mussten zur Erkennung von *Cp. psittaci* an Stelle von TaqMan[®]-Sonden aufwändigere, stabiler an die Ziel-DNA bindende TaqMan[®]MGB-Sonden entworfen werden. Als Alternative zu den TaqMan[®]MGB-Sonden wurde zusätzlich eine nach den TaqMan[®]MGB-Assays entworfene LNA-Sonde (LNA = Locked Nucleic Acid, Assay 4) getestet. Im zweiten Schritt wurde darüber hinaus ein Real-Time PCR-Assay auf der Basis des 23S-rRNA-Gens mit nur einer Nukleotid-Abweichung (SNP) gegenüber *Cp. abortus* entwickelt, der zumindest aufgrund der Sequenzdaten den Nachweis nahezu aller bis dahin bekannten *Cp. psittaci*-Stämme erlauben würde (siehe **Abbildung 19**). Insgesamt standen somit 5 verschiedene Real-Time PCR-Assays für den Nachweis von *Cp. psittaci* zur

Verfügung. Der Real-Time PCR-Assay für den Nachweis von *C. suis* wurde auf Grundlage der 23S-rRNA-Gene ausgearbeitet.

Die Schritte zur Optimierung der entwickelten Real-Time PCR-Assays umfassten systematische Untersuchungen zu geeigneten Primer- und Sondenkonzentrationen sowie zu deren Spezifität und Reproduzierbarkeit. Zur Ermittlung der Nachweisgrenzen der Assays kamen Chlamydien-Suspensionen zum Einsatz, die entweder durch mikroskopisches Auszählen von Chlamydien-Partikeln oder durch die Bestimmung Einschlusskörperchen-bildender Einheiten (EBE) quantifiziert worden waren. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass bei allen entworfenen Assays die vom Hersteller empfohlenen Konzentrationen von 0,9 μM (Primer) und 0,2 μM (Sonden) sehr gute Ergebnisse lieferten und deshalb im weiteren Verlauf der Arbeit standardmäßig verwendet wurden. Auch die Versuche zu Spezifität und Reproduzierbarkeit der Assays bestätigten die hinreichende Zuverlässigkeit der Testsysteme. Die gemessenen Werte ließen eine eindeutige Differenzierung der Chlamydien-Spezies zu, ohne Kreuzreaktionen mit anderen Keimen zu zeigen. Lediglich der *Cp. psittaci*-Assay 5 auf der Basis des 23S-rRNA-Gens reagierte mit den *Cp. abortus*-Stämmen Z 178/02 und Z 1215/86 schwach positiv (C_T -Werte > 40), was auf eine unspezifische Reaktion dieses Assays hinweist. So zeigten zwei Proben von Schafaborten mit starken positiven Reaktionen in Assay 5 (*Cp. psittaci*) und Assay 6 (*Cp. abortus*) in der Microarray-Technik ausschließlich *Cp. abortus*-Signale (siehe S. 86, Probe 7 und 8). Insgesamt waren es 24 Proben von Schafen sowie 38 Proben von Schweinen, 26 Proben von Rindern und jeweils eine Probe von einem Pferd und einer Ziege, die vor allem in Assay 6 (*Cp. abortus*), aber auch in Assay 5, nicht aber in Assay 1 (*Cp. psittaci*) positive Reaktionen erzielten. Die C_T -Werte lagen hierbei für den Assay 6 zwischen 15 und 30 und für den Assay 5 zwischen 25 und 39. Die Ergebnisse mit der Microarray-Technik deuten bei diesen Proben ebenfalls auf das alleinige Vorliegen von *Cp. abortus*-DNA hin. Aufgrund dieser unspezifischen Amplifikationen konnte für den *Cp. psittaci*-Assay 5 kein C_T -Wert als Cutoff-Wert festgelegt werden. Dennoch wurde dieser Assay wegen seines breiten Spektrums an *Cp. psittaci*-Stämmen in der NCBI-Datenbank, die er erkennen müsste, in alle entsprechenden Untersuchungen mit einbezogen. Für alle anderen Assays wurde ein C_T -Cutoff-Wert von 40 festgelegt.

Unter Einsatz optisch ausgezählter Chlamydien-Standard Suspensionen konnte für die entwickelten Real-Time PCR-Assays eine Nachweisgrenze von 8 bis 80 Chlamydien-

Partikeln pro PCR-Ansatz ermittelt werden. Vergleichbare Ergebnisse ergaben sich für die *Cp. psittaci*-, *Cp. abortus*-Assays und den Chlamydiaceae-Assay unter Einsatz von Chlamydien-Suspensionen, die auf der Bestimmung von Einschlusskörperchen-bildenden Einheiten (EBE) basierten. Die Berechnungen der Nachweisgrenzen ergaben hier 4 bis 40 EBE pro PCR-Ansatz. Im Detail lagen die Nachweisgrenzen für die Assays 1, 5 (*Cp. psittaci*), 6, 7 (*Cp. abortus*), 8 (*Cp. pecorum*) und 12 (Chlamydiaceae) mit 8 Chlamydien-Partikeln pro PCR-Ansatz im unteren Bereich, die für die Assays 2 bis 4 (*Cp. psittaci*), 9 (*Cp. felis*), 10 (*Cp. caviae*) und 11 (*C. suis*) mit 80 Chlamydien-Partikeln pro PCR-Ansatz um eine Zehnerpotenz höher. Die Chlamydiaceae-spezifische Real-Time PCR erwies sich mit einer Nachweisgrenze von 8 Chlamydien-Partikeln als sehr sensitiv und somit für Screening-Untersuchungen als besonders geeignet. Insgesamt liegen die in dieser Arbeit ermittelten Nachweisgrenzen im Bereich anderer Studien zum Nachweis von Chlamydien, deren Angaben bei 10 bis 80 Chlamydien-Partikeln pro Real-Time PCR-Ansatz liegen (**76, 84, 103** bzw. **121**).

Ein Maß für die Robustheit eines Real-Time PCR-Assays ist der Intra-Assay- und Inter-Assay-Variationskoeffizient. Die Reproduzierbarkeit nimmt bei allen im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Assays mit einer Verringerung der im Reaktionsansatz vorhandenen Zielgen-Kopien ab, wobei die C_T -Werte desselben Real-Time PCR-Laufs (Intra-Assay) weniger variierten als die C_T -Werte aufeinanderfolgender Real-Time PCR-Läufe (Inter-Assay). Die Intra-Assay-Variationskoeffizienten lagen bei 8×10^4 Chlamydien-Partikeln bei bis zu 10 % und bei Partikelzahlen im Bereich der Nachweisgrenze bei bis zu 50 %. Die Inter-Assay-Variationskoeffizienten nahmen Werte von ca. 20 % (8×10^4 Chlamydien-Partikel) bis 50 % (8×10^1 Chlamydien-Partikel) an. Vergleichbare Werte und Ergebnisse im Bezug auf die Reproduzierbarkeit erzielten Locatelli et al. (**154**). Bustin (**40**) gibt für Real-Time PCR-Assays auf der Basis von TaqMan[®]-Sonden innerhalb eines oder verschiedener Läufe Variationskoeffizienten von nur 0 bis 5 % an. Mögliche Erklärungen für die teilweise hohen Variationskoeffizienten sind Pipettierungenauigkeiten, die sich besonders bei geringen DNA-Konzentrationen bzw. Partikelzahlen auswirkten. Abhilfe können hier vielleicht speziell für die PCR entwickelte oder angepasste Pipettierroboter schaffen.

Für die Spezies-spezifische Untersuchung der klinischen DNA-Proben wurden aufgrund optimaler Ergebnisse in den vorausgegangenen Untersuchungen die Real-

Time PCR-Assays 1 und 5 (*Cp. psittaci*), 6 (*Cp. abortus*), 8 (*Cp. pecorum*), 9 (*Cp. felis*), 10 (*Cp. caviae*) und 11 (*C. suis*) ausgewählt. Trotz seiner unspezifischen Reaktionen mit *Cp. abortus* wurde der Assay 5 ergänzend für den Nachweis von *Cp. psittaci* eingesetzt, um neben den *ompA*-Genen auch die 23S-rRNA-Gene der derzeit in der NCBI-Datenbank repräsentierten *Cp. psittaci*-Stämme detektieren zu können. Hierdurch sollte sichergestellt werden, dass im Rahmen der Psittakose- und Ornithose-Diagnostik der Nachweis einer möglichst großen Anzahl an *Cp. psittaci*-Stämmen und somit eine größtmögliche Nachweissicherheit gewährleistet wird. Bei der Untersuchung der klinischen Proben hat sich aber dann herausgestellt, dass Assay 1 und Assay 5 gleichermaßen *Cp. psittaci*-Stämme erkannten. Auch die Ergebnisse des Ringversuches bestätigten die Eignung des Assays 1 für den Nachweis von *Cp. psittaci*, so dass für die Routinediagnostik die alleinige Anwendung dieses Assays als ausreichend erscheint.

5.2 Vergleichende Untersuchungen mit Spezies-spezifischen Microarrays (NRL)

Die Methode der Microarray-Technik zeichnet sich durch eine schnelle und einfache Durchführbarkeit aus und erlaubt Untersuchungen hoher Probenzahlen auf bisher alle bekannten Chlamydien-Spezies in drei Schritten (Amplifikation, Hybridisierung und Detektion). In einem Untersuchungsgang können Mischinfektion unterschiedlichster Chlamydien-Spezies nachgewiesen werden. Durch diese Eigenschaften in Verbindung mit einer hohen Sensitivität wird die von Sachse et al. (216) entwickelte Microarray-Methode zu einem idealen Instrument für die differenzierte Chlamydiendiagnostik, die bisher jedoch nur in wenigen Laboren verfügbar ist.

Vergleichende Untersuchungen mit dieser Technik und mit den Spezies-spezifischen Real-Time PCR-Assays ergaben bei 4 der 15 Proben eine vollständige Übereinstimmung der Ergebnisse. So konnte mit Hilfe der Microarray-Technik sowohl der Nachweis von *Cp. psittaci*-DNA als auch der Nachweis der DNA von *C. suis* bei jeweils einer Katze bestätigt werden. Bei der zuletzt genannten Katze wurde zusätzlich mit Hilfe der Microarray-Technik DNA von *C. trachomatis* festgestellt, für die in dieser Arbeit kein entsprechender Real-Time PCR-Assay entwickelt worden war. Weiterhin wurden bei einem Wellensittich und einem Sittich wie auch mit den

Real-Time PCR-Assays *Cp. abortus* nachgewiesen. Bei 11 Proben war eine Abweichung der Ergebnisse vor allem hinsichtlich des Vorhandenseins der DNA von zwei Erregern festzustellen. Bei 5 (4 Proben von Rindern und eine Probe von einem Pferd) dieser 11 Proben konnte nur das Signal einer Chlamydien-Spezies, bei einer Probe kein Signal (Probe 14) gemessen werden. Hierbei zeigte sich, dass von den beiden mittels Real-Time PCR erkannten Spezies stets diejenige mit dem niedrigeren C_T -Wert, d.h. mit der stärkeren Reaktion, auch in der Microarray-Technik ein bestätigendes Signal ergab. Die C_T -Werte der Real-Time PCR der zweiten Spezies, die mittels Microarray-Technik nicht bestätigt werden konnten lagen bei 37 und darüber. Die Vermutung, dass die Microarray-Technik aufgrund einer höheren Nachweisgrenze eine etwas geringere Sensitivität aufweist als die Real-Time PCR wird auch durch die Untersuchungen zweier Proben (Rind und Amazone) gestützt, bei denen sowohl der Chlamydiaceae- als auch der *Cp. abortus* spezifische Real-Time PCR-Assay positive Ergebnisse, die Microarray-Technik jedoch vollständig negative Ergebnisse erzielte. Die Sensitivität der Microarray-Technik hat sich in einer anderen Studie an klinischen Proben als vergleichbar mit der konventionellen PCR erwiesen, bei frisch entnommenen Proben war sie sogar mit der der Real-Time PCR vergleichbar. Bei Proben, die älter als ein Jahr waren war die Sensitivität deutlich höher (27). Da die in dieser Arbeit verwendeten DNA-Proben über einen Zeitraum von länger als 2 Jahren gesammelt worden waren und deshalb zum Teil älter als ein Jahr waren, bevor sie getestet wurde, ist von einer geringeren Sensitivität der Microarray-Technik bei den untersuchten Proben auszugehen.

Eindeutige Hinweise auf eine verminderte Spezifität des *Cp. psittaci*-Assays 5 ergaben Untersuchungen von zwei Nachgeburtspuben von Schafen für *Cp. abortus*. Diese Proben wiesen sehr hohen Signale im *Cp. abortus*-Assay 6 begleitet von einem deutlichen Signal im *Cp. psittaci*-Assay 5 (23S-rRNA) auf. Diese *Cp. psittaci* Reaktion konnte allerdings weder durch die Microarray-Technik noch durch den spezifischeren *Cp. psittaci*-Assay 1 (*ompA*) bestätigt werden und wurden deshalb als negativ bewertet.

Auffallend war das Ergebnis der Probe einer Taube. Diese zeigte ausschließlich in der Chlamydiaceae-spezifischen Real-Time PCR ein Signal, das jedoch weder durch einen Spezies-spezifischen Real-Time PCR-Assay noch die Microarray-Technik bestätigt werden konnte. Da in dieser Arbeit für den Nachweis von *Cp. pneumoniae*, *C. muridarum* und *C. trachomatis* keine Real-Time PCR-Assays entwickelt wurden,

kann das Vorliegen dieser Spezies in der Probe nicht ausgeschlossen werden. Der Vergleich der Primer- und SONDENSEQUENZEN des Assays 12 mit den GENSEQUENZEN von in der NCBI-Datenbank erfassten Stämmen weist darauf hin dass auch *Waddlia chondrophila*, *Parachlamydia acanthamoebae*, *Simkania negevensis* und *Candidatus Fritschea* in diesem Assay ein positives Ergebnis erzielen könnten. Weiterhin könnte es sich um einen noch nicht bekannten, oder noch nicht in der NCBI-Datenbank erfassten Stamm handeln.

5.3 Psittakose-Ringversuch

Ziel des vom NRL initiierten Ringversuchs war es, die Eignung des in dieser Arbeit entwickelten Real-Time PCR-Assays 1 (*Cp. psittaci*) und des Assays 12 (Chlamydiaceae) unter besonderer Berücksichtigung der Psittakose-/Ornithose-Diagnostik zu prüfen. Dazu wurden insgesamt 25 Einzelproben sowie eine Positiv- und eine Negativ-Kontrolle in insgesamt 16 Laboren mit den o.g. Real-Time PCR-Assays untersucht.

Im Rahmen dieses Ringversuchs ergaben Tests durch das NRL häufig C_T -Werte zwischen 40 und 45 für die Reagenzienkontrollen (NTC = Negativkontrolle). Dies konnte in den eigenen Untersuchungen nicht bestätigt werden, führte aber dazu, dass der C_T -Cutoff-Wert für die Negativ-Positiv-Bewertung von 40 auf 36 reduziert wurde.

Durch die von den Labors gemeldeten C_T -Mittelwerte ergab sich eine Nachweisgrenze für die Chlamydiaceae-spezifischen Real-Time PCR (Assay 12) in der Größenordnung von 100 EBE pro Probe (250 μ l). Dies steht im Widerspruch zu den Erfahrungen des NRL, wo bei Verwendung frisch zubereiteter Verdünnungsreihen meist noch 1 EBE pro Probe detektierbar ist. In den Untersuchungen dieser Arbeit wurde für den Assay 12 ebenfalls eine bessere Nachweisgrenze von 8 Chlamydienpartikeln oder auch 4 EBE pro Real-Time PCR-Ansatz festgestellt. Die Diskrepanz erklärt sich wahrscheinlich aus der Tatsache, dass die Proben bereits im verdünnten Zustand verschickt wurden und im Verlaufe von Transport und Lagerung die DNA-Abbauprozesse bereits eingesetzt hatten. Eine Verschlechterung der Nachweisgrenze könnte auch durch die Verwendung der internen Amplifikationskontrolle IC2 bedingt sein, da bei einer Multiplex PCR die

Amplifikation derjenigen Zielsequenz, die in der geringeren Menge vorhanden ist, inhibiert werden kann (**192**).

Die Probleme, die bei allen Teilnehmern mit der Befundung der Proben 6 und 7 (*C. suis* bzw. *Cp. pecorum*) in der *Cp. psittaci*-Real-Time PCR auftraten, können durch den relativ hohen Gehalt an DNA von verwandten Chlamydien-Spezies (250 ng DNA entsprechen ca. 10^8 Genomkopien), der in klinischen Proben vermutlich nicht vorkommt, erklärt werden. Daher dürfte das hier aufgetretene Spezifitätsproblem in der Routinediagnostik nicht relevant sein. Durch die Korrektur des Cutoff-Wertes von 40 auf 36 durch den Ringversuchskoordinator erkannten 75 % der Labore diese Proben als *Cp. psittaci*-negativ. Die Nachweisgrenze, die bei den meisten Teilnehmern im gleichen Bereich wie bei der Chlamydiaceae-spezifischen Real-Time PCR lag, war dadurch vereinzelt erhöht, was darauf hinweist, dass Labore, die Multiplex-PCR-Assays anwenden wollen, diese jeweils individuell unter den gegebenen Bedingungen optimieren und evaluieren müssen.

Die beiden getesteten Methoden zum Nachweis von Chlamydiaceae und zum Nachweis von *Cp. psittaci* verfügen nach den aufgezeigten Untersuchungsergebnissen und unter Beachtung der empfohlenen Cutoff-Werte über eine hohe Spezifität für den Nachweis von Erregern der Gattungen *Chlamydia* und *Chlamydophila* bzw. der Spezies *Cp. psittaci*. Die Anwendung dieser Methoden in der Routinediagnostik kann daher insbesondere der in der Psittakose-VO begründeten Forderung nach dem spezifischen Nachweis von *Cp. psittaci* gerecht werden. Damit kann ein wesentliches Problem der bisherigen Diagnostik, welche auf dem Antigen-ELISA basierte, überwunden werden. In der praktischen Anwendung kann die Sicherheit der Methodik sowohl durch die weitere laborspezifische Optimierung hinsichtlich der Nachweisgrenze als auch durch die verknüpfte Anwendung (Screening mittels Chlamydiaceae-spezifischer Real-Time PCR, Nachweis bzw. Ausschluss von *Cp. psittaci* mittels Assay 1) weiter vergrößert werden.

Angeichts der erfolgreichen Einbeziehung verschiedener Real-Time PCR-Geräteplattformen (Block-cycler, Kapillargeräte) erscheint eine Anwendung der Methoden auf den gängigen Gerätetypen möglich. Die verwendete Enzymchemie hat sich in den Versuchen als robust erwiesen und die Etablierung der Methoden in den teilnehmenden Laboratorien gewährleistet. Gleichzeitig ist mit der eingesetzten

universellen internen Amplifikationskontrolle ein zeitgemäßer diagnostischer Standard realisiert worden.

Die beiden getesteten Methoden erwiesen sich zum Einsatz in der Routinediagnostik geeignet und sind allen interessierten Anwendern durch die Aufnahme in den Online verfügbaren Methodenkatalog des Arbeitskreises für Infektionsdiagnostik (AVID) bei der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG) zur Verfügung gestellt worden.

5.4 Verbreitung von *Chlamydia* und *Chlamydophila* spp. bei Haustieren

Nach der Entwicklung der Real-Time PCR-Assays für den Nachweis der wichtigsten bei unseren Haustieren bisher beschriebenen Chlamydien-Spezies wurde ein Querschnitt von Probenmaterialien unterschiedlicher Tierarten untersucht. Hierzu standen insgesamt 526 DNA-Proben zur Verfügung. Es handelte sich ausschließlich um Proben, die prinzipiell für den direkten Nachweis von Chlamydien-Infektionen bei erkrankten Tieren geeignet sind und die in nicht Spezies-spezifischen PCR-Tests bereits positive Ergebnisse erzielt hatten. Voruntersuchungen zeigten, dass Proben von Vögeln DNA von *Cp. psittaci* und *Cp. abortus*, Katzen DNA von *Cp. felis* sowie Wiederkäuer und Schweine DNA von den Spezies *Cp. psittaci*, *Cp. abortus*, *Cp. pecorum* und *C. suis* enthielten. Deshalb beschränkten sich die über diese Vorversuche hinaus gehenden Untersuchungen dieser Tierarten auf die bei diesen genannten Chlamydien-Spezies. Abweichend davon kamen aufgrund geringer Probenzahlen und bisher nur wenig publizierter Daten zum Artenspektrum bei den Proben von Pferden, Schafen, Ziegen, Tauben, Meerschweinchen, Kaninchen und Hunden alle Spezies-spezifischen Assays zum Einsatz. Die Beschränkung des Untersuchungsspektrums auf ausgewählte Chlamydien-Spezies bei Vögeln, Rindern, Katzen und Schweinen, wird dadurch bestätigt, dass trotzdem 99,6 % der Proben sich auf diese Weise einer Chlamydien-Spezies zuordnen ließen. Bei drei Proben, die zunächst nicht zuzuordnen waren, konnte durch weiterführende Untersuchungen mittels Spezies-spezifischen Assays schließlich *C. suis* und *Cp. psittaci* bei jeweils einer Katze und bei einer Taube leider keine Spezies ermittelt werden.

Zur *Cp. psittaci*-Diagnostik wurden die zwei Real-Time PCR-Assays 1 und 5 eingesetzt. Mit den Tests wurde bei 71 von 77 Papageien und Sittichen (92,2 %) und

bei 7 von 9 Tauben (77,8 %) DNA von *Cp. psittaci* nachgewiesen. Demnach ist *Cp. psittaci* bei Psittaziden zwar nicht die einzige, aber doch die deutlich dominierende Chlamydienart. Das NRL kam in Untersuchungen im Jahr 2006 zu einem ähnlichen Ergebnis. Von 77 Psittaziden-Proben wurden 28 positiv (26-mal *Cp. psittaci*, 1-mal *Cp. abortus*, 1-mal Chlamydiaceae), 48 negativ und eine Probe fraglich im Spezies-spezifischen Microarray-Assay getestet (**31**). Der eindeutige Nachweis der Spezies *Cp. psittaci* bei Psittaziden ist wegen der besonders hohen Virulenz einiger Stämme für den Menschen und wegen dem oft engen körperlichen Kontakt zwischen Vogel und Vogelfalter besonders wichtig. Dies darf aber nicht darüber hinwegtäuschen, dass beim Mensch auch schwere, psittakoseartige Verlaufsformen beschrieben worden sind, bei denen der Erreger seinen Ausgang von anderen Vögeln, vor allem Nutzgeflügelarten und Tauben, genommen hatte (**8, 81, 102, 112, 161, 178, 251**). Dennoch besteht bisher nur für die bei Psittaziden nachgewiesenen *Cp. psittaci*-Infektionen Anzeigepflicht im Sinne der Psittakose-Verordnung. Die Notwendigkeit einer einheitlichen staatlichen Bekämpfung der Psittakose und Ornithose wird auch aufgrund der mittlerweile sehr guten Behandlungsmöglichkeiten erkrankter Menschen und Psittaziden diskutiert (**134, 182**).

Über den Nachweis von *Cp. abortus* bei Vögeln berichteten auch Chahota et al. (2006). Sie untersuchten Proben von 1147 Vögeln aus 11 verschiedenen Ordnungen. Während es sich bei 64 der insgesamt 68 Chlamydien-positiven Proben (94,1 %) um *Cp. psittaci* handelte, stellten sie bei einem Wellensittich und 2 Weißstörchen (3/68, 4,4 %) *Cp. abortus* fest (**46**). Bei Untersuchungen von Puten handelte es sich sogar bei 7 von 9 Chlamydien-positiven Proben um *Cp. abortus* (**230**). Im Gegensatz zu den Säugetierstämmen, unter denen die bei Schafen vorhandenen Varianten eindeutig als wichtige Zoonoseerreger gelten (**52, 189, 200**), ist das zoonotische Potential dieser aviären *Cp. abortus*-Stämme unbekannt.

Bei Rindern war *Cp. abortus* mit 85 % wie erwartet die weitaus häufigste nachgewiesene Chlamydien-Spezies. Unerwartet hingegen wurden als zweithäufigste Spezies *Cp. psittaci* (11 Proben) und *C. suis* (9 Proben), gefolgt von *Cp. pecorum* (5 Proben) gefunden. Nachweisbar war nicht nur DNA von einer Spezies, sondern in insgesamt 9 Fällen auch DNA von *Cp. abortus* und *C. suis* (7 Proben) sowie von *Cp. abortus* und *Cp. psittaci*. Infektionen mit *Cp. abortus* und *Cp. pecorum* kommen in Rinderbeständen sehr häufig vor, wobei *Cp. abortus* vor

allem für Aborte und Endometritiden (**28, 85**) und *Cp. pecorum* für Pneumonien und Polyarthritiden bei Kälbern (**162**) verantwortlich gemacht wurden. Beide Spezies werden auch mit Mastitiden assoziiert (**20**). Jee et al. wiesen vor allem *Cp. abortus* in der Milch und *Cp. pecorum* in der Vagina von Muttertieren nach. Bei klinisch inapparent infizierten Kälbern konnte *Cp. pecorum* 5-mal häufiger festgestellt werden als *Cp. abortus*, wobei der Nachweis wie bei den Muttertieren vor allem vaginal und seltener im Kot oder in der Nase gelang (**127**). *Cp. abortus* und *Cp. psittaci* sind auch bei Erkrankungen des Respirationstrakts von Bedeutung (**252**). Kauffold et al. fanden in 22 von 122 (18 %) Kotproben von Rindern hauptsächlich *Cp. pecorum* und in 11 von 120 (9,2 %) Sperma- sowie 13 von 121 (10,7 %) Präputialspülproben vor allem *Cp. psittaci*, aber auch *Cp. abortus* (**143**). In 235 Plazenta-Proben von Aborten in der Schweiz konnten in 5,1 % der Fälle *Cp. abortus* und zu 4,2 % *Cp. psittaci* isoliert werden, was darauf hinweist, dass der Spezies *Cp. abortus* bei Rinderaborten im Gegensatz zu Schafaborten in der Schweiz nur eine geringe Rolle zukommt (**26**). Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen dagegen vermuten, dass der Spezies *Cp. abortus*, die bei 85 % der Chlamydiaceae-positiven Rinderproben aus dem Genitalbereich oder von Nachgeburten festgestellt wurde, im Gegensatz zu anderen Chlamydien-Spezies eine größere Bedeutung bei Fortpflanzungsstörungen des Rindes zukommen könnte.

Die Beobachtung von Teankum et al. (**247**) über das Vorkommen von *C. suis* in Spermaproben von Bullen (2 von 304 Proben, wobei insgesamt 20 Proben positiv auf Chlamydien getestet wurden) konnte durch die Ergebnisse dieser Arbeit, in der ebenfalls *C. suis* in Rinderproben nachgewiesen wurde, bestätigt werden. Weiterhin handelte es sich in den Untersuchungen von Teankum et al. bei 2 der 20 Chlamydien-positiven Proben um *Cp. abortus*, bei einer um *Cp. psittaci* und bei 15 um *Chlamydia*-like Organismen.

Bei Schafen liegt im Hinblick auf Chlamydien-Infektionen eine besondere Situation vor, da nach wie vor der durch *Cp. abortus* hervorgerufene enzootischen Schafabort in vielen Ländern die häufigste Ursache für Verlamnungen darstellt (**206, 238**). Die relativ große Bedeutung von *Cp. abortus* bei Schafen schlug sich auch in den Ergebnissen dieser Arbeit nieder, da in 37 von insgesamt 38 (97,4 %) Chlamydien-positiven Nachgeburtspöbeln *Cp. abortus* nachgewiesen wurde und *Cp. abortus* damit als Abortursache in Frage kam. In 7 Fällen wurde DNA von *Cp. abortus* und *Cp. pecorum* nachgewiesen. Bei einer Probe wurde ausschließlich *Cp. pecorum*

gefunden, eine Chlamydien-Spezies, die bei kleinen Wiederkäuern Konjunktivitis und Arthritis verursachen kann (179). Clarkson und Philips (49) isolierten *Cp. pecorum* aus dem Kot von Lämmern. Bei Untersuchungen in der Schweiz wurde in 16 von 46 (34,8 %) serologisch getesteten Proben von Schafböcken *Cp. abortus* identifiziert (247). Diese Untersuchungen sind besonders wegen des zoonotischen Potentials von ovinen *Cp. abortus*-Stämmen interessant (41, 52, 128, 141, 272, 283), und haben zu der Empfehlung geführt, dass sich schwangere Frauen von lammenden Schafherden fernhalten.

Auch bei Ziegen zeigte sich bei einer wenn auch mit 4 Proben insgesamt geringen Probenanzahl eine Dominanz von *Cp. abortus*. Diese Spezies konnte bei 3 Proben nachgewiesen werden. Bei einer Probe wurde *Cp. psittaci* festgestellt.

Bei Schweinen war das Spektrum unterschiedlicher Chlamydien-Spezies unter den in dieser Arbeit untersuchten Haustieren am größten, wobei *C. suis* und *C. abortus* dominierten. So erwiesen sich bei jeweils ziemlich genau 60 % der Proben die nachgewiesenen Chlamydien als *C. suis* und *Cp. abortus*, wobei in 21,1 % der Proben DNA von beiden Spezies festgestellt wurde. Zu vergleichbaren Ergebnissen kommen Hoelzle et al., die in Lungen- und Darmgewebe häufig *Cp. abortus* und *C. suis* besonders bei Schweinen mit respiratorischen Erkrankungen, aber auch bei klinisch gesunden Kontrolltieren fanden und bei Schweinen mit Fortpflanzungsstörungen überwiegend *Cp. abortus* nachweisen konnten (114). Der Nachweis von *C. suis* und *Cp. pecorum* bei Schweinen gelang 1995 Schiller et al. (223). Andere Studien haben gezeigt, dass *C. suis*, *Cp. psittaci* und *Chlamydia*-like Organismen auch gemeinsam im Sperma von Ebern vorkommen (246). Bei vergleichbaren Untersuchungen von Kauffold et al. war *Cp. psittaci* vor allem im Sperma, *C. suis* besonders im Kot, und *Cp. pecorum* nur selten in Kot und Samen von Ebern nachweisbar (142).

Auch bei Wildschweinen kommen Infektionen mit Chlamydien vor. In einer Studie (119) wurden bei 8 von 14 Tieren (57,1 %) Chlamydien gefunden, wobei *Cp. psittaci*, *Cp. abortus* und *C. suis* identifiziert werden konnten. In den Lungen von 7 der 8 positiv getesteten Tiere fielen vor allem *Cp. psittaci* (5), aber auch *C. suis* (2) auf. Im Uterus von 2 weiblichen Tieren wurde *Cp. psittaci*, bei einem weiteren *Cp. abortus* nachgewiesen.

Bei dem zuletzt genannten Tier war im Lungengewebe zusätzlich auch *C. suis* vorhanden. Dies weist zusammen mit entsprechenden Befunden der vorliegenden

Studie darauf hin, dass auch beim Schwein ein einzelnes Tier von zwei verschiedenen Chlamydien-Spezies befallen sein kann. Bei gesunden Tieren konnten Chlamydien lediglich im Respirationstrakt, nicht aber im Genitalbereich gefunden werden. Man kann zum einen vermuten, dass *Cp. abortus* eine Ursache für Fruchtbarkeitsstörungen in Schweinebeständen ist, andererseits Infektionen des Respirationstrakts klinisch inapparent bleiben.

Bei Pferden mit Erkrankungen im Respirations- oder Genitaltrakt sind Infektionen mit *Cp. pneumoniae* und *Cp. psittaci* beschrieben worden (58, 110, 236). Dagegen setzte sich das Spektrum der in dieser Arbeit nachgewiesenen Chlamydien-Spezies überwiegend aus *Cp. abortus* (10 von 11 Proben) gefolgt von *C. suis* (3 von 11 Proben) zusammen. Dass das Erregerspektrum beim Pferd ungewöhnlich sein kann, zeigten Untersuchungen des NRL, bei denen *Cp. caviae* bei Pferden festgestellt wurde (31). Über die Bedeutung von Chlamydien-Infektionen als Ursache von Aborten beim Pferd ist wenig bekannt, ebenso wie über die mit solchen Fällen vergesellschafteten Chlamydien-Spezies. In einem Fallbericht beschrieben Henning et al. (110) den Nachweis von *Cp. psittaci* per Anzucht aus der Nachgeburt im Zusammenhang mit einem Abort.

Bei allen 138 Konjunktivalupferproben von Katzen mit positivem Chlamydien-Nachweis konnte die Erregerspezies identifiziert werden. Zahlreiche Arbeiten beschreiben *Cp. felis* als Verursacher oder Begleiterreger des sog. Katzenschnupfenkomplex (59, 62, 107, 108). Auch in dieser Arbeit war *Cp. felis* mit 97,8 % (135 Proben) die bei weitem häufigste bei Katzen nachgewiesene Chlamydien-Spezies. Interessant ist auch der Nachweis von *Cp. psittaci* in zwei Fällen und besonders die Identifizierung von *C. suis* bei einer Katze, die nachweislich Kontakt zu Schweinen hatte. Die Übertragung von *Cp. psittaci* von einem Ara auf eine Katze mit der Folge einer Konjunktivitis ist von Lipman et al. (153) beschrieben worden. Über eine durch *C. suis* verursachte Erkrankung bei der Katze wurde allerdings bisher noch nicht berichtet.

Der Nachweis von *Cp. felis* gelang nicht nur bei Katzen sondern auch in 4 von 5 Chlamydien-positiven Konjunktivalupferproben des Hundes. Als Ursache einer durch Chlamydien bedingten Keratokonjunktivitis beschreibt Hoelzle et al. (116) *Cp. abortus*. Berichte über weitere Fälle von Chlamydien-Infektionen bei Hunden liegen vor, allerdings ohne genauere Angabe der Erregerspezies (9, 93, 276). Während das zoonotische Potential von *Cp. felis* mehrfach dokumentiert worden ist

(12, 126, 221, 222) gibt es über vom Hund auf den Menschen übertragene Chlamydien-Infektionen nur spärliche Berichte. So beschreiben Gresham et al. (93) eine von einem Nymphensittich ausgehende, durch *C. psittaci* (alte Taxonomie) hervorgerufene Chlamydien-Pneumonie bei Hunden und ihren Besitzern, wobei abschließend nicht geklärt werden konnte, welche Rolle die Hunde für die Infektion der Menschen gespielt hatten. Dieser Vorfall gibt aber einen Hinweis auf das zoonotische Potential und die Fähigkeit der Anpassung von Chlamydien an viele unterschiedliche Wirtsorganismen.

Dass das Wirtsspektrum der verschiedenen Chlamydienarten grundsätzlich breiter ist und mehrere Spezies umfasst, als man früher angenommen hat, unterstreicht die vorliegende Arbeit auch für *Cp. caviae*. *Cp. caviae* wurde bisher vor allem bei Meerschweinchen gefunden und konnte hier erstmals nun auch in der Probe von einem Hund nachgewiesen werden.

Es stellte sich heraus, dass es sich bei der Katze mit dem *C. suis*-Nachweis um eine Freigänger-Katze mit Kontakt zu Schweinebeständen handelt. Die Übertragung der Spezies *Cp. psittaci* von einem Ara auf eine Katze konnte bereits nachvollzogen werden (153). Bei den Hunden mit positiven *Cp. felis*- oder *Cp. caviae*-Befunden waren leider keine genauere Angaben über die Haltungsbedingungen zu ermitteln, die gemeinsame Haltung der Hunde mit Katzen oder Meerschweinchen erscheint aber nicht unwahrscheinlich.

Bei Meerschweinchen und Kaninchen, die in einem Haushalt zusammen gehalten wurden, beschränkte sich der Chlamydien-Nachweis in der vorliegenden Arbeit ausschließlich auf die Spezies *Cp. caviae*. Beispiele für Übertragungen von *Cp. caviae* auf andere Tierspezies wie Kaninchen und Katzen oder auch den Menschen findet man bei Lutz-Wohlgroth et al. (158). Der Nachweis von *C. trachomatis* bei Katzen wurde bisher noch nicht beschrieben.

5.5 Schlussfolgerungen

- Mit Hilfe der Real-Time PCR ist es möglich, gemäß den Anforderungen der Psittakose-Verordnung *Cp. psittaci*, den Erreger der Psittakose und Ornithose, in der Routinediagnostik in klinischem Probenmaterial nachzuweisen. Darüber hinaus bietet diese Technik die Möglichkeit, den Nachweis aller in der Veterinärmedizin relevanten Chlamydien-Spezies zu führen.

- Die entwickelten Spezies-spezifischen Real-Time PCR-Assays erwiesen sich in den Tests zur Etablierung als reproduzierbar, spezifisch und sensitiv. Die Nachweisgrenzen liegen in einem Bereich, der dem der bisher für Screening-Untersuchungen verwendeten Chlamydiaceae-spezifischen Real-Time PCR-Methode entspricht.
- Bestätigt werden konnten Untersuchungen anderer Autoren, dass Chlamydien-Spezies nicht wie lange angenommen, ausschließlich Tierart-spezifisch vorkommen, sondern ein breiteres Wirtsspektrum aufweisen. Der vergleichsweise häufige Nachweis von DNA zweier Chlamydien-Spezies in einer einzigen Probe weist darauf hin, dass Mischinfektionen häufiger auftreten, was in der Forschung und Routinediagnostik bisher kaum berücksichtigt wurde.
- Weiterer Forschungsbedarf besteht hinsichtlich der Einschätzung der Pathogenität und des zoonotischen Potentials von manchen Chlamydien-Spezies. Dies betrifft besonders aviäre *Cp. abortus*-Stämme, über deren Bedeutung im Gegensatz zu ovinen Stämmen keine Daten vorliegen.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung und Etablierung von sensitiven und zuverlässigen Real-Time PCR-Assays zum Nachweis von *Chlamydophila* (*Cp.*) *psittaci*, *Cp. abortus*, *Cp. pecorum*, *Cp. felis*, *Cp. caviae* und Chlamydia (*C.*) *suis*. Dabei wurden DNA-Sequenzen der *ompA*- und 23S-rRNA-Gene für den differenzierten Erregernachweis herangezogen. Zur Identifizierung der Chlamydien-Spezies wurde mit Ausnahme von *Cp. psittaci* jeweils eine klassische TaqMan[®]-Sonde entworfen. Aufgrund der großen Nukleotidsequenz-Homologie zwischen *Cp. psittaci* und *Cp. abortus* wurden zur Identifizierung von *Cp. psittaci* zwei TaqMan[®]MGB-Sonden verwendet. Im Rahmen der Etablierung der Methoden wurden Tests zur Reproduzierbarkeit, Spezifität und Nachweisgrenze durchgeführt. Für alle entwickelten Real-Time PCR-Assays wurde eine Nachweisgrenze zwischen 8 bis 80 Chlamydienpartikel und 4 bis 40 Einschlusskörperchen-bildenden Einheiten (EBE) pro Reaktionsansatz ermittelt. Alle verwendeten Assays erwiesen sich als reproduzierbar, spezifisch und sensitiv.

Um die tierartliche Häufigkeitsverteilung der verschiedenen tierpathogenen Chlamydien-Spezies (*Cp. psittaci*, *Cp. abortus*, *Cp. pecorum*, *Cp. felis*, *Cp. caviae* und *C. suis*) zu analysieren, wurden DNA-Proben von Psittaziden, Tauben und verschiedenen Säugetierarten, die bereits positiv auf Chlamydiaceae-DNA getestet worden waren, mit den Spezies-spezifischen Real-Time PCR-Assays nachuntersucht. Auffallend ist, dass bei Psittaziden und Tauben nicht nur *Cp. psittaci* (92 %), sondern auch *Cp. abortus* (8 %) relativ häufig vorkam. Während bei Schweinen, Rindern, Schafen und Pferden DNA der Spezies *Cp. psittaci*, *Cp. abortus*, *Cp. pecorum* oder *C. suis* einzeln oder in Kombination festgestellt werden konnten, wurde bei Katzen mit *Cp. felis* (135/138; 98 %) sowie bei Meerschweinchen und Kaninchen mit *Cp. caviae* (12/12 bzw. 4/4; 100 %) überwiegend die DNA nur einer einzigen Erregerspezies nachgewiesen. DNA dieser beiden *Chlamydophila*-Spezies war auch in den Proben von Hunden (*Cp. felis* 4/5; 80 % und *Cp. caviae* 1/5; 20 %) zu finden.

Beim Vergleich der mit den Real-Time PCR-Assays und der Microarray-Technik erzielten Ergebnisse ließ sich bei 4 der 15 untersuchten Proben eine vollständige Übereinstimmung bei der Speziesidentifizierung von Chlamydien feststellen. In der Probe einer Katze wurde mit Hilfe der Microarray-Technik zusätzlich DNA von *C. trachomatis* nachgewiesen, für die in dieser Arbeit kein entsprechender Real-Time PCR-Assay entwickelt worden war. Die 11 unterschiedlich bewerteten Proben enthielten DNA von wenigstens zwei Chlamydienarten, wobei die Microarray-Technik stets nur diejenige Spezies erkannte, die im Real-Time PCR-Assay den niedrigeren C_T -Wert erzielte, d.h. das stärkere Signal erzeugte.

Im Rahmen eines Ringversuches, an dem 16 deutsche Untersuchungseinrichtungen in Deutschland teilnahmen, wurden zwei Real-Time-PCR-Assays zum Nachweis von Chlamydiaceae- bzw. *Cp. psittaci*-DNA (Assays 1 und 12) auf ihre Eignung für die veterinärmedizinische Psittakose-/Ornithose-Diagnostik geprüft. Dazu wurden insgesamt 25 Proben sowie eine Positiv- und eine Negativkontrolle an die Teilnehmer verschickt und von diesen nach standardisierten Arbeitsprotokollen untersucht. Beide Assays erwiesen sich als sensitiv und spezifisch und ergaben eine Nachweisgrenze von 100 EBE je Probe.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen, dass alle gegenwärtig in der Veterinärmedizin relevanten Chlamydien-Spezies mit Hilfe von Real-Time PCR-Assays sensitiv und Spezies-spezifisch in entsprechend aufgearbeitetem Probenmaterial nachzuweisen sind. Alle untersuchten Chlamydien-Spezies kommen bei Tieren in Deutschland vor. Dabei sind sie nicht auf eine einzelne Wirtsspezies beschränkt, sondern von ihren Hauptwirten offenbar auch auf Individuen anderer Arten übertragbar. Die Befunde deuten ferner daraufhin, dass Mischinfektionen durch zwei Chlamydien-Spezies nicht selten sind. Die Anwendung von Real-Time PCR-Assays in der Routinediagnostik kann insbesondere der in der Psittakose-VO begründeten Forderung nach dem spezifischen Nachweis von *Cp. psittaci* gerecht werden.

SUMMARY

The objective of the present study was to develop and establish sensitive and reliable real-time PCR assays for the detection of *Chlamydophila* (*Cp.*) *psittaci*, *Cp. abortus*, *Cp. pecorum*, *Cp. felis*, *Cp. caviae* and *C. suis*. For this purpose DNA sequences of *ompA*- and 23S-rRNA-genes served as targets. Species-specific assays based on classical TaqMan[®] probes were designed for the identification of all these chlamydial species except *Cp. psittaci*. For unambiguous identification of *Cp. psittaci* it was necessary to design two minor groove-binding (MGB) probes in order to cope with the high homology between the target sequences of *Cp. psittaci* and *Cp. abortus*. Establishment of real-time PCR assays included tests for determination of reproducibility, specificity and the detection limits. In these tests assays were able to detect DNA equivalent to 8 - 80 chlamydial particles or 4 - 40 Inclusion Forming Units (IFUs), respectively. All assays proved to be reproducible, specific and sensitive.

To analyze the occurrence of chlamydial species (*Cp. psittaci*, *Cp. abortus*, *Cp. pecorum*, *Cp. felis*, *Cp. caviae* and *C. suis*) DNA samples from psittacine birds and pigeons, as well as several mammalian species that had been previously tested positive in a Chlamydiaceae-specific real-time PCR, were retested with the newly developed species-specific real-time PCR assays. Surprisingly, DNA not only of *Cp. psittaci* (92 %), but also of *Cp. abortus* (8 %) was found in samples from psittacine birds and pigeons rather frequently. DNA of *Cp. psittaci*, *Cp. abortus*, *Cp. pecorum* or *C. suis*, singly or two species in one sample, was detected in pigs, cattle, sheep and horses. *Cp. felis* was the predominant species in samples from cats (135/138; 98 %), whereas in guinea pigs and rabbits only *Cp. caviae* was detected (12/12 and 4/4; 100 %). Interestingly, both pathogens were also identified in samples from dogs (*Cp. felis* 4/5; 80 % and *Cp. caviae* 1/5; 20 %).

Fifteen samples were comparatively tested for chlamydial DNA by the newly developed real-time PCR assays and an established microarray assay. Four samples yielded the same results in both assays. In one sample from a cat *C. trachomatis* was detected additionally, a species not considered in the process of PCR assay development. Samples yielding different results in both assays contained DNA of at least two chlamydial species. In each of these eleven samples the microarray assay

detected only one species and in particular that species that gave the strongest signal in the real-time PCR assays.

A ring trial among 16 German laboratories was performed in order to test the suitability of two real-time PCR assays (assays 1 and 12) for the detection of Chlamydiaceae- and *Cp. psittaci*-DNA, respectively, in veterinary psittacosis/ornithosis diagnostics. For this purpose a panel of 25 samples as well as a positive and negative controls were shipped and tested by the participants according to a standard PCR protocol. Both assays appeared to be specific and sensitive and revealed a detection limit of 100 IFU per sample.

Results of this study demonstrate that all chlamydial species currently relevant in veterinary medicine can be detected sensitively and species-specifically in processed clinical samples by means of real-time PCR assay. All chlamydial species that were looked for in this study were detected among animals in Germany. Since none of these species was restricted to a single host species transmission of these pathogens from their major hosts to individuals of other species appears as a common phenomenon. Moreover, results suggest that mixed infections by two chlamydial species occurs frequently. The application of real-time PCR assay in routine diagnostics meets the requirements of German psittacosis regulation claiming for species-specific detection of *Cp. psittaci*.

7 LITERATURVERZEICHNIS

1. **Amin, A.S. (2003):** Comparison of polymerase chain reaction and cell culture for the detection of *Chlamydophila* species in the semen of bulls, buffalo-bulls and rams. *Vet. J.* 166(1): 86-92.
2. **Andersen, A.A. (1991):** Serotyping of *Chlamydia psittaci* isolates using serovar-specific monoclonal antibodies with the microimmunofluorescence test. *J. Clin. Microbiol.* 29(4): 707-711.
3. **Andersen, A.A. (1996):** Comparison of pharyngeal, fecal and cloacal samples for the isolation of *Chlamydia psittaci* from experimentally infected cockatiels and turkeys. *J. Vet. Diagn. Invest.* 8: 448-450.
4. **Andersen, A.A. (1997):** Two new serovars of *Chlamydia psittaci* from North American birds. *J. Vet. Diagn. Invest.* 9(2): 159-164.
5. **Andersen, A.A. (1998):** Chlamydiosis. In: A laboratory manual for the isolation and identification of Avian Pathogens. 4th Edition. Eds. D.E. Swayne et al.. Kennett Aquare: American Association of Avian Pathologist: 81-88.
6. **Andersen, A.A. (2005):** Serotyping of US isolates of *Chlamydophila psittaci* from domestic and wild birds. *J. Vet. Diagn. Invest.* 17(5): 479-482.
7. **Andersen, A.A. & D. Vanrompay (2003):** Avian chlamydiosis (psittacosis, ornithosis). In: Diseases of Poultry (11th Ed). Saif YM (Ed) Iowa State Press: 863-879.
8. **Andrews, B.E., R. Major & S.R. Palmer (1981):** Ornithosis in poultry workers. *Lancet* 1(8221): 632-634.
9. **Arizmendi, F., J.E. Grimes & R.L. Relford (1992):** Isolation of *Chlamydia psittaci* from pleural effusion in a dog. *J. Vet. Diagn. Invest.* 4(4): 460-463.
10. **Baehr, W., Y.X. Zhang, T. Joseph, H. Su, F.E. Nano, K.D.E. Everett & H.D. Caldwell (1988):** Mapping antigenic domains expressed by *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85: 4000-4004.

11. **Baghian, A. & K.L. Schnorr (1992):** Detection and antigenicity of chlamydial proteins that bind eukaryotic cell membrane proteins. *Am. J. Vet. Res.* 53(6): 980-986.
12. **Bart, M., F. Guscelli, A. Zurbriggen, A. Pospischil & I. Schiller (2000):** Feline infectious pneumonia: a short literature review and a retrospective immunohistological study on the involvement of *Chlamydia* spp. and distemper virus. *Vet. J.* 159(3): 220-230.
13. **Batteiger, B.E., P.M. Lin, R.B. Jones & B.J. Van Der Pol (1996):** Species-, serogroup-, and serovar-specific epitopes are juxtaposed in variable sequence region 4 of the major outer membrane proteins of some *Chlamydia trachomatis* serovars. *Infect. Immun.* 64(7): 2839-2841.
14. **Bazala, E. & J. Renda (1992):** Latente Chlamydieninfektionen als Ursache von Gesundheitsstörungen bei Schweine-, Rinder- und Schafzüchtern in der CSFR. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* 105: 145-149.
15. **Beatty, W.L., G.I. Byrne & R.P. Morrison (1993):** Morphologic and antigenic characterization of interferon gamma-mediated persistent *Chlamydia trachomatis* infection in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 3998-4002.
16. **Beatty, W.L., R.P. Morrison & G.I. Byrne (1994):** Persistent chlamydiae: from cell culture to a paradigm for chlamydial pathogenesis. *Microbiol. Rev.* 58(4): 686-699.
17. **Beem, M.O. & E.M. Saxon (1977):** Respiratory tract colonization and a distinctive pneumonia syndrom in infants infected with *Chlamydia trachomatis*. *N. Engl. J. Med.* 296: 306-310.
18. **Berger, L., K. Volp, S. Mathews, R. Speare & P. Timms (1999):** *Chlamydia pneumoniae* in a free-ranging giant barred frog (*Mixophyes iteratus*) from Australia. *J. Clin. Microbiol.* 37(7): 2378-2380.
19. **Berthier, M., D. Bonneau, M. Marechaud, D. Oriot, M. Deshayes, P. Levillain & G. Magnin (1991):** Materno-fetal infection by *Chlamydia psittaci* transmitted by the goat: a new zoonosis? *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 84(5): 590-596.

20. **Biesenkamp-Uhe, C., Y. Li, H.R. Hehnen, K. Sachse & B. Kaltenboeck (2007):** Therapeutic *Chlamydophila abortus* and *C. pecorum* vaccination transiently reduces bovine mastitis associated with *Chlamydophila* infection. *Infect. Immun.* 75(2): 870-877.
21. **Birtles, R.J., T.J. Rowbotham, C. Storey, T.J. Marrie & D. Raoult (1997):** *Chlamydia*-like obligate parasite of free-living amoebae. *Lancet* 349(9056): 925-926.
22. **Blasi, F., D. Legnani, V.M. Lombardo, G.G. Negretto, E. Magliano, R. Pozzoli, F. Chiodo, A. Fasoli & L. Allegra (1993):** *Chlamydia pneumoniae* infection in acute exacerbations of COPD. *Eur. Respir. J.* 6: 19–22.
23. **Bocklisch, H., C. Ludwig & S. Lange (1991):** *Chlamydia* as the cause of abortions in horses. *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.* 104(4): 119-124.
24. **Bodetti, T.J., E. Jacobson, C. Wan, L. Hafner, A. Pospischil, K. Rose & P. Timms (2002):** Molecular evidence to support the expansion of the hostrange of *Chlamydophila pneumoniae* to include reptiles as well as humans, horses, koalas and amphibians. *Syst. Appl. Microbiol.* 25(1): 146-152.
25. **Bodetti, T.J. & P. Timms (2000):** Detection of *Chlamydia pneumoniae* DNA and antigen in the circulating mononuclear cell fractions of humans and koalas. *Infect. Immun.* 68(5): 2744-2747.
26. **Borel, N., R. Thoma, P. Spaeni, R. Weilenmann, K. Teankum, E. Brugnera, D.R. Zimmermann, L. Vaughan & A. Pospischil (2006):** *Chlamydia*-related abortions in cattle from Graubünden, Switzerland. *Vet. Pathol.* 43(5): 702-708.
27. **Borel, N., E. Kempf, H. Hotzel, E. Schubert, P. Torgerson, P. Slickers, R. Ehrlich, T. Tasara, A. Pospischil & K. Sachse (2008):** Direct identification of chlamydiae from clinical samples using a DNA microarray assay: validation study. *Mol. Cell. Probes* 22(1): 55-64.
28. **Bowen, R.A., P. Spears, J. Stotz & G.E. Jr. Deidel (1978):** Mechanisms of infertility in genital tract infections due to *Chlamydia psittaci* transmitted through contaminated semen. *J. Infect. Dis.* 138(1): 95-98.

29. **Broholm, K.A., M. Bottiger, H. Jernelius, M. Johansson, M. Grandien & K. Solver (1977):** Ornithosis as a nosocomial infection. *Scand. J. Infect. Dis.* 9(4): 263-267.
30. **Browning, G.F. (2004):** Is *Chlamydomphila felis* a significant zoonotic pathogen? *Aust. Vet. J.* 82(11): 695-696.
31. **Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft (BMVEL):** Jahresbericht 2006 Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit.
32. **Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft (BMVEL):** Nachricht zur Durchführung der Psittakose-Verordnung vom 06.12.2004, AZ. 323-3602-6/0004.
33. **Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft (BMVEL):** Tierseuchengesetz in der Fassung vom 22.06.2004.
34. **Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft (BMVEL):** Verordnung über anzeigepflichtige Tierkrankheiten in der Fassung vom 03.11.2004.
35. **Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft (BMVEL):** Verordnung über meldepflichtige Tierkrankheiten in der Fassung vom 20.12.2005.
36. **Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft (BMVEL):** Verordnung zum Schutz gegen die Psittakose und Ornithose in der Fassung vom 20.12.2005.
37. **Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft (BMVEL):** Verordnung zur Veränderung tierseuchen- und lebensmittelrechtlicher Vorschriften zur Überwachung von Zoonosen und Zoonoseerregern in der Fassung vom 09.11.2004.
38. **Bush, R.M. & K.D.Everett (2001):** Molecular evolution of Chlamydiaceae. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51(1): 203-220.
39. **Busch, M., R. Thoma, I. Schiller, L. Corboz & A. Pospischil (2000):** Occurrence of chlamydiae in the genital tracts of sows at slaughter and

- their possible significance for reproductive failure. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health.* 47(6): 471-480.
40. **Bustin, S.A. (2000):** Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol. Endocrinol.* 25(2): 169-193.
 41. **Buxton, D. (1986):** Potential danger to pregnant women of *Chlamydia psittaci* from sheep. *Vet. Rec.* 118: 510-511.
 42. **Byrne, G.I. & D.M. Ojcius (2004):** *Chlamydia* and apoptosis: life and death decisions of an intracellular pathogen. *Nat. Rev. Microbiol.* 2(10): 802-808.
 43. **Byrne, G.I., S.P. Ouellette, Z. Wang, J.P. Rao, L. Lu, W.L. Beatty & A.P. Hudson (2001):** *Chlamydia pneumoniae* expresses genes required for DNA replication but not cytokinesis during persistent infection of HEp-2 cells. *Infect. Immun.* 69: 5423-5429.
 44. **Camenisch, U., Z.H. Lu, L. Vaughan, L. Corboz, D.R. Zimmermann, M.M. Wittenbrink, A. Pospischil & T. Sydler (2004):** Diagnostic investigation into the role of Chlamydiae in cases of increased rates of return to oestrus in pigs. *Vet. Rec.* 155(19): 593-596.
 45. **Casadevall, A. & L.A. Pirofski (2000):** Host-pathogen interactions: basic concepts of microbial commensalism, colonization, infection, and disease. *Infect. Immun.* 68: 6511–6518.
 46. **Chahota, R., H. Ogawa, Y. Mitsuhashi, K. Ohya, T. Yamaguchi & H. Fukushi (2006):** Genetic diversity and epizootiology of *Chlamydophila psittaci* prevalent among the captive and feral avian species based on VD2 region of *ompA* gene. *Microbiol. Immunol.* 50(9): 663-678.
 47. **Chua, P.K., J.E. Corkill, P.S. Hooi, S.C. Cheng, C. Winstanley & C.A. Hart (2005):** Isolation of *Waddlia malaysiensis*, a novel intracellular bacterium, from fruit bat (*Eonycteris spelaea*). *Emerg. Infect. Dis.* 11(2): 271-277.
 48. **Cislakova, L., M. Stanko, J. Fricova, L. Mosansky, M. Travnicek, M. Halanova, S. Mardzinova & A. Stefancikova (2004):** Small

- mammals (Insectivora, Rodentia) as a potential source of chlamydial infection in East Slovakia. *Ann. Agric. Environ. Med.* 11(1): 139-143.
49. **Clarkson, M.J. & H.L. Philips (1997):** Isolation of faecal chlamydia from sheep in Britain and their characterization by cultural properties. *Vet. J.* 153(3): 307-310.
50. **Coles, A. M., D. J. Reynolds, A. Harper, A. Devitt, & J. H. Pearce. (1993):** Low-nutrient induction of abnormal chlamydial development: a novel component of chlamydial pathogenesis? *FEMS Microbiol. Lett.* 106: 193–200.
51. **Crosse, B.A. (1990):** Psittacosis: a clinical review. *J. Infect.* 21(3): 251-259.
52. **Crosse, B.A., P. Gomes & M.M. Muers (1991):** Ovine psittacosis and sarcoidosis in a pregnant woman. *Thorax* 46(8): 604-606.
53. **Dean, R., R. Harley, C. Helps, S. Caney & T. Gruffydd-Jones (2005):** Use of quantitative real-time PCR to monitor the response of *Chlamydophila felis* infection to doxycycline treatment. *J. Clin. Microbiol.* 43(4): 1858-1864.
54. **Dedieu, L., A. Bréard, C. Le Goff & P.C. Lefèvre (1996):** Diagnostic de la péripneumonie contagieuse bovine: problèmes et nouveaux développements. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 15: 1331-1353.
55. **DeGraves, F.J., D. Gao & B. Kaltenboeck (2003):** High-sensitivity quantitative PCR platform. *Biotechniques* 34(1): 106-110, 112-115.
56. **DeGraves, F.J., D. Gao, H.R. Hehnen, T. Schlapp & B. Kaltenboeck (2003):** Quantitative detection of *Chlamydia psittaci* and *C. pecorum* by high-sensitivity real-time PCR reveals high prevalence of vaginal infection in cattle. *J. Clin. Microbiol.* 41(4): 1726-1729.
57. **Dennis, W. & J. Storz (1982):** Infectivity of *Chlamydia psittaci* of bovine and ovine origins for cultured cells. *Am. J. Vet. Res.* 43: 1897-1902.
58. **Di Francesco, A., M. Donati, L. Mattioli, M. Naldi, D. Salvatore, G. Poglayen, R. Cevenini & R. Baldelli (2006):** *Chlamydophila pneumoniae* in horses: a seroepidemiological survey in Italy. *New Microbiol.* 29(4): 303-305.

59. **Di Francesco, A., S. Piva & R. Baldelli (2004):** Prevalence of *Chlamydophila felis* by PCR among healthy pet cats in Italy. *New Microbiol.* 27(2): 199-201.
60. **Dilbeck, P.M., J.F. Evermann, T.B. Crawford, A.C. Ward, C.W. Leathers, C.J. Holland, C.A. Mebus, L.L. Logan, F.R. Rurangirwa & T.C. McGuire (1990):** Isolation of a previously undescribed rickettsia from an aborted bovine fetus. *J. Clin. Microbiol.* 28(4): 814-816.
61. **Dilbeck-Robertson, P., M.M. McAllister, D. Bradway & J.F. Evermann (2003):** Results of a new serologic test suggest an association of *Waddlia chondrophila* with bovine abortion. *J. Vet. Diagn. Invest.* 15(6): 568-569.
62. **Donati, M., S. Piva, A. Di Francesco, C. Mazzeo, M. Pietra, R. Cevenini & R. Baldelli (2005):** Feline ocular chlamydiosis: clinical and microbiological effects of topical and systemic therapy. *New Microbiol.* 28(4): 369-372.
63. **Draghi, A. 2nd, V.L. Popov, M.M. Kahl, J.B. Stanton, C.C. Brown, G.J. Tsongalis, A.B. West & S. Jr. Frasca (2004):** Characterization of "Candidatus *piscichlamydia salmonis*" (order Chlamydiales), a *Chlamydia*-like bacterium associated with epitheliocystis in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). *J. Clin. Microbiol.* 42(11): 5286-5297.
64. **Duan, Y.J., A. Souriau, A.M. Mahe, D. Trap, A.A. Andersen & A. Rodolakis (1999):** Serotyping of chlamydial clinical isolates from birds with monoclonal antibodies. *Avian Dis.* 43(1): 22-28.
65. **Eddie, B., W.J. Sladen, B.K. Sladen & K.F. Meyer (1966):** Serologic studies and isolation of *Bedsonia* agents from Northern Fur Seals on the Pribilof Islands. *Am. J. Epidemiol.* 84: 405-410.
66. **Eddy, R.G. & W.B. Martin (1986):** Pregnant women and chlamydial infection. *Vet. Rec.* 3: 519.
67. **Ehrlich R., P. Slickers, S. Goellner, H. Hotzel & K. Sachse (2006):** Optimized DNA microarray assay allows detection and genotyping of single PCR-amplifiable target copies. *Mol. Cell. Probes* 20: 60-63.
68. **Eickhoff, M., T. Laue, T. Ruckes, S.O. Cramer, G. Krupp & C. Tiemann (2003):** Ultra-rapid detection of *Chlamydia trachomatis* by real-time PCR

in the LightCycler using SYBR green technology or 5'-nuclease probes. Clin. Lab. 49(5-6): 217-225.

69. **Emerson, P.M., R.L. Bailey, O.S. Mahdi, G.E. Walraven & S.W. Lindsay (2000):** Transmission ecology of the fly *Musca sorbens*, a putative vector of trachoma. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 94: 28-32.
70. **Erntell, M., K. Ljunggren, T. Gadd & K. Persson (1989):** Erythema nodosum—a manifestation of *Chlamydia pneumoniae* (strain TWAR) infection. Scand. J. Infect. Dis. 21: 693-696.
71. **Escalante-Ochoa, C., R. Ducatelle & F. Haesebrouck (1998):** The intracellular life of *Chlamydia psittaci*: how do the bacteria interact with the host cell? FEMS Microbiol. Rev. 22(2): 65-78.
72. **Espy, M.J., J.R. Uhl, L.M. Sloan, S.P. Buckwalter, M.F. Jones, E.A. Vetter, J.D. Yao, N.L. Wengenack, J.E. Rosenblatt, F.R. Cockerill & T.F. Smith (2006):** Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. Clin. Microbiol. Rev. 19(1): 165-256.
73. **Everett, K.D.E. (2000):** Chlamydia and Chlamydiales: more than meets the eye. Vet. Microbiol. 75(2): 109-126.
74. **Everett, K.D.E. & A.A. Andersen (1997):** The ribosomal intergenetic spacer and domain I of the 23S rRNA gene are phylogenetic markers for *Chlamydia* spp. Int. J. Syst. Bacteriol. 47: 461-473.
75. **Everett, K.D.E. & A.A. Andersen (1999):** Identification of nine species of the Chlamydiaceae using RFLP-PCR. Int. J. Syst. Bacteriol. 49: 803-813.
76. **Everett, K.D.E., L.J. Hornung & A.A. Andersen (1999):** Rapid detection of the Chlamydiaceae and other families in the order Chlamydiales: Three PCR tests. J. Clin. Microbiol. 37: 575-580.
77. **Everett, K.D.E., R.M. Bush & A.A. Andersen (1999):** Emended description of the order Chlamydiales, proposal of Parachlamydiaceae fam. nov. and Simkaniaceae fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family Chlamydiaceae, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. Int. J. Syst. Bacteriol. 49: 415-440.

78. **Fiandaca, M.J., J.J. Hyldig-Nielsen, B.D. Gildes & J.M. Coull (2001):** Self-reporting PNA/DNA primers for PCR analysis. *Genome Res.* 11(4): 609-613.
79. **Fritsche, T.R., M. Horn, M. Wagner, R.P. Herwig, K.H. Schleifer & R.K. Gautom (2000):** Phylogenetic diversity among geographically dispersed Chlamydiales endosymbionts recovered from clinical and environmental isolates of *Acanthamoeba* spp.. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(6): 2613-2619.
80. **Fukushi, H. & K. Hirai (1992):** Proposal of *Chlamydia pecorum* sp. nov. For *Chlamydia* strains derived from ruminants. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42: 306-308.
81. **Gaede, W., B. Dresenkamp, S. Kenklies, U. Noack, H. Oppermann, T. Kühn, C. Ludwig, H. Hotzel & K. Sachse (2006):** An outbreak of psittacosis (ornithosis) in poultry in the German Federal State of Saxony-Anhalt and Thuringia. Fourth Annual Workshop of Cost Action 855, Edinburgh (3.-5.September).
82. **Gaillard, E.T., A.M. Hargis, D.J. Prieur, J.F. Evermann & A.S. Dhillon (1984):** Pathogenesis of feline gastric chlamydial infection. *Am. J. Vet. Res.* 45(11): 2314-2321.
83. **Geens, T., A. Desplanques, M. Van Loock, B.M. Bonner, E.F. Kaleta, S. Magnino, A.A. Andersen, K.D. Everett & D. Vanrompay (2005):** 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.* 43(5): 2456-2461.
84. **Geens, T., A. Dewitte, N. Boon & D. Vanrompay (2005):** Development of a *Chlamydophila psittaci* species-specific and genotype-specific real-time PCR. *Vet. Res.* 36: 787-797.
85. **Gerbermann, H. (1991):** Chlamydiose beim Rind und ihre Bedeutung im Fruchtbarkeitsgeschehen. *Wien. Tierärztl. Monatsschr.* 78: 13-19.
86. **Gerbermann, H. & R. Korbel (1993):** Zum Vorkommen von *Chlamydia psittaci*-Infektionen bei Greifvögeln aus freier Wildbahn. *Tierärztl. Praxis* 21: 217-224.

87. **Giroud, P., P. Groulade, F. Roger & N. Dortoïs (1954):** Reactions positives vis-à-vis d'un antigène du groupe de la psittacose chez le chien, au cours de divers syndromes infectieux. Bull. Acad. Vet. Fr. 27: 309-311.
88. **Glavits, R., T. Molnar & M. Rady (1988):** Chlamydia-induced abortion in a horse. Acta. Vet. Hung. 36(1-2): 33-36.
89. **Goellner, S., E. Schubert, E. Liebler-Tenorio, H. Hotzel, H.P. Saluz & K. Sachse (2006):** Transcriptional response patterns of *Chlamydophila psittaci* in different in vitro models of persistent infection. Infect. Immun. 74(8): 4801-4808.
90. **Grayston, J.T., C.C. Kuo, L.A. Campbell & S.P. Wang (1989):** *Chlamydia pneumoniae* sp. nov. for *Chlamydia* sp. strain TWAR. Int. J. Syst. Bacteriol. 39: 88-90.
91. **Grayston, J.T., C.C. Kuo, S.P. Wang & J. Altman (1986):** A new *Chlamydia psittaci* strain, TWAR, isolated in acute respiratory tract infections. New England J. Med. 315: 161-168.
92. **Greub, G. & D. Raoult (2002):** Parachlamydiaceae: potential emerging pathogens. Emerg. Infect. Dis. 8(6): 625-630.
93. **Gresham, A.C., C.E. Dixon & B.J. Bevan (1996):** Domiciliary outbreak of psittacosis in dogs: potential for zoonotic infection. Vet. Rec. 138 (25): 622-623.
94. **Grimes, J.E. & L.A. Page (1978):** Comparison of direct and modified direct complement-fixation and agar-gel precipitin methods in detecting chlamydial antibody in wild birds. Avian Dis. 22(3): 422-430.
95. **Grönhagen-Riska, C., P. Saikku, H. Riska, B. Froseth & J.T. Grayston (1988):** Antibodies to TWAR—a novel type of *Chlamydia* – in sarcoidosis. In: Sarcoidosis and other granulomatous disorders. C. Grassi, G. Rizzato and E. Pozzi, Excerpta Medica, Amsterdam: 297–301.
96. **Haag-Wackernagel, D. & H. Moch (2004):** Health hazards posed by feral pigeons. Infect. 48(4): 307-313.

97. **Hahn, D.L., R.W. Dodge & R. Golubjatnikov (1991):** Association of *Chlamydia pneumoniae* (strain TWAR) infection with wheezing, asthmatic bronchitis, and adult-onset asthma. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 266: 225-230.
98. **Hardick, J., N. Maldeis, M. Theodore, B.J. Wood, S. Yang, S. Lin, T. Quinn & C. Gaydos (2004):** Real-time PCR for *Chlamydia pneumoniae* utilizing the Roche Lightcycler and a 16S rRNA gene target. *J. Mol. Diagn.* 6:132–136.
99. **Hargis, A.M., D.J. Prieur & E.T. Gaillard (1983):** Chlamydial infection of the gastric mucosa in twelve cats. *Vet. Pathol.* 20(2): 170-178.
100. **Hartley, J.C., S. Stevenson, A.J. Robinson, J.D. Littlewood, C. Carder, J. Cartledge, C. Clark & G.L. Rigdway (2001):** Conjunctivitis due to *Chlamydomphila felis* (*Chlamydia psittaci* feline pneumonitis agent) acquired from a cat: case report with molecular characterization of isolates from the patient and cat. *J. Infect.* 43 (1): 7-11.
101. **Hatch, T.P. (1999):** Developmental biology. In: *Chlamydia. Intracellular biology, pathogenesis, and immunity.* R. S. Stephens. ASM Press, Washington, D. C. : 101-138.
102. **Hedberg, K., K.E. White, J.C. Forfang, J.A. Korlath, K.A. Friendshuh, C.W. Hedberg, K.L. MacDonald & M.T. Osterholm (1989):** An outbreak of psittacosis in Minnesota turkey industry workers: implications for modes of transmission and control. *Am. J. Epidemiol.* 130: 569–577.
103. **Heddema, E.R., M.G. Beld, B. de Wever, A.A. Langerak, Y. Pannekoek & B. Duim (2006):** Development of an internally controlled Real-Time PCR-Assay for detection of *Chlamydomphila psittaci* in the LightCycler 2.0 system. *Clin. Microbiol. Infect.* 12(6): 571-575.
104. **Heddema, E.R., E.J. van Hannen, B. Duim, B.M. de Jongh, J.A. Kaan, R. van Kessel, J.T. Lumeij, C.E. Visser & C.M. Vandenbroucke-Grauls (2006):** An outbreak of psittacosis due to *Chlamydomphila psittaci* genotype A in a veterinary teaching hospital. *J. Med. Microbiol.* 55(11): 1571-1675.

105. **Heller, M.J. (2002):** DNA microarray technology: devices, and application. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 4: 129-153.
106. **Helm, C.W., G.E. Smart, A.D. Cumming, A.T. Lambie, J.A. Gray, A. McAuly & I.W. Smith (1989):** Sheep acquired several *Chlamydia psittaci* infection in pregnancy. *Intern. J. Gyn. Obst.* 28: 369-372.
107. **Helps, C., N. Reeves, K. Egan, P. Howard & D. Harbour (2003):** Detection of *Chlamydophila felis* and feline herpesvirus by multiplex realtime PCR analysis. *J. Clin. Microbiol.* 41: 2734–2736.
108. **Helps, C., N. Reeves, S. Tasker & D. Harbour (2001):** Use of real-time quantitative PCR to detect *Chlamydophila felis* infection. *J. Clin. Microbiol.* 39(7): 2675-2676.
109. **Henning, K., G. Schares, H. Granzow, U. Polster, M. Hartmann, H. Hotzel, K. Sachse, M. Peters & M. Rauser (2002):** *Neospora caninum* and *Waddlia chondrophila* strain 2032/99 in a septic stillborn Calf. *Vet. Microbiol.* 85(3): 285-292.
110. **Henning, K., K. Sachse & R. Sting (2000):** Demonstration of *Chlamydia* from an equine abortion. *Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.* 107: 49-52.
111. **Herring, A.J., (1993):** Typing *Chlamydia psittaci*--a review of methods and recent findings. *Br. Vet. J.* 149(5): 455-475.
112. **Hinton, D.G., A. Shipley, J.W. Galvin, J.T. Harkin & R.A. Brunton (1993):** Chlamydiosis in workers at a duck farm and processing plant. *Aust. Vet. J.* 70: 174–176.
113. **Hirst, L.W., A.S. Brown, R. Kampster, J. Hall & J.B. Woolcock (1988):** Serological investigations for some bacterial and viral pathogens in fallow deer (*Cervus dama*) and wild boar (*Sus scrofa*) of the San Rossore Preserve, Tuscany, Italy. *J. Wildl. Dis.* 24(1): 127-132.
114. **Hoelzle, L.E., G. Steinhausen & M.M. Wittenbrink (2000):** PCR-based detection of chlamydial infection in swine and subsequent PCR-coupled genotyping of chlamydial *ompA*-Gene amplicons by DNA-hybridization, RFLP-analysis, and nucleotide sequence analysis. *Epidemiol. Infect.* 125(2): 427-439.

115. **Hoelzle, K., L.E. Hoelzle, C. Knitz & M.M. Wittenbrink (2002):** Speziesspezifische Serodiagnostik bei Rind und Schwein mit rekombinanten Chlamydia- MOMP s als Antigen. Dtsch. Tierärztl. Wochenschr. 109: 450.
116. **Hoelzle, K., M.M. Wittenbrink, L. Corboz & L.E. Hoelzle (2005):** *Chlamydophila abortus*-induced keratoconjunctivitis in a dog. Vet. Rec. 157(20): 632-633.
117. **Hoffmann, B., K. Depner, H. Schirrmeier & M. Beer (2006):** A universal heterologous internal control system for duplex real-time RT-PCR assays used in a detection system for pestiviruses. J. Virol. Meth. 136: 200-209.
118. **Hoover, E.A., D.E. Kahn & J.M. Langloss (1978):** Experimentally induced feline chlamydial infection (feline pneumonitis). Am. J. Vet. Res. 39(4): 541-547.
119. **Hotzel, H., A. Berndt, F. Melzer & K. Sachse (2004):** Occurrence of Chlamydiaceae spp. in a wild boar (*Sus scrofa* L.) population in Thuringia (Germany). Vet. Microbiol. 103(1-2): 121-126.
120. **Hotzel, H., E. Grossmann, F. Mutschmann & K. Sachse (2001):** Genetic characterization of a *Chlamydophila pneumoniae* isolate from an African frog and comparison to currently accepted biovars. Syst. Appl. Microbiol. 24(1): 63-66.
121. **Huang, J., F.J. DeGraves, D. Gao, P. Feng, T. Schlapp & B. Kaltenboeck (2001):** Quantitative detection of *Chlamydia* spp. by fluorescent PCR in the LightCycler. Biotechniques 30(1): 150-157.
122. **Huchzermeyer, F.W., G.H. Gerdes, C.M. Foggin, K.D. Huchzermeyer & L.C. Limper (1994):** Hepatitis in farmed hatchling Nile crocodiles (*Crocodylus niloticus*) due to chlamydial infection. J. S. Afr. Vet. Assoc. 65(1): 20-22.
123. **Hughes, E.S., K.M. Shaw & R.H. Ashley (2001):** Mutagenesis and functional reconstitution of chlamydial major outer membrane proteins: VS4 domains are not required for pore formation but modify channel function. Infect. Immun. 69(3): 1671-1678.

124. **Illner, F. (1962):** Zur Frage der Übertragung des Ornithosevirus durch das Ei. *Mh. Vet. Med.* 17: 116-117.
125. **Jacobson, E.R. & S.R. Telford (1990):** Chlamydial and poxvirus infections of circulating monocytes of a flap-necked chameleon (*Chamaeleo dilepis*). *Wildl. Dis.* 26(4): 572-577.
126. **Jahn, G.J. & A.A. Bialasiewicz (1986):** Keratoconjunctivitis caused by *Chlamydia psittaci*. *Klin. Monatsbl. Augenheilkd.* 188(1): 47-49.
127. **Jee, J., F.J. Degraives, T. Kim & B. Kaltenboeck (2004):** High prevalence of natural *Chlamydophila* species infection in calves. *J. Clin. Microbiol.* 42(12): 5664-5672.
128. **Johnson, F.W.A., B.A. Matheson, H. Williams, A.G. Laing, V. Jandial, R. Davidson-Lamb, G.J. Halliday, D. Hobson, S.Y. Wong, K.M. Hadley, M.A.J. Moffat & R. Postlethwaite (1985):** Abortion due to infection with *Chlamydia psittaci* in a sheep farmer's wife. *Brit. Med. J.* 290: 592-594.
129. **Jones, G.E. (1997):** Chlamydial disease--more than just abortion. *Vet. J.* 153(3): 249-251.
130. **Kahane, S., R. Gonen, C. Sayada, J. Elion & M.G. Friedman (1993):** Description and partial characterization of a new *Chlamydia*-like organism. *FEMS Microbiol.* 109: 329-334.
131. **Kahane, S., D. Greenberg, M.G. Friedman, H. Haikin & R. Dagan (1998):** High prevalence of "simkania Z", a novel *Chlamydia*-like bacterium, in infants with acute bronchiolitis. *J. Infect. Dis.* 177: 1425-1429.
132. **Kaleta, E.F. (1997):** Aktuelle Fragen der Diagnose und Bekämpfung der Psittakose. *Tierärztl. Umschau* 52: 36-44.
133. **Kaleta, E.F. & E.M. Taday (2003):** Avian host range of *Chlamydophila* spp. based on isolation, antigen detection and serology. *Avian Pathol.* 32(5): 435-461.
134. **Kaleta, E.F., M.E. Krautwald-Junghanns & T. Redmann (1998):** Psittacosis (chlamydiosis) of birds and the necessity of government disease control. *Tierärztl. Prax.* 26(4): 295-301.

135. **Kaltenboeck, B. & C. Wang (2005):** Advances in real-time PCR: application to clinical laboratory diagnostics. *Adv. Clin. Chem.* 40: 219-259.
136. **Kaltenboeck, B., D. Heard, F.J. Degraives & N. Schmeer (1997):** Use of synthetic antigens improves detection by enzyme-linked immunosorbent assay of antibodies against abortigenic *Chlamydia psittaci* in ruminants. *J. Clin. Microbiol.* 35 (9): 2293-2298.
137. **Kaltenboeck, B., H.R. Hehnen & A. Vaglenov (2005):** Bovine *Chlamydophila* spp. infection: do we underestimate the impact on fertility? *Vet. Res. Commun.* 1: 1-15.
138. **Kaltenboeck, B., K.G. Kousoulas & J. Storz (1991):** Detection and strain differentiation of *Chlamydia psittaci* mediated by a two-step polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 29(9): 1969-1975.
139. **Kaltenboeck, B., K.G. Kousoulas & J. Storz (1993):** Structures of and allelic diversity and relationships among the major outer membrane protein (*ompA*) genes of the four chlamydial species. *J. Bacteriol.* 175(2): 487-502.
140. **Kaltenboeck, B., N. Schmeer & R. Schneider (1997):** Evidence of numerous *ompA* alleles of porcine *Chlamydia trachomatis* and novel chlamydial species obtained by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 35(7): 1835-1841.
141. **Kampinga, G.A., F.P. Schroder, I.J. Visser, J.M. Anderson, D. Buxton & A.V. Moller (2000):** Lambing ewes as a source of severe psittacosis in a pregnant woman. *Ned. Tijdschr. Geneesk.* 144(52): 2500-2504.
142. **Kauffold, J., F. Melzer, K. Henning, K. Schulze, C. Leiding & K. Sachse (2006):** Prevalence of chlamydiae in boars and semen used for artificial insemination. *Theriogenology* 65(9): 1750-1758.
143. **Kauffold, J., K. Henning, R. Bachmann, H. Hotzel & F. Melzer (2006):** The prevalence of chlamydiae of bulls from six bull studs in Germany. *Anim. Reprod. Sci.* 102(1-2): 111-121.
144. **Krausse-Opatz, B., A. Busmann, H. Tammen, C. Menzel, T. Mohring, N.L. Yondre, C. Schmidt, P. Schulz-Knappe, H. Zeidler, H. Selle & L. Kohler (2007):** Peptidomic analysis of human peripheral monocytes

- persistently infected by *Chlamydia trachomatis*. Med. Microbiol. Immunol. 196(2): 103-114.
145. **Krüger-Hansen-Schoop, U. & G. Schoop (1966):** Über die Möglichkeit der Infektion eines Melkers mit Rinder-Miyagawanellen. Wien. Tierärztl. Monatsschr. 53: 23-28.
146. **Kuoppa, Y., J. Boman, L. Scott, U. Kumlin, I. Eriksson & A. Allard (2002):** Quantitative detection of respiratory *Chlamydia pneumoniae* infection by real-time PCR. J. Clin. Microbiol. 40: 2273–2274.
147. **Kutyavin, I.V., I.A. Afonina, A. Mills, V.V. Gorn, E.A. Lukhtanov, E.S. Belousov, M.J. Singer, D.K. Walburger, S.G. Lokhov, A.A. Gall, R. Dempcy, M.W. Reed, R.B. Meyer & J. Hedgpeth (2000):** 3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. Nucleic Acids Res. 28: 655–661.
148. **Lambrechts, N., J. Picard & R.C. Tustin (1999):** *Chlamydia*-induced septic polyarthritits in a dog. J. S. Afr. Vet. Assoc. 70(1): 40-42.
149. **Langdon, J.S., K. Elliott & B. MacKay (1991):** Epitheliocystis in the leafy sea-dragon. Aust. Vet. J. 68: 244.
150. **Lehnert, Ch. (1962):** Zur Frage der Übertragung des Ornithosevirus über das Brutei bei Enten. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 75: 151-152.
151. **Lieberman, D., S. Kahane & M.G. Friedman (1997):** Pneumonia with serological evidence of acute infection with the *Chlamydia*-like microorganism "Z". Am. J. Respir. Crit. Care Med. 156: 578–582.
152. **Lierz, M., T. Göbel & F. Kaleta (2002):** Vorkommen von *Chlamydophila psittaci*, Falkenherpesvirus und Paramyxovirus 1 bei geschwächt oder verletzt aufgefundenen Greifvögeln und Eulen. Tierärztl. Praxis 30 (K): 139-144.
153. **Lipman, N.S., L.L. Yan & J.C. Murphy (1994):** Probable transmission of *Chlamydia psittaci* from a macaw to a cat. J. Am. Vet. Med. Assoc. 204(9): 1479-1480.

154. **Locatelli, G., F. Santoro, F. Veglia, P.A. Gobbi, A. Lusso & M.S. Malnati (2000):** Real-time quantitative PCR for human Herpesvirus 6 DNA. *J. Clin. Microbiol.* 38 (11): 4042-4048.
155. **Löbau, S., U. Mamat, W. Brabetz & H. Brade (1995):** Molecular cloning, sequence analysis, and functional characterization of the lipopolysaccharid biosynthetic gene *kdtA* encoding 3-deoxy-alpha-D-manno-octulosonic acid transferase of *Chlamydia pneumoniae* strain TW-184. *Mol. Microbiol.* 18: 391-399.
156. **Longbottom, D., S. Fairley, S. Chapman, E. Psarrou, E. Vretou & M. Livingstone (2002):** Serological diagnosis of ovine enzootic abortion by enzyme-linked immunosorbent assay with a recombinant protein fragment of the polymorphic outer membrane protein POMP90 of *Chlamydia abortus*. *J. Clin. Microbiol.* 40(11): 4235-4243.
157. **Lublin, A., G. Shudari, S. Mechani & Y. Weisman (1996):** Egg transmission of *Chlamydia psittaci* in turkeys. *Vet. Rec.* 139(12): 300.
158. **Lutz-Wohlgroth, L., A. Becker, E. Brugnera, Z.L. Huat, D. Zimmermann, F. Grimm, M. Haessig, G. Greub, S. Kaps, B. Spiess, A. Pospischil & L. Vaughan (2006):** Chlamydiales in guinea-pigs and their zoonotic potential. *J. Vet. Med. A. Physiol. Pathol. Clin. Med.* 53(4): 185-193.
159. **Mahony, J.B., S. Chong, B.K. Coombes, M. Smieja & A. Petrich (2000):** Analytical sensitivity, reproducibility of results, and clinical performance of five PCR assays for detecting *Chlamydia pneumoniae* in peripheral blood mononuclear cells. *J. Clin. Microbiol.* 38(7): 2622-2627.
160. **Mair, T.S. & J.M. Wills (1992):** *Chlamydia psittaci* infection in horses: results of a prevalence survey and experimental challenge. *Vet. Rec.* 130(19): 417-419.
161. **Manke, H., R. Müller, M. Huke & P. Lederer (2000):** Ornithoseausbruch in einer Geflügelschlachtere: Erkenntnisse für den Arbeitsschutz. *Arbeitsmed./ Sozialmed./ Umweltmed.* 35: 120-124.
162. **Martinov, S., G. Popov & M. Panova (1981):** Chlamydial polyarthritis in calves. *Vet. Med. Nauki.* 18(3): 83-91.

163. **Matsumoto, A. & G. P. Manire (1970):** Electron microscopic observations on the effects of penicillin on the morphology of *Chlamydia psittaci*. J. Bacteriol. 101: 278–285.
164. **Mc Chesney, S.L., J.J. England & A.E. McChesney (1982):** *Chlamydia psittaci* induced pneumonia in a horse. Cornell Vet. 72(1): 92-97.
165. **Mc Donald, M., B.J. Willett, O. Jarrett & D.D. Addie (1998):** A comparison of DNA amplification, isolation and serology for the detection of *Chlamydia psittaci* infection in cats. Vet. Rec. 143(4): 97-101.
166. **Menard, A., M. Clerc, A. Subtil, F. Megraud, C. Bebear & B. de Barbeyrac (2006):** Development of a real-time PCR for the detection of *Chlamydia psittaci*. J. Med. Microbiol. 55(4): 471-473.
167. **Meyer, K.F. (1941):** Phagocytosis and immunity in psittacosis. Schw. Med. Wochenschr. 71: 436-438.
168. **Meyer, K.F. (1967):** The host spectrum of Psittacosis-Lymphogranuloma venerum (PL) agents. Am. J. Ophthalmol. 63: 1225-1246.
169. **Meyer, K.F. & B. Eddie (1933):** Latente Psittakoseinfektion bei Sittichen. Zschr. Infektkrankh. d. Haustiere 44: 237-242.
170. **Mitchell, S.L., B.J. Wolff, W.L. Thacker, P.G. Ciembor, C.R. Gregory, K.D. Everett, B.W. Ritchie & J.M. Winchell (2009):** Genotyping of *Chlamydophila psittaci* by real-time PCR and high-resolution melt analysis. J. Clin. Microbiol. 47(1): 175-181.
171. **Mochizuki, M., K. Kawakami, M. Hashimoto & T. Ishida (2000):** Recent epidemiological status of feline upper respiratory infections in Japan. J. Vet. Med. Sci. 62(7): 801-803.
172. **Moulder, J.W. (1991):** Interaction of chlamydiae and host cells in vitro. Microbiol. Rev. 55(1): 143-190.
173. **Munro, R. & A.R. Hunter (1981):** Infection of lambs by orally administered ovine abortion strain of *Chlamydia psittaci*. Vet. Rec. 109(25-26): 562-563.

174. **Mutschmann, F. (1998):** Erkrankungen der Amphibien. Paul Parey Verlag, Berlin und Hamburg: 241-242.
175. **Mutschmann, F. (1998):** Nachweis von *Chlamydia psittaci*-Infektionen bei Amphibien mittels eines spezifischen Immunfluoreszenztests. Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. 111: 187-189.
176. **Nationales Referenzlabor für Psittakose des Friedrich-Loeffler-Instituts in Jena (2006):** Bedeutung der Chlamydien als Krankheitserreger - Zoonotisches Potential. www.fli.bund.de/122.html.
177. **Newhall, W.J., R.E. Johnson, S. Delisle & D. Fine (1999):** Head-to-head evaluation of five chlamydia tests relative to a quality-assured culture standard. J. Clin. Microbiol. 37(3): 681-685.
178. **Newman, C.P., S.R. Palmer, F.D. Kirby & E.O. Caul (1992):** A prolonged outbreak of ornithosis in duck processors. Epidemiol. Infect. 108: 203–210.
179. **Nietfeld, J.C. (2001):** Chlamydial infections in small ruminants. Vet. Clin. North. Am. Food. Anim. Pract. 17(2): 301-314.
180. **Nigg, C. (1942):** Unidentified virus which produces pneumoniae and systemic infection in mice. Science 95: 49.
181. **Nowak, B.F. & S.E. LaPatra (2006):** Epitheliocystis in fish. J. Fish. Dis. 29(10): 573-588.
182. **Nüchter, H., K. Sachse & E.F. Kaleta (2004):** Die Aviäre Chlamydiose und ihre Bekämpfung in der Europäischen Union. Amtstierärztlicher Dienst und Lebensmittelkontrolle 11. Jahrgang-2.
183. **Osaki, H. (1973):** Electron microscopic observations of *Chlamydia*-like microorganisms in hepatopancreas cells of the spider, *Coelotes luctuosus*. Acta Arachnol. 25: 23.
184. **Ossewaarde, J.M. & A. Meijer (1999):** Molecular evidence for the existence of additional members of the order Chlamydiales. Microbiology 145: 411–417.

185. **Page, L.A. (1966):** Revision of the family Chlamydiaceae Rake: Unification of genus *Chlamydia* Jones, Rake and Stearns, 1945. Int. J. Syst. Bacteriol. 16: 223-253.
186. **Page, L.A. (1968):** Proposal for the recognition of two species in the genus *Chlamydia* Jones, Rake and Stearns, 1945. Int. J. Syst. Bacteriol. 18: 51-66.
187. **Papp, J.R., P.E. Shewen & C.J. Gartley (1993):** *Chlamydia psittaci* infection and associated infertility in sheep. Can. J. Vet. Res. 57(3): 185-189.
188. **Papp, J.R., P.E. Shewen & C.J. Gartley (1994):** Abortion and subsequent excretion of chlamydiae from the reproductive tract of sheep during estrus. Infect. Immun. 62(9): 3786-3792.
189. **Papp, J.R. & P.E. Shewen (1997):** *Chlamydia psittaci* infection in sheep: a paradigm for human reproductive tract infection. J. Reprod. Immunol. 34: 185-202.
190. **Pelletier, C., S. Chartier, J. Berthillier , E. Dégletagne, C. Rigaud, H. Berthet, A. Valognes, A. Reynaud & P. Véry (2006):** Validation of an internal method for the diagnosis of infections with *Chlamydophila abortus* and *Coxiella burnetii* by real-time multiplex PCR. Dev. Biol. (Basel) 126: 219-226.
191. **Perfettini, J.L., T. Darville, A. Dautry-Varsat, R.G. Rank & D.M. Ojcius (2002):** Inhibition of apoptosis by gamma interferon in cells and mice infected with *Chlamydia muridarum* (the mouse pneumonitis strain of *Chlamydia trachomatis*). Infect. Immun. 70(5): 2559-2565.
192. **Persson, K., K. Hamby & L.A. Ugozzoli (2005):** Four-color multiplex reverse transcription polymerase chain reaction-Overcoming its limitations. Anal. Biochem. 344: 33-42.
193. **Pollard, D.R., S.D. Tyler, C.W. Ng & K.R. Rozee (1989):** A polymerase chain reaction (PCR) protocol for the specific detection of *Chlamydia* spp. Mol. Cell. Probes 3: 383-389.

194. **Pospischil, A. (2007):** Historisches zu chlamydienbedingten Erkrankungen bei Mensch und Tier. 5. Deutscher Chlamydienworkshop Hannover (7.-9. März).
195. **Pospischil, A., R. Thoma, M. Hilbe, P. Grest, D. Zimmermann & J.O. Gebbers (2002):** Abortion in humans caused by *Chlamydophila abortus* (*Chlamydia psittaci* serovar1). Schweiz. Arch. Tierheilkd. 144(9): 463-466.
196. **Pospischil, A., R. Thoma, M. Hilbe, P. Grest & J.O. Gebbers (2002):** Abortion in woman caused by caprine *Chlamydophila abortus* (*Chlamydia psittaci* serovar 1). Swiss. Med. Wkly. 132(5-6): 64-66.
197. **Pospischil, A., R. Thoma, W. von Bomhard, K. Reitt, J. Cantieni, D. Zimmermann & A. Polkinghorne (2002):** Abortion in cattle caused by *Chlamydia psittaci*. Schweiz. Arch. Tierheilkd. 144(9): 467-472.
198. **Pospisil, L., Z. Veznik, M. Hirt, D. Svecova, I. Diblikova & M. Pejcoch (1996):** Detection of chlamydia in the intestines and lungs in pigeons and humans. Epidemiol. Mikrobiol. Imunol. 45(3): 123-126.
199. **Pudjiasmoko, H. Fukushi, Y. Ochiai, T. Yamaguchi & K. Hirai (1997):** Phylogenetic analysis of the genus *Chlamydia* based on 16S rRNA gene sequences. Int. J. Syst. Bacteriol. 47(2): 425-431.
200. **Quinlan, J.F. & P.K McGuckin (1999):** Chlamydial abortion in a sheep flock: a case report. Irish. Vet. J. 52: 668-670.
201. **Rake, G.W. (1957):** Family II. Chlamydiaceae Rake, Fam. Nov., p. 957–968. In: R. S. Breed, E. G. D. Murray, and N. R. Smith (ed.), Bergey's manual of systematic bacteriology, 7th ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, Md.
202. **Ramsey, D.T. (2000):** Feline chlamydia and calicivirus infections. Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract. 30(5): 1015-1028.
203. **Rank, R.G., H.J. White, A.J. Jr. Hough, J.N. Pasley & A.L. Barron (1982):** Effect of estradiol on chlamydial genital infection of female guinea pigs. Infect. Immun. 38(2): 699-705.

204. **Rank, R.G., H.J. White, B.L. Soloff & A.L. Barron (1981):** Cystitis associated with chlamydial infection of the genital tract in male guinea pigs. *Sex. Transm. Dis.* 8(3): 203-210.
205. **Raulston, J. E. (1997):** Response of *Chlamydia trachomatis* serovar E to iron restriction in vitro and evidence for iron-regulated chlamydial proteins. *Infect. Immun.* 65: 4539–4547.
206. **Reinhold, P. & K. Sachse (2004):** Chlamydia infections in animals. *Pneumologie* 58(4): 278-280.
207. **Reinhold, P., J. Jaeger, F. Melzer & K. Sachse (2005):** Evaluation of lung function in pigs either experimentally or naturally infected with Chlamydiaceae. *Vet. Res. Commun.* 1: 125-150.
208. **Reischl, U., N. Lehn, U. Simnacher, R. Marre & A. Essig (2003):** Rapid and standardized detection of *Chlamydia pneumoniae* using LightCycler real-time fluorescence PCR. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 22: 54-57.
209. **Ritter, J. (1879):** Beitrag zur Frage des Pneumothypus (Eine Hausepidemie in Uster (Schweiz) betreffend). *Deutsch. Arch. Klin. Med.* 25: 53-55.
210. **Robert Koch-Institut, Berlin (2008):** Infektionsepidemiologisches Jahrbuch für 2007.
211. **Robertson, T., S. Bibby, D. O'Rourke, T. Belfiore, H. Lambie & A.H. Noormohammadi (2009):** Characterization of Chlamydiaceae species using PCR and high resolution melt curve analysis of the 16S rRNA gene. *J. Appl. Microbiol.* 107(6): 2017-2028.
212. **Rodolakis, A., C. Boulet & A. Souriau (1984):** *Chlamydia psittaci* experimental abortion in goats. *Am. J. Vet. Res.* 45(10): 2086-2089.
213. **Rogers, D.G., A.A. Andersen, A. Hogg, D.L. Nielsen & M.A. Huebert (1993):** Conjunctivitis and keratoconjunctivitis associated with chlamydiae in swine. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 203(9): 1321-1323.
214. **Rogers, D.G., A.A. Andersen & B.D. Hunsaker (1996):** Lung and nasal lesions caused by a swine chlamydial isolate in gnotobiotic pigs. *Vet. Diagn. Invest.* 8(1): 45-55.

215. **Rurangirwa, F.R., P.M. Dilbeck, T.B. Crawford, T.C. McGuire & T.F. McElwain (1999):** Analysis of the 16S rRNA gene of micro-organism WSU 86-1044 from an aborted bovine foetus reveals that it is a member of the order Chlamydiales: proposal of Waddliaceae fam. nov., *Waddlia chondrophila* gen. nov., sp. Nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 49: 577-581.
216. **Sachse, K., H. Hotzel, P. Slickers, T. Ellinger & R. Ehricht (2004):** DNA microarray-based detection and identification of *Chlamydia* and *Chlamydophila* spp. Mol. Cell. Probes 19(1): 41-50.
217. **Sachse, K. & E. Grossmann (2002):** Chlamydial diseases of domestic animals-zoonotic potential of the agents and diagnostic issues. Dtsch. Tierärztl. Wschr. 109: 142-148.
218. **Sachse, K., E. Grossmann, A. Berndt, C. Schutt, K. Henning, D. Theegarten, O. Anhenn & P. Reinhold (2004):** Respiratory chlamydial infection based on experimental aerosol challenge of pigs with *Chlamydia suis*. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 27(1): 7-23.
219. **Sako, T., T. Takahashi, K. Takehana, E. Uchida, T. Nakade, T. Umemura & H. Taniyama (2002):** Chlamydial infection in canine atherosclerotic lesions. Atherosclerosis 162(2): 253-259.
220. **Sayada, C., A.A. Andersen, C. Storey, A. Milon, F. Eb, N. Hashimoto, K. Hirai, J. Elion & E. Denamur (1995):** Usefulness of *ompA* restriction mapping for avian *Chlamydia psittaci* isolate differentiation. Res. Microbiol. 146(2): 155-165.
221. **Schachter, J., H.B. Ostler & K.F. Meyer (1969):** Human infection with the agent of feline pneumonitis. Lancet 1(7605): 1063-1065.
222. **Schachter, J. & H.D. Caldwell (1980):** Chlamydiae. Annu. Rev. Microbiol. 34: 285-309.
223. **Schiller, I., R. Koesters, R. Weilenmann, R. Thoma, B. Kaltenboeck, P. Heitz & A. Pospischil (1997):** Mixed infections with porcine *Chlamydia trachomatis/pecorum* and infections with ruminant *Chlamydia psittaci* serovar 1 associated with abortions in swine. Vet. Microbiol. 58(2-4): 251-260.

224. **Schmeer, N., G.J. Jahn, A.A. Bialasiewicz & A. Weber (1987):** Die Katze als mögliche Infektionsquelle für *Chlamydia psittaci*-bedingte Keratokonjunktivitis beim Menschen. Tierärztl. Prax. 15: 201-204.
225. **Schmeer, N., K.L. Schnorr, J.A. Perez-Martinez & J. Storz (1987):** Dominance of *Chlamydia psittaci*-specific IgG2 subclass in the humoral immune responses of naturally and experimentally infected cattle. Vet. Immunopathol. 15(4): 311-322.
226. **Schneider, W. (1989):** Titration of *Coxiella burnetii* in Buffalo green monkey (BGM) cell cultures. Zentralbl. Bakteriol. 271(1): 77-84.
227. **Scientific committee on animal health and animal welfare (2002):** Avian chlamydiosis as a zoonotic risk and reduction strategies. Brussels: European Commission, Health and Consumer Protection Directorate-General. Report no. SANCO/AH/R26/2002.
228. **Solomon, A.W., M.J. Holland, M.J. Burton, S.K. West, N.D. Alexander, A. Aguirre, P.A. Massae, H. Mkocho, B. Munoz, G.J. Johnson, R.W. Peeling, R.L. Bailey, A. Foster & D.C. Mabey (2003):** Strategies for control of trachoma: observational study with quantitative PCR. Lancet 362: 198–204.
229. **Stephens, R.S., R. Sanchez-Pescador, E.A. Wagar, C. Inouye & M.S. Urdea (1987):** Diversity of *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein genes. J. Bacteriol. 169: 3879-3885.
230. **Sting, R., E. Lerke, H. Hotzel, S. Jodas, C. Popp & H.M. Hafez (2006):** Vergleichende Untersuchungen zum Nachweis von *Chlamydophila psittaci* und *abortus* bei Putenmastbetrieben mittels Zellkultur, ELISA und PCR. Dtsch. Tierärztl. Wschr. 113: 50-54.
231. **Sting, R. & J. Mandl (1995):** Antigennachweis von *Chlamydia psittaci* aus Genitalsekreten und der Milch von Kühen sowie blutserologische Untersuchungen. Tierärztl. Umschau 50: 167-175.
232. **Storz, J. & H. Krauss (1985):** *Chlamydia*. In: Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren. Hrsg. H. Blobel & T. Schliesser. Gustav Fischer Verlag Stuttgart, New York, Band V: 447-531.

233. **Storz, J. & L.A. Page (1971):** 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. 21: 332-334.
234. **Storz, J., J.L. Shupe, R.A. Smart & R.W. Thornley (1966):** Polyarthrititis of calves: experimental induction by a psittacosis agent. Am. J. Vet. Res. 27(119): 987-995.
235. **Strik, N.I., A.R. Alleman & J.F. Wellehan (2005):** Conjunctival swab cytology from a guinea pig: it's elementary! Vet. Clin. Pathol. 34(2): 169-171.
236. **Szeredi, L., H. Hotzel & K. Sachse (2005):** High prevalence of chlamydial (*Chlamydophila psittaci*) infection in fetal membranes of aborted equine fetuses. Vet. Res. Commun. 1: 37-49.
237. **Szeredi, L., I. Schiller, T. Sydler, F. Guscelli, E. Heinen, L. Corboz, E. Eggenberger, G.E. Jones & A. Pospischil (1996):** Intestinal *Chlamydia* in finishing pigs. Vet. Pathol. 33(4): 369-374.
238. **Szeredi, L., S. Jánosi, M. Tenk, L. Tekes, M. Bozsó, Z. Deim & T. Molnár (2006):** Epidemiological and pathological study on the causes of abortion in sheep and goats in Hungary (1998-2005). Acta Vet. Hung. 54(4): 503-515.
239. **Sykes, J.E. (2005):** Feline chlamydiosis. Clin. Tech. Small Anim. Pract. 20(2): 129-134.
240. **Sykes, J.E., G.A. Anderson, V.P. Studdert & G.F. Browning (1999):** Prevalence of feline *Chlamydia psittaci* and feline herpesvirus 1 in cats with upper respiratory tract disease. J. Vet. Intern. Med. 13(3): 153-162.
241. **Sykes, J.E., J.L. Allen, V.P. Studdert & G.F. Browning (2001):** Detection of feline calicivirus, feline herpesvirus 1 and *Chlamydia psittaci* mucosal swabs by multiplex RT-PCR/PCR. Vet. Microbiol. 81: 95-108.
242. **Takahashi, T., I. Takashima & N. Hashimoto (1988):** Shedding and transmission of *Chlamydia psittaci* in experimentally infected chickens. Avian Dis. 32(4): 650-658.

243. **Takahashi, T., M. Masuda, T. Tsuruno, Y. Mori, I. Takashima, T. Hiramune & N. Kikuchi (1997):** Phylogenetic analysis of *Chlamydia psittaci* strains from birds based on 16S rRNA gene sequence. *J. Clin. Microbiol.* 35(11): 2908-2914.
244. **Tanaka, C., T. Miyazawa, M. Watarai & N. Ishiguro (2005):** Bacteriological survey of feces from feral pigeons in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 67(9): 951-953.
245. **Tappe, J.P., A.A. Andersen & N.F. Cheville (1989):** Respiratory and pericardial lesions in turkeys infected with avian or mammalian strains of *Chlamydia psittaci*. *Vet. Pathol.* 26(5): 386-395.
246. **Teankum, K., A. Pospischil, F. Janett, E. Burgi, E. Brugnera, K. Hoelzle, A. Polkinghorne, R. Weilenmann, D.R. Zimmermann & N. Borel (2006):** Detection of chlamydiae in boar semen and genital tracts. *Vet. Microbiol.* 116(1-3): 149-157.
247. **Teankum, K., A. Pospischil, F. Janett, E. Brugnera, L.E. Hoelzle, K. Hoelzle, R. Weilenmann, D.R. Zimmermann, A. Gerber, A. Polkinghorne & N. Borel (2007):** Prevalence of chlamydiae in semen and genital tracts of bulls, rams and bucks. *Theriogenology* 67(2): 303-310.
248. **Thylefors, B., A.D. Negrel, R. Pararajasegaram & K.Y. Dadzie, (1995):** Global data on blindness. *Bulletin of the World Health Organisation* 73: 115-121.
249. **Tondella, M.L., D.F. Talkington, B.P. Holloway, S.F. Dowell, K. Cowley, M. Soriano- Gabarro, M.S. Elkind & B.S. Fields (2002):** Development and evaluation of real-time PCR based fluorescence assays for detection of *Chlamydia pneumoniae*. *J. Clin. Microbiol.* 40: 575–583.
250. **Travnicek, M., S. Mardzinova, L. Cislakova, L. Valocky & T. Weissova (2002):** Chlamydial infection of cats and human health. *Folia microbiol. (Praha)*. 47(4): 441-444.
251. **Travnicek, M., L. Cislakova, W. Deptula, M. Stosik & M.R. Bhide (2002):** Wild pigeons and pheasants- a source of *Chlamydophila psittaci* for humans and animals. *Ann. Agric. Environ. Med.* 9(2): 253-255.

252. **Twomey, D.F., P.C. Griffiths, M.W. Horigan, B.C. Hignett & T.P. Martin (2006):** An investigation into the role of *Chlamydophila* spp. in bovine upper respiratory tract disease. *Vet. J.* 171(3): 574-576.
253. **Tyczka, J. & C. Jäger (2002):** Molekulare Typisierung von 76 *Chlamydophila*- Isolaten vom Wiederkäuer mittels PCR-RFLP. *Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.* 109(10): 449.
254. **Van der Bruggen, T., J.A. Kaan, E.R. Heddema, E.J. van Hannen & B.M. de Jongh (2008):** Rapid diagnosis of psittacosis using a recently developed real-time PCR technique. *Ned Tijdschr Geneeskd.* 152(34): 1886-1888.
255. **Van Loock, M., D. Vanrompay, B. Herrmann, J. Vander Stappen, G. Volckaert, B.M. Goddeeris & K.D. Everett (2003):** Missing links in the divergence of *Chlamydophila abortus* from *Chlamydophila psittaci*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53(3): 761-770.
256. **Vanrompay, D., A.A. Andersen, R. Ducatelle & F. Haesebrouck (1993):** Serotyping of European isolates of *Chlamydia psittaci* from poultry and other birds. *J. Clin. Microbiol.* 31(1): 134-137.
257. **Vanrompay, D., A. Van Nerom, R. Ducatelle & F. Haesebrouck (1994):** Evaluation of five immunoassays for detection of *Chlamydia psittaci* in cloacal and conjunctival specimens from turkeys. *J. Clin. Microbiol.* 32(6): 1470-1474.
258. **Vanrompay, D., P. Butaye, C. Sayada, R. Ducatelle & F. Haesebrouck (1997):** Characterization of avian *Chlamydia psittaci* strains using *ompA* restriction mapping and serovar-specific monoclonal antibodies. *Res. Microbiol.* 148(4): 327-333.
259. **Vanrompay, D., P. Butaye, A. Van Nerom, R. Ducatelle & F. Haesebrouck (1997):** The prevalence of *Chlamydia psittaci* infections in Belgian commercial turkey poults. *Vet. Microbiol.* 54(1): 85-93.
260. **Vanrompay, D., R. Ducatelle & F. Haesebrouck (1992):** Diagnosis of avian chlamydiosis: specificity of the modified Gimenez staining on smears and comparison of the sensitivity of isolation in eggs and three different cell cultures. *J. Vet. Med. B.* 39: 105-112.

261. **Vanrompay, D., R. Ducatelle, F. Haesebrouck & W. Hendrickx (1993):** Primary pathogenicity of an European isolate of *Chlamydia psittaci* from turkey poult. Vet. Microbiol. 38(1-2): 103-115.
262. **Vanrompay, D., R. Ducatelle & F. Haesebrouck (1995):** *Chlamydia psittaci* infections: a review with emphasis on avian chlamydiosis. Vet. Microbiol. 45(2-3): 93-119.
263. **Vanrompay, D., T. Geens, A. Desplanques, T.Q. Hoang, L. De Vos, M. Van Loock, E. Huyck, C. Mirry & E. Cox (2004):** Immunoblotting, ELISA and culture evidence for Chlamydiaceae in sows on 258 Belgian farms. Vet. Microbiol. 99(1): 59-66.
264. **Vanrompay, D., T. Harkinezhad, M. van de Walle, D. Beeckman, C. van Droogenbroeck, K. Verminnen, R. Leten, A. Martel & K. Cauwerts (2007):** *Chlamydophila psittaci* transmission from pet birds to humans. Emerg. Infect. Dis. 13: 1108-1110.
265. **Vanrompay, D., W. De Meurichy, R. Ducatelle & F. Haesebrouck (1994):** Pneumonia in Moorish tortoises (*Testudo graeca*) associated with avian serovar A *Chlamydia psittaci*. Vet. Rec. 135(12): 284-285.
266. **Verminnen, K., M. Van Loock, H.M. Hafez, R. Ducatelle, F. Haesebrouck & D. Vanrompay (2006):** Evaluation of a recombinant enzyme-linked immunosorbent assay for detecting *Chlamydophila psittaci* antibodies in turkey sera. Vet. Res. 37(4): 623-632.
267. **Veznik, Z., D. Svecova, L. Pospisil & I. Diblikova (1996):** Detection of chlamydiae in animal and human semen using direct immunofluorescence. Vet. Med. (Praha). 41(7): 201-206.
268. **Viciano, P., J.M. Bozada, V. Martin-Sanz, F. Martinez-Marcos, A. Martin & J. Pachon (1993):** Psittacosis of avian origin as etiology of community-acquired pneumonia with severe onset. Rev. Clin. Esp. 192(1): 28-30.
269. **Villemonteix, P., G. Agius, B. Ducroz, J. Rouffineau, V. Plocoste, M. Castets & G. Magnin (1990):** Pregnancy complicated by severe *Chlamydia psittaci* infection acquired from a goat flock: a case report. Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. 37(1): 91-94.

270. **Von Bomhard, W., A. Polkinghorne, Z.H. Lu, L. Vaughan, A. Vogtlin, D.R. Zimmermann, B. Spiess & A. Pospischil (2003):** Detection of novel chlamydiae in cats with ocular disease. *Am. J. Vet. Res.* 64(11): 1421-1428.
271. **Wachendorfer, G. & W. Lohrbach (1982):** Säugetier Chlamydien. *Munch. Med. Wochenschr.* 124(6): 127-130.
272. **Walder, G., H. Hotzel, C. Brezinka, W. Gritsch, R. Tauber, R. Wurzner & F. Ploner (2005):** An unusual cause of sepsis during pregnancy: recognizing infection with *Chlamydophila abortus*. *Obstet. Gynecol.* 106(5 Pt 2): 1215-1217.
273. **Walder, G., W. Gritsch, C.J. Wiedermann, G. Polzl, G. Laufer, H. Hotzel, A. Berndt, S. Pankuweit, D. Theegarten, O. Anhenn, A. Oehme, M.P. Dierich & R. Wurzner (2007):** Co-infection with two *Chlamydophila* species in a case of fulminant myocarditis. *Crit. Care Med.* 35(2): 623-626.
274. **Ward, M.E. (1983):** Chlamydial classification, development and structure. *Br. Med. Bull.* 39(2): 109-115.
275. **Welti, M., K. Jatou, M. Altwegg, R. Sahli, A. Wenger & J. Bille (2003):** Development of a multiplex real-time quantitative PCR assay to detect *Chlamydia pneumoniae*, *Legionella pneumophila* and *Mycoplasma pneumoniae* in respiratory tract secretions. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 45: 85–95.
276. **Werth, D., N. Schmeer, H.P. Muller, M. Karo & H. Krauss (1987):** Demonstration of antibodies against *Chlamydia psittaci* and *Coxiella burnetii* in dogs and cats: comparison of the enzyme immunoassay, immunoperoxidase technic, complement fixation test and agar gel precipitation test. *Zentralbl. Veterinarmed. B* 34(3): 165-176.
277. **Wilsmore, A.J. (1989):** *Chlamydia* in ovine milk. *Vet. Rec.* 124(23): 618-9.
278. **Wilt, P.C., N. Kordova & J.C. Wilt (1972):** Preliminary characterization of a chlamydial agent isolated from embryonated snow goose eggs in northern Canada. *Can. J. Microbiol.* 18: 1327-1332.

279. **Wittenbrink, M.M., H.A. Schoon, D. Schoon, R. Mansfeld & W. Bisping (1993):** Endometritis in cattle experimentally induced by *Chlamydia psittaci*. Zentralbl. Veterinarmed. B 40(6): 437-450.
280. **Wittenbrink, M.M., U. Peter & W. Bisping (1987):** Untersuchungen zum Vorkommen latenter Darminfektionen mit *Chlamydia psittaci* bei Rindern. Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. 100: 377-381.
281. **Wittenbrink, M.M., M. Mrozek & W. Bisping (1993):** Isolation of *Chlamydia psittaci* from a chicken egg: evidence of egg transmission. Zentralbl. Veterinarmed. B 40(6): 451-452.
282. **Wittenbrink, M.M., X. Wen, N. Bohmer, G. Amtsberg & A. Binder (1991):** Bacteriologic studies of the occurrence of *Chlamydia psittaci* in organs of swine and in aborted swine fetuses. Zentralbl. Veterinarmed. B 38(6): 411-420.
283. **Wong, S.Y., E.S. Gray, D. Buxton, J. Finlayson & F.W. Johnson (1985):** Acute placentitis and spontaneous abortion caused by *Chlamydia psittaci* of sheep origin: a histological and ultrastructural study. J. Clin. Pathol. 38(6): 707-711.
284. **Yan, C., H. Fukushi, H. Matsudate, K. Ishihara, K. Yasuda, H. Kitagawa, T. Yamaguchi & K. Hirai (2000):** Seroepidemiological investigation of feline chlamydiosis in cats and humans in Japan. Microbiol. Immunol. 44(3): 155-160.
285. **Yang, J.M., H.X. Liu, Y.X. Hao, C. He & D.M. Zhao (2006):** Development of a rapid real-time PCR assay for detection and quantification of four familiar species of Chlamydiaceae. J. Clin. Virol. 36(1): 79-81.
286. **Zhang, Y.X., J.G. Fox, Y. Ho, L. Zhang, H.F.Jr. Stills & T.F. Smith (1993):** Comparison of the major outer-membrane protein (MOMP) gene of mouse pneumonitis (MoPn) and hamster SFPD strains of *Chlamydia trachomatis* with other *Chlamydia* strains. Mol. Biol. Evol. 10(6): 1327-1342.

ANHANG

Tabelle 34: Liste der am Ringversuch teilnehmenden Einrichtungen

Teilnehmer	Teilnehmer
Nr.	
1	Bayrisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Oberschleißheim
2	Vet Med Labor GmbH, Division of IDEXX Laboratories, Ludwigsburg
3	Friedrich-Loeffler-Institut, Institut für bakterielle Infektionen und Zoonosen, Jena
4	Landesamt für Verbraucherschutz Sachsen-Anhalt, Fachbereich Veterinärmedizin, Stendal
5	Staatliches Veterinäruntersuchungsamt Arnsberg
6	Landesuntersuchungsanstalt für das Gesundheits- und Veterinärwesen Sachsen, Leipzig
7	Landesbetrieb Hessisches Landeslabor, Kassel
8	Berliner Betrieb für Zentrale Gesundheitliche Aufgaben-ILAT
9	Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, LAVES – Veterinärinstitut Hannover
10	Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern, Rostock
11	Landeslabor Schleswig-Holstein (Lebensmittel-, Veterinär- und Umweltuntersuchungsamt), Neumünster
12	Landesuntersuchungsamt Rheinland Pfalz, Koblenz
13	Staatliches Tierärztliches Untersuchungsamt Aulendorf-Diagnostikzentrum
14	Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Stuttgart
15	Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Erlangen
16	Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Karlsruhe

Cp. ps. 4MOMP	414	ATTAATCGATGG	ACTATGTGGGAAGGTGCTTCA	GGAGATCCTTGCGATCCTTGC	GCTAC
Cp. ps. 98AV2129. ompA	99
Cp. ps. 6BC. MOMP	418
Cp. ps. 6BcompA	165
Cp. ps. MN. Zhang. ompA	327
Cp. ps. 3MOMP	312
Cp. ps. ompA	312
Cp. ps. clone1. ompA	1	-----	-----	-----	-----
Cp. ps. clone14. OmpA	1	-----	-----	-----	-----
Cp. ps. MN. ompA	39
Cp. ps. MNOs. ompA	78
Cp. ps. MNRh. ompA	84
Cp. ps. CP3. ompA	99
Cp. ps. 84-55	99
Cp. ps. MOMP	99
Cp. ps. M56. ompA	99	T	T
Cp. a. pmSH1ompA	99	T	T
Cp. a. pm234ompA	99	T	T
Cp. a. pm225ompA	99	T	T
Cp. a. clone4OmpA	1	-----	-----	-----	-----
Cp. a. LW508precompA	1	-----	-----	T	T
Cp. a. ompA	240	T	T
Cp. a. B577ompA	178	T	T
Cp. a. OCLH196ompA	99	T	T
Cp. a. precuOmpA	99	T	T
Cp. ps. ompA84/2334	99	T	T
Cp. ps. VS225. ompA	90
Cp. ps. GD. ompA	99	T	T
Cp. ps. CT1. ompA	90	T	T
Cp. ps. 2MOMP	99	T	T
Cp. ps. part. ompA	1	-----	-----	-----	-----
Cp. ps. TT3. ompA	99
Cp. ps. NJ1. ompA	93
Cp. ps. 92-1293	99	T
Cp. ps. WC. ompA	84
Cp. f. FPCelloompA	99	T
Cp. f. MOMP	217	C	T
Cp. c. GPICompA	327	T	C
Cp. p. ompALW613	102	A. G. A.	ATG	A. T
Cp. p. precu. ompA	80	G. G. A.	ATG	A. T
Cp. p. MOMP	33	A. G. A.	ATG	A. T
Cp. p. 3. omp	1	-----	-----	-----	A. T
Cp. p. 4. omp	1	-----	-----	ATG	A. T
C. s. 32XIIompA	2	TA. G. T. C. G. T. C. T.	TT. GGC. T.	A. A.
C. s. 13VIIompA	1	-----	T	TT. GGC.	C. A. A.
C. s. 2VompA	1	-----	TT. GGC. C.	C. A. A.
C. s. R22ompA	75	TA. G. T. C. G. T. C. T.	TT. GGC. C.	C. A. A.
C. s. omp	1	-----	-----	-----	-----
C. s. H7ompA	78	TA. G. T. C. G. T. C. T.	TT. GGC. C.	A. A.
C. s. R27ompA	87	TA. G. T. C. G. T. C. T.	TT. GGC. T.	C. A. A.
C. s. R130ompA	66	TA. G. T. C. G. T. C. T.	TT. GGT. T.	C. A. A.
C. s. R24ompA	75	TA. G. T. C. G. T. C. T.	TT. GGC.	T. C. A.
C. s. 14VompA	32	TA. G. T. C. G. T. C. T.	TT. GGC. T.	A. A.
C. s. pmd1340ompA	99	TA. G. T. C. G. T. C. T.	TT. GGT. T.	C. TA. A.
C. s. ompApm39	99	TA. G. T. C. G. T. C. T.	TT. GGC.	T. C. A.

Abbildung 17 (Legende und Fortsetzung auf der nächsten Seite)

Fortsetzung der **Abbildung 17**

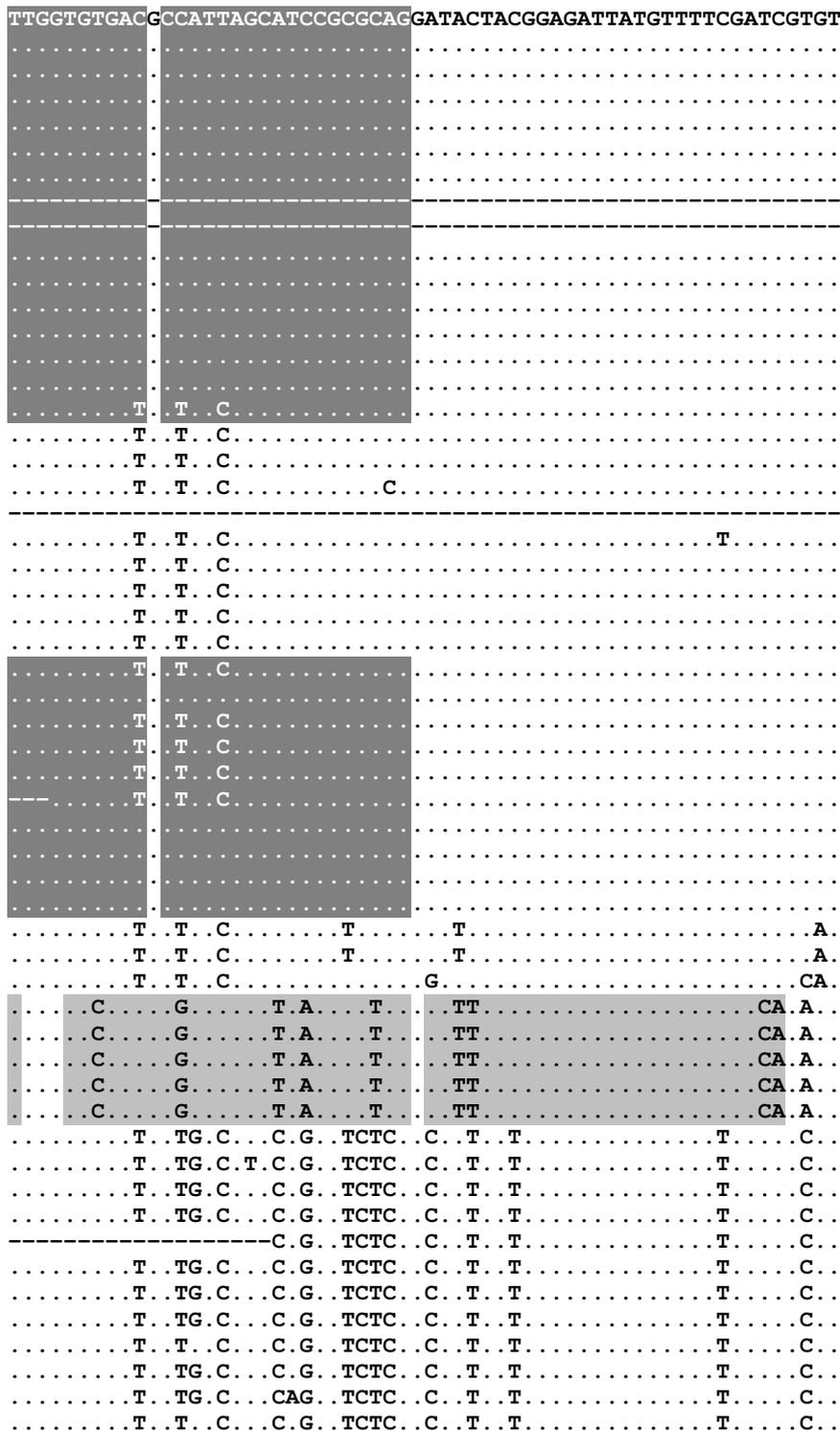


Abbildung 17: Auszug aus dem erstellten Alignment der Nukleotidsequenzen der *ompA*-Gene von Chlamydienstämmen (von oben nach unten im Wechsel weiß/schwarze Schrift): *Cp. psittaci* (*Cp. ps.*), *Cp. abortus* (*Cp. a.*), *Cp. psittaci*, *Cp. felis* (*Cp. f.*), *Cp. caviae* (*Cp. c.*), *Cp. pecorum* (*Cp. p.*), *C. suis* (*C. s.*). Ein Punkt bedeutet eine Übereinstimmung mit der Nukleotidsequenz in der ersten Reihe, ein Strich bedeutet, dass in diesem Bereich keine Angabe über die Nukleotidsequenz vorliegt. Die Lage der beiden Primer und der Gensonde (Assays1 und 8) innerhalb des Gens für ***Cp. psittaci*** (dunkelgrau) und ***Cp. pecorum*** (hellgrau) ist hervorgehoben.

Cp. ps. 4MOMP	1002	GCTCAACGTCACTTCAAG	CCCAGCACAAATTTGTGATTACAA	CCAAGAGGCTATAAAGG
Cp. ps. 98AV2129. ompA	687			
Cp. ps. 6BC. MOMP	1006			
Cp. ps. 6BcompA	753			
Cp. ps. MN. Zhang. ompA	915			
Cp. ps. 3MOMP	900			
Cp. ps. ompA	900			
Cp. ps. clone1. ompA	6			
Cp. ps. clone14. OmpA	6			
Cp. ps. MN. ompA	627			
Cp. ps. MNOs. ompA	666			
Cp. ps. MNRh. ompA	672			
Cp. ps. CP3. ompA	687	A		
Cp. ps. 84-55	687			
Cp. ps. MOMP	687			
Cp. ps. M56. ompA	687	A		
Cp. a. pmSH1ompA	663	.T.G..T..AGTC..C..	..G...G..T...A..C..G..	
Cp. a. pm234ompA	663	.T.G..T..AGTC..C...C...G...G...G...T...A..C..G..		
Cp. a. pm225ompA	663	.T.G..T..AGTC..C...G...G...T...A..C..G..		
Cp. a. clone4ompA	6	.T.G..T..AGTC..C...G...G...T...A..C..G..		
Cp. a. LW508precompA	556	.T.G..T..AGTC..C...G...G...T...A..C..G..		
Cp. a. ompA	804	.T.G..T..AGTC..C...G...G...T...A..C..G..		
Cp. a. B577ompA	742	.T.G..T..AGTC..C...G...G...T...A..C..G..		
Cp. a. OCLH196ompA	663	.T.G..T..AGTC..C...G...G...T...A..C..G..		
Cp. a. precurompA	663	.T.G..T..AGTC..C...G...G...T...A..C..G..		
Cp. ps. ompA84/2334	663	.T.G..T..A..C.TC.	..G...T...A..C..G..	
Cp. ps. VS225. ompA	654	..G..T..A..TC..C..	..A...AG...G..T...A..C..G..	
Cp. ps. GD. ompA	663	.T.G..T..A..TC..C..	..G...G..T...A..C..G..	
Cp. ps. CT1. ompA	654	.T.G..T..A..TC..C..	..G...G..T...A..C..G..	
Cp. ps. 2MOMP	663	.T.G..T..A..TC..C..	..G...G..T...A..C..G..	
Cp. ps. part. ompA	499	.T.G..T..AGTC..C..	..G...G..T...A..C..	
Cp. ps. TT3. ompA	666	...T..A..		
Cp. ps. NJ1. ompA	660	...T..A..		
Cp. ps. 92-1293	666	...T..A..		
Cp. ps. WC. ompA	663	...T..T..A..C..T..	...A...G..T..G..A...	
Cp. f. FPCelloompA	666	...T..A..C..T..	...CA...A...G..T...A..C...	
Cp. f. MOMP	784	...T..A..C..T..	...CA...A...G..T...A..C...	
Cp. c. GPICompA	885	...T..T..A..T...T...A...	...T..G..T...A...	
Cp. p. ompALW613	663	A...TCT...T.A.GT...	...ACTG.A...TC.G.A...GT...	
Cp. p. precu. ompA	641	A...TCTA.C.A.GT...G.G...	...ACC.A..T...TCA..A...GT...	
Cp. p. MOMP	594	AT.G..T...TTG..T.A.GT...	...ACTG.A...TC.G.A...GT...	
Cp. p. 3. omp	529	AT.A...TCT...T.A.GT...G...	...CACTG.A..T.GG..T.A..G..CGT.AA	
Cp. p. 4. omp	543	AT.A...TCT...T.A.GT...	...ACCG.A...G..TCA..A...T...	
C. s. 32XIIompA	572	.T.A...TCT..GC.A.G...TG...	...CACC..CA...TCA...G...GTT..	
C. s. 13VIIompA	545	.T.A...TCT..GC.ATG.T..TG...	...CACT..CA...TCA...G...GTT..	
C. s. 2VompA	552	.T.A...TCT..GC.ATG.C...G...	...CACT...A...A...G..CGT..A	
C. s. R22ompA	651	.T.A...TCT..GC.ATG.T..TG...	...CACC..CA...TCA...G...GTT..	
C. s. omp	492	.T.A...TCT..GC.ATG.T..TG...	...CACC..CA...TCA...G...GTT..	
C. s. H7ompA	651	.T.A...TCT..GC.A.G.C..TG...	...CACC..CA...TCA...G...GT...	
C. s. R27ompA	669	.T.A...TCT..GC.ATG.T..TG...	...CACT...A...A...G..CGT..A	
C. s. R130ompA	648	.T.A...TCT..GC.ATG.T..TG...	...CACC..CA...TCA...G...GTT..	
C. s. R24ompA	633	A..A...TCTC.GC.ATG.T..C...	...ACC..C..T...CA...A...GTT..	
C. s. 14VompA	590	.T.A...TCT..GC.ATG.T..TG...	...CACT..CA...TCA...G...GTT..A	
C. s. pmd1340ompA	657	A..A...TCTC.GC.ATG...C...	...ACC..C..T...CA...A...GTT..	
C. s. ompApm39	681	AT.A...TCT..GC.A.G.C..GG...	...ACT...A..T...T.A...G...GT..AA	

Abbildung 18 (Legende und Fortsetzung auf der nächsten Seite)

Cp.ps.MNOs	974	AGGGAGT	GAAATAGAACCTGAAACCAGTAGCTTATAA	GCGGT	CGAAGACCTAT	-A	ACTTC
Cp.ps.MN	974	-
Cp.ps.MNRh	974	-
Cp.ps.CP3	974	-
Cp.ps.MN-ATCC	974	-
Cp.ps.Vs1	975	-
Cp.ps.VS225	975	-
Cp.ps.VS225partial	975	-
Cp.ps.M56	975	-
Cp.f.FPBaker	975	A	T.G...T
Cp.f.FPVaccine	975	A	T.G...T
Cp.f.Cello	975	A	T.G...T
Cp.ps.6BC	2249	-
Cp.ps.WC	975	-
Cp.ps.Wcpartial	975	-
Cp.ps.Par1	975	-
Cp.ps.GD	975	-
Cp.ps.CT1	975	-
Cp.ps.Daruma	1099	-
Cp.ps.NJ1	2249	-
Cp.a.VPG	485	-
Cp.a.FAG	485	-
Cp.a.FAS	485	-
Cp.a.OSP	973	-
Cp.a.B577	973	G	-
Cp.a.A22	973	-
Cp.a.EBA	2247	-
Cp.p.IPA	978	-
Cp.p.BP1	978	-
Cp.p.E58	978	-
Cp.p.Z	978	-
Cp.p.1710S	978	-
Cp.p.L71	978	-
C.s.R19	992	A	CG
C.s.S45	2266	CG
C.s.R22	2262	A	CG

Abbildung 19 (Legende und Fortsetzung auf der nächsten Seite)

Cp. ps. 4MOMP	591	TACAGGTAACGCAAGTAATACTAATCAGCCAGAAGCAAATGGCAGACCGAACATCGCTTA
Cp. ps. 98AV2129. ompA	276
Cp. ps. 6BC. MOMP	595
Cp. ps. 6BcompA	342
Cp. ps. MN. Zhang. ompA	504 C.
Cp. ps. 3MOMP	489
Cp. ps. ompA	489
Cp. ps. clone1. ompA	1	-----
Cp. ps. clone14. OmpA	1	-----
Cp. ps. MN. ompA	216
Cp. ps. MNOs. ompA	255
Cp. ps. MNRh. ompA	261
Cp. ps. CP3. ompA	276
Cp. ps. 84-55	276
Cp. ps. MOMP	276
Cp. ps. M56. ompA	276	. T C C G G . A C C C G T
Cp. a. pmSH1ompA	276	CG . . . CAGCTAATTAC----- . AACT . TACG .-----AT C
Cp. a. pm234ompA	276	CG . . . CAGCTAATTAC----- . AACT . TACG .-----AT C
Cp. a. pm225ompA	276	CG . . . CAGCTAATTAC----- . AACT . TACG .-----AT C
Cp. a. clone40ompA	1	-----
Cp. a. LW508precompA	169	CG . . . CAGCTAATTAC----- . AACT . TACG .-----AT C
Cp. a. ompA	417	CG . . . CAGCTAATTAC----- . AACT . TACG .-----AT C
Cp. a. B577ompA	355	CG . . . CAGCTAATTAC----- . AACT . TACG .-----AT C
Cp. a. OCLH196ompA	276	CG . . . CAGCTAATTAC----- . AACT . TACG .-----AT C
Cp. a. precurOmpA	276	CG . . . CAGCT . ATTAC----- . AACT . TACG .-----AT C
Cp. ps. ompA84/2334	276	CT . . . CAGCT . ATTT .----- . AACT . TAC .-----AT . . . G
Cp. ps. VS225. ompA	267	CG . . . CAGC . . ATTAC----- . AACT . TAC .-----AT C
Cp. ps. GD. ompA	276	CT . TCCA . . T . ACTT .----- . AA . TG . T . .-----AT C . . G
Cp. ps. CT1. ompA	267	CT . TCCA . . T . ACTT .----- . AA . TG . T . .-----AT C . . G
Cp. ps. 2MOMP	276	CT . TCCA . . T . ACTT .----- . AA . TG . T . .-----AT C . . G
Cp. ps. part. ompA	115	. G . . . C . C . A . ATTAC----- . AGCTG . T . .-----A . . . G . T
Cp. ps. TT3. ompA	276 A . CA GC C . ACTG . T . T .-----AT . . . A . C . TT . A
Cp. ps. NJ1. ompA	270 A . CA GC C . ACTG . T . T .-----AT . . . A . C . TT . A
Cp. ps. 92-1293	276 A . CA GC C . ACTG . T . T .-----AT . . . A . C . TT . A
Cp. ps. WC. ompA	261 A . CA GC C . ACTG . T . T .-----AT . . . A . C . TT . A
Cp. f. FPCelloompA	276	. T . T . . A . CT C C . C . GTCG . T . CC .-----A . . . T . A . TT . T . C . .
Cp. f. MOMP	394	. T . T . . A . CT C C . C . GTCG . T . CC .-----A . . . T . A . TT . T . C . .
Cp. c. GPICompA	498	. . AT . CAGCT . .--- . G . CTT . . AACCATT . C . .-----A . . GAAT A . C . .
Cp. p. ompALW613	273	AC . TAA . . . T . TGCAG . . T . A . G . ACAA . . CC .-----AA . . G . A . . CCA . . G . .
Cp. p. precu. ompA	251	AC . TA . . . GT . TGCAG . . T . A . . ACAA . . CC .-----AA . . G . A . . CCA . . G . .
Cp. p. MOMP	204	A . GTAC . TCTCTTGAAG . CT . AGC . ATA . T . AC . .-----AG . . AAT . . GCA . GC . .
Cp. p. 3. omp	141	GTTCAACTGTCTCTCCG . AT . A . GC .-----C . .-----AA . . GAC . . CCT . . G . .
Cp. p. 4. omp	153	AC . T . A . . TC . CGCAG . CT . A . C . GTAAA . C . .-----AA . . AA . . CCA . . G . .
C. s. 32XIIompA	176	C CC . . T . CGCAGC-----C . CTA . . C . A . . CCCCTC . CGAA . . CCT . . C . .
C. s. 13VIIompA	150 ACG C . ACGC-----C . CTA . . C . A . . GTCTC . CGA . . CCT . . C . .
C. s. 2VompA	156	C G G . CAGC-----C . CTA . . AC . T . . CCCCTC . CG . T . . CCT . . C . .
C. s. R22ompA	249	CT TATT . CC . CA . ACTCC . CTA . . A . T . GCCCTC . CGA . . CCT . . C . .
C. s. omp	96	C G TA . C . CATC-----C . CTA . . C . CT . . CC . CTC . CGAT . . CCT . . C . .
C. s. H7ompA	252	C G CGCAGC-----C . CTA . . C . A . . CCTCTC . C . T . . CCT . . C . .
C. s. R27ompA	264	C AG . T . GGTAGCAG---CC . CTA . . C . A . . CCTCTC . C . T . . CC . . C . .
C. s. R130ompA	243	CT AG . T . GGTA . CAG---CC . CTA . . C . CT . . CA . CTC . CGAT . . CCT . . C . .
C. s. R24ompA	249	-TATA . G . . CTC . CAG .-----CTA . T . CCA . . CA-----AGC . T . CA
C. s. 14VompA	206	-TA . C . C . . TC . CA . .-----CT . . C . . A . GCA-----AGT . TGCA
C. s. pmd1340ompA	273	-TGCA . G . . TC . ACG .-----CT . T . . A . . CG-----AGT . TGCA
C. s. ompApm39	275	ATGT . . C . GGATT . CA . . CTGA--- . CAA . CACCA . . C . CC . C . . T . A . . CCA

Abbildung 20 (Legende und Fortsetzung auf der nächsten Seite)

Fortsetzung der **Abbildung 20**

```

CGGAAGGCATATGCAAGATGCAGAGTGGTTTTCAAATGCAGCCTTCCTAGCCTTAAACATTTGGGATCGCTT
.....
.....
.....G.....
.....
-----
-----
.....
.....
.....
.....
.....G.....A.....
.....G.....
.....T.....T.....
...C.AA.CT.A...C.C.A...CA.C...T...C.A.G.T.C...
...C.AA.CT.A...C.C.A...CA.C...T...C.A.G.T.C...
...C.AA.CT.A...C.C.A...CA.C...T...C.A.G.T.C...
-----
...C.AA.CT.A...CA.C.A...CA.C...T...C.A.G.T.C...
...C.AA.CT.A...C.C.A...CA.C...T...C.A.G.T.C...
...C.AA.CT.A...C.C.A...CA.C...T...C.A.G.T.C...
...C.AA.CT.A...C.C.A...CA.C...T...C.A.G.T.C...
...C.AA.CT.A...C.C.A...CA.C...T...C.A.G.T.C...
T.C.A...CT...C.C.A...A.C...G.T.T...C.A...T...
T.C.AA.CT...C.T...CA.G...T...C.A...T.C...
T.C.A...T...CT.C.A...A...T...T...G...T.C...T...
T.C.A...T...CT.C.A...A...T...T...G...T.C...T...
T.T.AA.CT.A...C.C.A...CA.C...T...C.A...T.C...
T.C.AA...T...C.A...A.C...T...C.A...T.C...
T.C.AA...T...C.A...A.C...T...C.A...T.C...
T.C.AA...T...C.A...A.C...T...C.A...T.C...
T.G.AA...T.A...C...A...T.T.T.T...A...
...C.AA...C.T...C.A...GCA.C...T.T.A.T...A...T...T...
...C.AA...C.T...C.A...GCA.C...T.T.A.T...A...T...T...
...C.AA...A...CCA...C.G.T...T...A...T...
T...A...C...C...G...CA...GT.A.A.T.G...T.C...
T...A...C...C...G...CA...GT.A.A.T.G...T.C...
T...AA...C.C.G...T.CA...GT.A.A.T.GC...T...C.T...
.AAT.CC...C...G...A...CA...G.A.A.T.A...C.T...
T...AA...C...G...CA...G.GT.ATA.T.A...C.T...
T.C.AA...T.C...AT...A.C...T.T.A.G.G.G.T...T...
T.C.AA...T.C...AT...A.C...T.T.TA.G.G.G.T...T...
T.C.AA...T.C...AT...A.C...T.T.TA.G.G.G.T...T...
T.T.AA...T.C...G...AT...A.C...T.T.A.G.G.G.T...T...
T.C.AA...T.C...AT...A.C...T.T.TA.G.G.G.T...T...
T.C.AA...T.C...AT...A.C...C.T.TA.G.G.G.T...T...
T.T.AA...T.C...G...AT...A.C...T.T.A.G.G.G.T...T...
T.T.A...T.C...G...G...AT...A...C.T...A.G.T...
T.C.A...T.C...AAT...A.C...C.T.TA.G.G.G.T...T...
T.C.A...T.C...G...AT...A.C...T.T.TA.G.G.G.T...T...
...C.AA...T.C...AAT...CA...C.C.T.TA.G.G.G...T...

```

Abbildung 20: Auszug aus dem erstellten Alignment der Nukleotidsequenzen der *ompA*-Gene von Chlamydienstämmen (von oben nach unten im Wechsel weiß/schwarze Schrift): *Cp. psittaci* (*Cp. ps.*), *Cp. abortus* (*Cp. a.*), *Cp. psittaci*, *Cp. felis* (*Cp. f.*), *Cp. caviae* (*Cp. c.*), *Cp. pecorum* (*Cp. p.*), *C. suis* (*C. s.*). Ein Punkt bedeutet eine Übereinstimmung mit der Nukleotidsequenz in der ersten Reihe, ein Strich bedeutet, dass in diesem Bereich keine Angabe über die Nukleotidsequenz vorliegt. Die Lage der beiden Primer und der Gensonde (Assay 10) innerhalb des Gens für ***Cp. caviae*** (dunkelgrau) ist hervorgehoben.

Cp. ps. 4MOMP	771	TTTCGGCTGCATTCAACTTGGTTGGGTTAATAGGGTTTTTCAGCTACCAGC-----TC
Cp. ps. 98AV2129. ompA	456
Cp. ps. 6BC. MOMP	775 G. A.
Cp. ps. 6BcompA	522 G. A.
Cp. ps. MN. Zhang. ompA	684 G. A.
Cp. ps. 3MOMP	669
Cp. ps. ompA	669
Cp. ps. clon1. ompA	1	-----
Cp. ps. clone14. OmpA	1	-----
Cp. ps. MN. ompA	396
Cp. ps. MNOS. ompA	435
Cp. ps. MNRh. ompA	441
Cp. ps. CP3. ompA	456 A.
Cp. ps. 84-55	456 G. A.
Cp. ps. MOMP	456 G. A.
Cp. ps. M56. ompA	456 T. C. T. A. G.
Cp. a. pmSH1ompA	444 T. G. C. C. T. G. T. TG. A-----A
Cp. a. pm234ompA	444 T. G. C. CA. T. G. T. TG. A-----A
Cp. a. pm225ompA	444 T. G. C. C. T. G. T. TG. A-----A
Cp. a. clone4OmpA	1	-----
Cp. a. LW508precompA	337 T. G. C. C. T. G. T. TG. A-----A
Cp. a. ompA	585 T. G. C. C. T. G. T. TG. A-----A
Cp. a. B577ompA	523 T. G. C. C. T. G. T. TG. A-----A
Cp. a. OCLH196ompA	444 T. G. C. C. T. G. T. TG. A-----A
Cp. a. precuOmpA	444 T. G. C. C. T. G. T. TG. A-----A
Cp. ps. ompA84/2334	444 C. G. TC. C. C. T. G. T. TA. A-----A
Cp. ps. VS225. ompA	435 T. C. C. T. G. T. TG. A-----A
Cp. ps. GD. ompA	444 T. G. TC. C. T. G. T. TG. A-----A
Cp. ps. CT1. ompA	435 T. G. TC. C. T. G. T. TG. A-----A
Cp. ps. 2MOMP	444 T. G. TC. C. T. G. T. TG. A-----A
Cp. ps. part. ompA	283 C. G. C. C. C. A. G. T. TG. A-----A
Cp. ps. TT3. ompA	450 T. G. C. C. T. G. T. TC. A-----
Cp. ps. NJ1. ompA	444 T. G. C. C. T. G. T. TC. A-----
Cp. ps. 92-1293	450 T. G. C. C. T. G. T. TC. A-----
Cp. ps. WC. ompA	435 C. T. TC. T. C. GT. C. AA. G. ---. GGA. AT-----AG
Cp. f. FPCelloompA	450 T. A. T. C. T. C. A. A. G. T. TC. G-----
Cp. f. MOMP	568 T. A. T. C. T. C. A. A. G. T. TC. G-----
Cp. c. GPICompA	669 G. T. A. T. TC. A. C. C. C. T. G. AA-----
Cp. p. ompALW613	447 TT. AT. T. C. TA. T. T. A. C.
Cp. p. precu. ompA	425 T. AT. T. C. TA. T. T. A. C.
Cp. p. MOMP	378 TT. AT. T. A. C. A. A. G. T. TA.
Cp. p. 3. omp	310 CAAGT. T. A. C. T. G. T. TC. G-----
Cp. p. 4. omp	327 TT. GT. C. T. AA. T. T. A.
C. s. 32XIIompA	350 T. AT. C. T. C. T. C. CGC. AAC. -----AG.
C. s. 13VIIompA	323 T. C. C. T. C. T. C. AGC. AAC. -----AC.
C. s. 2VompA	330 T. A. C. T. C. T. C. AGC. A. C. -----AG.
C. s. R22ompA	429 T. C. T. C. T. C. AAC. AAC. -----AG.
C. s. omp	270 T. T. T. T. A. C. A. A. T. C. AGC. AAC. -----AGA
C. s. H7ompA	426 T. T. C. T. T. T. GACAAT. G-A-----A.
C. s. R27ompA	441 T. T. T. T. A. C. A. A. T. C. GACC. CA. A. -----GGT
C. s. R130ompA	420 T. T. T. T. A. C. A. A. T. C. AGACC. CA. ACA-----AGT
C. s. R24ompA	414 T. A. T. C. A. A. TC. TT. T. A. AA. TA-----
C. s. 14VompA	371 T. A. T. TC. A. A. TC. TT. T. A. AA. C. -----
C. s. pmd1340ompA	438 T. A. T. C. A. A. TC. TT. T. A. AA. CA-----
C. s. ompApm39	453 T. AT. T. T. A. T. T. AACAAA. A. ACA-----AG.

Abbildung 21 (Legende und Fortsetzung auf der nächsten Seite)

Cp. ps. 4MOMP	1062	AGCTAGCTCGAATTTTCCTTTACCTATAACGGCTGGAACAACAGAAGCTACAGACA---C
Cp. ps. 98AV2129. ompA	747
Cp. ps. 6BC.MOMP	1066
Cp. ps. 6BcompA	813
Cp. ps. MN. Zhang. ompA	975
Cp. ps. 3MOMP	960
Cp. ps. ompA	960
Cp. ps. clon1. ompA	66
Cp. ps. clone14. OmpA	66
Cp. ps. MN. ompA	687
Cp. ps. MNOs. ompA	726
Cp. ps. MNRh. ompA	732
Cp. ps. CP3. ompA	747
Cp. ps. 84-55	747
Cp. ps. MOMP	747
Cp. ps. M56. ompA	747	.A.C.....T.TGAT.T.G.....
Cp. a. pmSH1ompA	723	.A.AGCA-----C...A...T.TGATC.G..A.T....
Cp. a. pm234ompA	723	.A.AGCA-----C...A...T.TGATC.G..A.T....
Cp. a. pm225ompA	723	.A.AGCA-----C...A...T.TGATC.G..A.T....
Cp. a. clone4OmpA	66	.A.AGCA-----C...A...T.TGATC.G..A.T....
Cp. a. LW508precompA	616	.A.AGCA-----C...A...T.TGATC.G..A.T....
Cp. a. ompA	864	.A.AGCA-----C...A...T.TGATC.G..A.T....
Cp. a. B577ompA	802	.A.AGCA-----C...A...T.TGATC.G..A.T....
Cp. a. OCLH196ompA	723	.A.AGCA-----C...A...T.TGATC.G..A.T....
Cp. a. precurOmpA	723	.A.AGCA-----C...A...T.TGATC.G..A.T....
Cp. ps. ompA84/2334	723	G..A.CAG...C...T...CGA...AA...TT.TGAT.CT.....T.---
Cp. ps. VS225. ompA	714	.A.AG.A...C...C...A...T...GAT.GT.....T.---
Cp. ps. GD. ompA	723	.A.GTC.G.C...C...GC...AT..A.C...GAG.CT....G..T.---
Cp. ps. CT1. ompA	714	.A.GTC.G.C...C...GC...AT..A.C...GAG.CT....G..T.---
Cp. ps. 2MOMP	723	.A.GTC.G.C...C...GC...AT..A.C...GAG.CT....G..T.---
Cp. ps. part. ompA	559	GA.A.CAG...C...C...A...T...GACACT.....T.---
Cp. ps. TT3. ompA	726	.A..G.....GAC..G..T...GAG.CT.....T.---
Cp. ps. NJ1. ompA	720	.A..G.....GAC..G..T...GAG.CT.....T.---
Cp. ps. 92-1293	726	.A..G.....GAC..G..T...GAG.CT.....T.---
Cp. ps. WC. ompA	723	.A.A.C...T...C...A...C...GACACT.....T.---
Cp. f. FPCelloompA	726	GA..GCAG.A..C..C..C...G..G.A...C...G..ACT..A...T.---
Cp. f. MOMP	844	GA..GCAG.A..C..C..C...G..G.A...C...G..ACT..A...T.---
Cp. c. GPICompA	945	GA.AGCGG.C..C..C..C..G...T...C...GAGAGC....T..T.---
Cp. p. ompALW613	723	CCAG.CTCT.CC.C...AC.CT..GC.GGAA.G.A...---T..TT..GT..T.AATT
Cp. p. precu. ompA	701	CCAA..T.TACC.C...AACGAA.GC.GGAA.GA.-----CA.T.....---TT
Cp. p. MOMP	654	CCAGCCTCTACC.C...AC.GA..GC.GGAA.A.C...---T..TT..AT..T.AATT
Cp. p. 3. omp	589	TCAACC..TACC.C...AA..A.GGCTGGAA.AA.C...GACACT.....A...---TT
Cp. p. 4. omp	603	TCAGCAACT.CC.C...AAC.A.CGC.GGAA.GA.-----CA.T.....---TT
C. s. 32XIIompA	632	G...GA.-----C...C.CAAAC..GAA..A...TGAG.CT.....GG.---
C. s. 13VIIompA	605	GCAAGAA-----C...C.T..A.A...A..G..G...T.GC.....C..TG---T
C. s. 2VompA	612	CCAAGCA-----GGAA..T..C..G...GAC.CT.....GG.---
C. s. R22ompA	711	GAAAGAA-----C...C.CGAGC...A..A...GACACT.....GA.---
C. s. omp	552	G.TAGAA-----C...C.CGA.C...AA..A...T.CT.....GG.---
C. s. H7ompA	711	CAAAGAA-----C...C.TGA.C...A..A...GAGA...G..GA.---
C. s. R27ompA	729	CCAAGCA-----GGAG..T..C..A...GAC.CT.....GG.---
C. s. R130ompA	708	G.TAGAA-----C...C.CGAA...AA..A...T.CT.....GG.---
C. s. R24ompA	693	CAAGGAT-----C...C.T..ACA...A..G...T.GA.C...C..T.---T
C. s. 14VompA	650	CCAAGCT-----C...C.T..AGA...A..G...T.GA.T...G.CA.TG---T
C. s. pmd1340ompA	717	CAAACCT-----C...C.T..A.CG..A..G...T.GC...C..TG---T
C. s. ompApm39	741	TCAAGAT-----C...C.CGA...T.AA...GA..A.C...C.CACAG---G

Abbildung 22 (Legende und Fortsetzung auf der nächsten Seite)

C. pneu. TW-183	572	AATAGTCTATCATTATATGTTGAATACATAGGCATATAAGGGCGACACCCGCTGAACTGAA
C. pneu.	572
C. pneu. FML12	572
C. pneu. CWL029	572
C. pneu. CWL1011	572 C
C. pneu. CM1	570
Cp. p. Z	574 C.C. C. G. A. TA
Cp. p. L71	574 C.C. C. G. A. TA
Cp. p. 1710S	574 C.C. C. G. A. TA
Cp. p. E58	574 C.C. C. G. A. TA
Cp. p. BP1	574 C.C. C. G. A. TA
Cp. a. EBA	569	... CA. G. C.C. G. T. T.
Cp. a. A22	569	... CA. G. C.C. G. T. T.
Cp. a. OSP	569	... CA. G. C.C. G. T. T.

Cp. ps. 84/2334	
Cp. ps. Daruma	569	... CA. C.C. G. T.
Cp. ps. WC	571	... CA. C. C. A.G. T.
Cp. ps. CT1	571	... CA. C. C. A.G. T.
Cp. ps. GD	571	... CA. C. C. A.G. T.
Cp. ps. Par1	571	... CA. C. C. A.G. T.
Cp. ps. VS1	571	... CA. C. C. G. T.
Cp. ps. VS225	571	... CA. C. C. G. T.
Cp. ps. M56	571	... CA. C. C. G. T.
Cp. ps. MNRh	570	... CA. C. C. G. T.
Cp. ps. CP3	570	... CA. C. C. G. T.
Cp. ps. MNOs	570	... CA. C. C. G. T.
Cp. ps. MN	570	... CA. C. C. G. T.
Cp. ps. MNATCCVR-122	570	... CA. C. C. G. T.
Cp. f. FPVacc	571	... CA. C. C. A. TA
Cp. f. FPCello	571	... CA. C. C. A. TA
Cp. c. GPIC	571	... C. C. AC. T. A. TA
C. s. S45	588	... A. C. G. C. C. C. A. T. C.
C. trach2	590	... A. C. GC. C. T. GC. A. T. C.
C. s. H5	585	... C. G. AC. C. T. C. A. T. C.
C. s. R22	585	... C. G. AC. C. T. C. A. T. C.
C. s. R19	585	... C. G. AC. C. T. C. A. T. C.
C. s. R27	585	... C. G. AC. C. T. C. A. T. C.
C. s. R24	585	... C. G. AC. C. T. C. A. T. C.
C. trach1	590	... A. C. GC. C. T. GC. A. T. C.
C. mur. MoPn	588	... C. G. AC. T. GC. A. A. T.
C. mur. Nigg	588	... C. G. AC. T. GC. A. A. T.

Abbildung 23 (Legende und Fortsetzung auf der nächsten Seite)

Fortsetzung der **Abbildung 23**

```

GGGGAACAGCCTAAACCATATTTTTTA--ATATGGGGTTGTAGGGTCGATAACATGGGATC
.....--.....
.....--.....
.....--.....C.....
.....--.....
.....--.....
.....T.....--.....G.A.....
.....T.....--.....G.A.....
.....T.....--.....G.A.....
.....T.....--.....G.A.....
.....T.....--.....G.A.....
.....GA.A.C.....C.....--G.....
.....GA.A.C.....C.....--G.....
.....GA.A.C.....C.....--G.....
-----
.....GA.A.C.....C.....--G.....
.....GA.A.C.....C.....--G.....
.....GA.A.C.....C.....--G.....
.....GA.A.C.....C.....--G.....
.....GA.A.C.....C.....--G.....
.....GA.A.C.....C.....--G.....
.....GA.A.C.....C.....--G.....
.....GA.A.C.....C.....--G.....
A.....GA.A.C.....C.....--G.....
A.....GA.A.C.....C.....--G.....
A.....GA.A.C.....C.....--G.....
A.....GA.A.C.....C.....--G.....
A.....GA.A.C.....C.....--G.....
.....TT.A.C.....CG.....--G.....
.....TT.A.C.....CG.....--G.....
.....GA.A.C.....CGCC...G--G.G.....A.....
.....G.....GAGC.GAAGAAGCGA.....T..GGGAGAA.....
.....T.....GAGC.GA..AGGCTC.....A.T..GG.T.AA.....
.....G.....GAGCCGAAGAAGCGA.....T..GG.A.AA.....
.....G.....GAGC.GAAGAAGCGA.....T..GG.A.AA.....
.....G.....GAGC.GAAGAAGCGA.....T..GG.A.AA.....
.....G.....GAGC.GAAGAAGCGA.....T..GG.A.AA.....
.....G.....GAGC.GAAGAAGCGA.....T..GG.A.AA.....
.....T.....GAGC.GA..AGGCTC.....A.T..GG.T.AA.....
.....G.....GA.C..A..--G.TC.....A.T.GGG.T.AA.....
.....G.....GA.C..A..--G.TC.....A.T.GGG.T.AA.....
    
```

Abbildung 23: Auszug aus dem erstellten Alignment der Nukleotidsequenzen der 23S rRNA-Gene von Chlamydienstämmen (von oben nach unten im Wechsel weiß/schwarze Schrift): *Cp. pneumoniae* (*C. pneu.*), *Cp. pecorum* (*Cp. p.*), *Cp. abortus* (*Cp. a.*), *Cp. psittaci* (*Cp. ps.*), *Cp. felis* (*Cp. f.*), *Cp. caviae* (*Cp. c.*), *C.suis* (*C. s.*), *C. trachomatis* (*C. trach.*), *C.suis*, *C. trachomatis*, *C. muridarum* (*C. mur.*). Ein Punkt bedeutet eine Übereinstimmung mit der Nukleotidsequenz in der ersten Reihe, ein Strich bedeutet, dass in diesem Bereich keine Angabe über die Nukleotidsequenz vorliegt. Die Lage der beiden Primer und der Gensonde (Assay 11) innerhalb des Gens für **C. suis** (hellgrau) ist hervorgehoben.

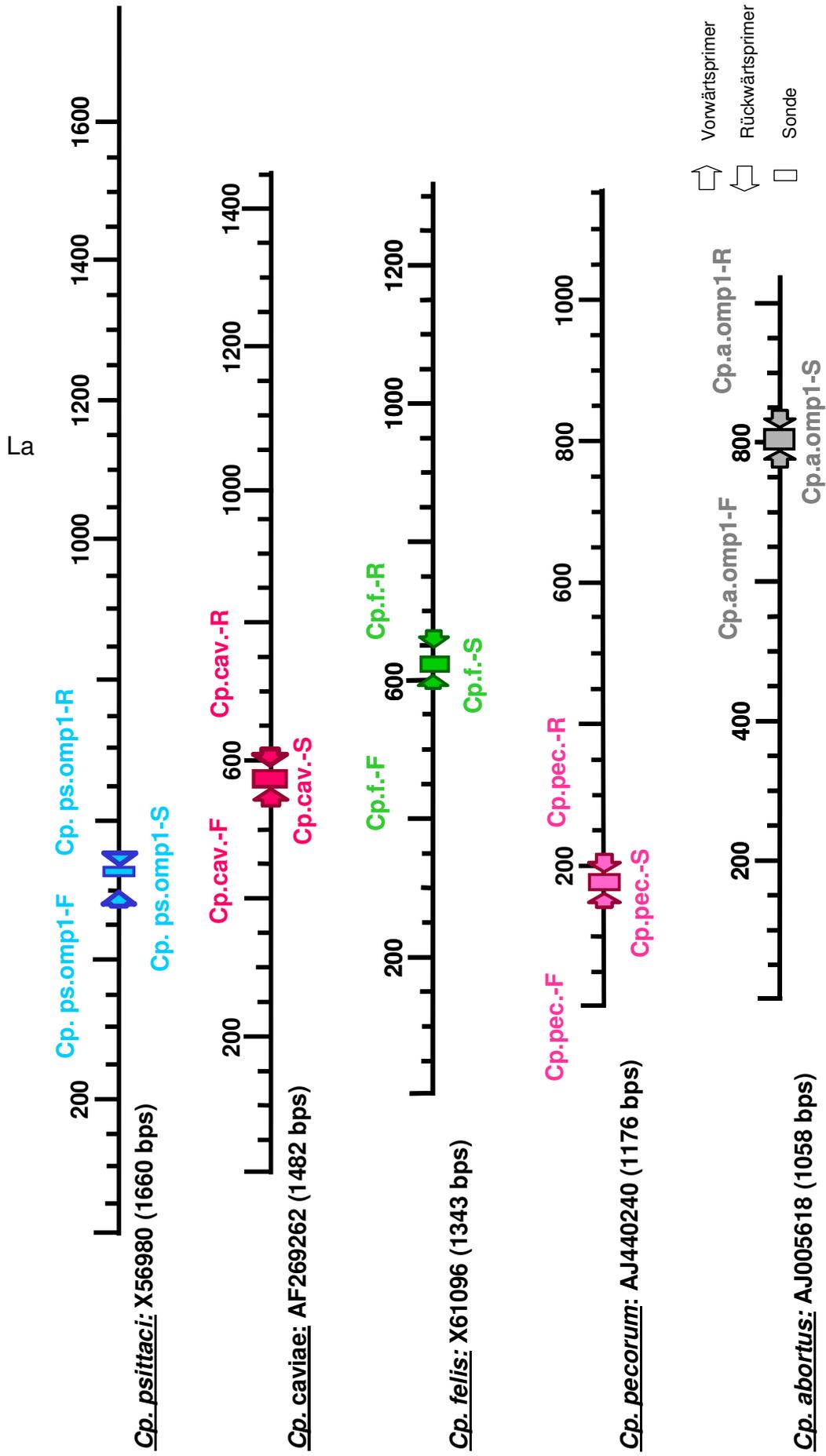


Abbildung 24: Lage und Position der entworfenen Gensonden und Primer (Assays 1, 10, 9, 8, 6) innerhalb der *ompA*-Gene.

DANKSAGUNG

Am Zustandekommen dieser Arbeit waren viele interessierte und hilfsbereite Menschen beteiligt, denen ich an dieser Stelle danken möchte:

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Sting, für die Überlassung des Themas, den Ideenreichtum und die immer offene, geduldige Betreuung und Unterstützung, die wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Herrn Professor Dr. Bauerfeind möchte ich hiermit ganz herzlich für die Annahme und wissenschaftliche Betreuung der Arbeit danken. Seine fachlichen und konstruktiven Anregungen haben die Durchführung und Fertigstellung dieser Arbeit sehr bereichert.

Bei Herrn Dr. Sachse vom Nationalen Referenzlabor für Psittakose in Jena bedanke ich mich für die immer kompetente und schnelle Hilfe während der gesamten Arbeit. Vielen Dank für die freundliche Aufnahme in Ihrer Arbeitsgruppe in Jena und für die schöne und interessante Zeit, die ich durch Sie in Edinburgh verbringen durfte.

Frau Dr. Judith Tyczka bin ich sehr dankbar für ihre freundliche und offene Art und ihre wertvolle Hilfestellung und Unterstützung in vielen Fragestellungen.

Frau Maria Roth danke ich für die Bereitstellung eines Laborarbeitsplatzes am Chemischen und Veterinäruntersuchungsamt Stuttgart und für die Bereitschaft immer wieder neue Wege zu gehen.

Bei Frau Petra Hagenmüller, Frau Rosemarie Schultheiß und Frau Larissa Homann, Mitarbeiterinnen der Abteilung Virologie des CVUAS, bedanke ich mich für die geduldige und selbstverständliche Einführung und Hilfestellungen im Umgang mit den Zellkulturen.

Frau Birgit Schmidt aus dem Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere der Justus-Liebig-Universität Gießen danke ich für die Unterstützung beim Auszählen der Chlamydienpartikel.

Bei Frau Simone Bettermann und Frau Christine Grajetzki, Mitarbeiterinnen des Nationalen Referenzlabors für Psittakose, möchte ich mich ganz herzlich für die freundliche Hilfe bei den Untersuchungen mittels Microarray-Technik und Real-Time PCR in Jena bedanken.

Frau Katrin Mohns, Frau Sandra Ketterer, Frau Brigitte Illi und Frau Erika Dillmann, aus der Abteilung Bakteriologie des CVUAS danke ich dafür, dass sie mir bei allen labortechnischen Fragen mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben.

Bei Herrn Dr. Peter Kopp und Herrn Dr. Jörg Balzer aus der Vet Med Labor GmbH (IDEXX) in Ludwigsburg bedanke ich mich für die fachlichen Anregungen und das Sammeln von Proben.

Der Grimminger Stiftung für Zoonosenforschung danke ich für die gewährte finanzielle Unterstützung.

Ein ganz herzlicher Dank geht an Frau Dr. Marion Stermann, die mir bei den Arbeiten im L3-Labor eine wertvolle Hilfe war und mich mit ihrer fröhlichen Art immer wieder aufmuntert hat.

Ein ganz besonderer Dank geht an meinen Mann Niko, der mir durch Verständnis, Geduld und Unterstützung immer wieder Rückhalt und Kraft gibt.

Und schließlich danke ich meiner Familie, insbesondere meinem Eltern, die mich in allen Lebenslagen unterstützen und für mich da sind.

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5538-7



9 783835 955387