

Amtliche Methodensammlung

Psittakose/Ornithose (*Chlamydia psittaci*)

1. Charakterisierung der Infektion
2. Untersuchungsmaterial
3. Untersuchungsgang

Psittakose/Ornithose (*Chlamydia psittaci*)

1. Charakterisierung der Infektion

1.1 Erreger

Der Erreger der Psittakose/Ornithose gehört zur Familie der *Chlamydiaceae*, zum Genus *Chlamydia* und zur Spezies *Chlamydia (C.) psittaci*. Bei den Aves wurden ursprünglich sechs verschiedene Serovare unterschieden (A und F = Psittaziden-Serovare I und II, B und E = Tauben-Serovare I und II, C = Enten- und D = Puten-Serovar; nach ANDERSEN, 1997). In einer Vergleichsstudie konnte gezeigt werden, dass den Serovaren äquivalente Genotypen zugeordnet werden können, die über die variablen Domänen II und IV des *ompA*-Gens definiert sind (VANROMPAY, 1997). Mittlerweile wurden noch ein weiterer aviärer Genotyp (EB; GEENS, 2005) und zwei nicht-aviäre Genotypen eingeführt. Tabelle 1 fasst die gegenwärtig akzeptierten Typen zusammen, wobei anzumerken ist, dass die Wirtsspezifität nicht hoch ist und mit steigenden Untersuchungszahlen das Spektrum der genannten Wirtstierarten noch erweitert werden wird.

Tabelle 1: Einteilung der Serovare bzw. Genotypen von *Chlamydia psittaci*

Serovar / Genotyp	Vorkommen	Humanpathogenität / Anmerkungen
A	Psittaciformes, Taube, Kanarienvogel, Pute	hoch (insbesondere bei virulenten Stämmen)
B	Taube, Kanarienvogel, Kü- ken, Fasan, Pute	mittel
C	Ente, Schwan, Gans	hoch (insbesondere in Farmen, Schlacht- und Federverarbeitungs- betrieben)
D	Pute	hoch (insbesondere in Farmen, Schlacht- und Federverarbeitungs- betrieben)
E	Taube, Ente Pute, Strauß, Nandu	hoch (identisch mit humanem Isolat von 1934; Tauben sind Reser- voir; 20 % der Taubenisolate gehören zum Serovar II; eng ver- wandt mit A und B)
F	Sittich (bisher ein Isolat)	nicht bekannt (evtl. neuere Mutation; evtl. Vorkommen in noch wenig un- tersuchten Vogelpopulationen)
EB	Ente	vorhanden (genaue Abschätzung noch nicht möglich)
WC	Rind	nicht bekannt
M 56	Nager (Bisamratte)	nicht bekannt

Schon jetzt ist bekannt, dass aviäre Serovare/Genotypen auch bei anderen Tierarten wie z. B. Schwein, Rind und Schaf vorkommen. Prinzipiell sind alle aviären *C. psittaci*-Serovare humanpathogen.

Psittakose/Ornithose (*Chlamydia psittaci*)

Chlamydien gehören weltweit zu den am meisten verbreiteten pathogenen Mikroorganismen. Das Wirtsspektrum von *C. psittaci* umfasst Arthropoden, Mollusken, Vögel (bei **mehr als 460 ca. 140** Arten nachgewiesen), eine Vielzahl von Säugetieren und den Menschen. **Psittakose** wird als Infektionskrankheit bezeichnet, die bei *Psittaciformes* (Papageien und Sittichen) vorkommt. Die **Ornithose** definiert der Gesetzgeber als eine Infektionskrankheit, die bei Nutzgeflügel sowie bei Wild- und Ziervögeln vorkommt. Sie ist ebenso wie die Psittakose **meldepflichtig**. Allerdings handelt es sich vom wissenschaftlichen Standpunkt bei den historisch entstandenen Begriffen Psittakose und Ornithose um ein und dieselbe Krankheit mit dem gleichen Erreger. Man verwendet daher in der neueren Fachliteratur den übergreifenden Terminus **aviäre Chlamydiose**.

Morphologisch gesehen, erscheinen Chlamydien als unbewegliche kokkoide Bakterien. Die Zellwand enthält nur Spuren von Muraminsäure und ähnelt der Zellwand gramnegativer Bakterien. Der zweiphasige Entwicklungszyklus kennzeichnet sie als **obligat intrazelluläre** Mikroorganismen.

Man unterscheidet zwei unterschiedliche Chlamydienformen:

- die 0,2 bis 0,3 µm großen infektiösen Elementarkörperchen (EK), die extrazellulär überleben können. Sie enthalten das Genom und die Ribosomen. Für das Eindringen in die Wirtszelle sind spezifische Wirtszell- und Erregerrezeptoren verantwortlich. Unterschiede in Größe und Struktur der antigenwirksamen EK-Oberflächenproteine (Major Outer Membrane Protein - MOMP) sind verantwortlich für Wirtsspezifität, Organotropismus und Virulenzverhalten. Nach Adsorption der EK an die Zellmembran der Wirtszelle gelangen diese durch Endozytose in die Zelle.
- die 0,8 bis 1,5 µm großen Retikularkörperchen (RK) entstehen durch Reorganisation der EK und vermehren sich durch binäre Teilung in den endozytoplasmatischen Vakuolen (Einschlusskörperchen). Eine Interaktion mit extrazellulären Abwehrmechanismen ist dadurch erschwert. Die RK reifen über sog. "kondensierte Formen" zu den infektiösen EK. Diese können durch Lysis der Zelle (Krankheit) oder durch kontinuierliches Ausschleusen aus der Zelle (klinisch inapparente Form) freigesetzt bzw. in der Zelle zurückgehalten werden (latente Verlaufsform).

Psittakose/Ornithose (*Chlamydia psittaci*)

1.2 Klinische Symptomatik

Die Psittakose/Ornithose verläuft beim Vogel akut, subakut bis protrahiert oder chronisch in Abhängigkeit von Infektionsdosis, Virulenz der Chlamydienstämme, Empfänglichkeit und Immunstatus des Wirtes sowie von Umwelteinflüssen. Die häufigste Form ist die subklinisch-persistierende Verlaufsform bei adulten Vögeln. Sie verläuft ohne klinische Symptome (siehe Tabelle 2).

Nach einer Chlamydieninfektion kann zwischen perakutem Verlauf und völliger Unauffälligkeit klinisch gesunder Tiere eine breite Palette an mehr oder weniger unspezifischen Symptomen beobachtet werden. Das artspezifische Verhalten kann sich bei chlamydieninfizierten Vögeln verändern. Apathie, Schwäche, Schläfrigkeit, Hängenlassen der Flügel, Appetitlosigkeit, anfallartiges Zittern, tonisch-klonische Krämpfe und Lähmungserscheinungen können beobachtet werden.

Die ältere Bezeichnung "Pneumo-Enteritis" für Psittakose/Ornithose weist darauf hin, dass Respirations- und Verdauungstrakt gleichzeitig betroffen sind. Es wird hellgrün- oder grau-wässriger Kot abgesetzt. In Verbindung mit Nasenausfluss wird angestrenzte Atmung beobachtet. Konjunktivitis und Keratokonjunktivitis treten bei manchen Vogelarten nicht auf, bei anderen (Tauben, Neophema-Arten, Enten) sind es oft die einzigen auf Psittakose deutenden Befunde. Das unspezifische klinische Bild wird häufig durch die Symptome struppiges Gefieder und Abmagerung ergänzt.

Tabelle 2: Verlaufsformen der aviären Chlamydiosen (zit. nach KALETA, 1997)

Verlaufsform	Inkubationszeit in Tagen	Krankheitsdauer	Symptome, Bemerkungen
Akute, letale systemische Form	3 - 7	8 - 14 Tage	Anorexie, Apathie, Diarrhoe; junge Vögel
Subakute bis protrahierte Form	7 - 14	> 3 Wochen	Anorexie, Apathie, Diarrhoe; adulte Vögel
Chronische Form	30 - 90	> 2 Monate	Apathie, Kachexie, Diarrhoe, Atemnot; adulte Vögel
Subklinische persistierende Form	keine	ohne	Häufigste Form, ohne Symptome; adulte Vögel
Aktivierete persistierende Form	> 3 Monate bis Jahre	> 2 Monate	Aktivierung durch endogene und exogene Faktoren, dann Apathie, Anorexie, Diarrhoe, Kachexie, respiratorische Symptome

Vögel mit chronischer Psittakose sind meistens anämisch. Das Serum-Gesamtprotein bewegt sich, bedingt durch Dehydratation und Anstieg von γ - und β -Globulinen, an der Obergrenze der Norm oder ist leicht erhöht. Bei infizierten Vögeln können Leukozytenzahlen von über 10.000/mm³ festgestellt werden. Erhöhte Lactat-

Psittakose/Ornithose (*Chlamydia psittaci*)

Dehydrogenase (LDH) und Aspartat-Aminotransferase (AST) Serumwerte weisen auf eine Schädigung der Leber hin, erhöhte Harnsäure- und Kreatininwerte auf eine renale Dysfunktion (zit. nach JANECEK, 1998).

1.3 Differentialdiagnose

Differentialdiagnostisch ist bei Durchfall an Salmonellose, bei Schnupfen an Mykoplasmeninfektionen zu denken.

1.4 Diagnostische Indikation

Klinischer oder epidemiologisch begründeter Verdacht
Einfuhruntersuchungen

1.5 Zuständige Untersuchungseinrichtung

- Staatliche Veterinäruntersuchungsämter
- Friedrich-Loeffler-Institut (OIE-Referenzlabor für Chlamydieninfektionen der Vögel und Schafe), Naumburger Str. 96a, 07743 Jena, Tel: +49 3641 804 2435

1.6 Rechtsgrundlagen

- Gesetz zur Vorbeugung vor und Bekämpfung von Tierseuchen (Tiergesundheitsgesetz - TierGesG) in der jeweils gültigen Fassung
- Verordnung über das innergemeinschaftliche Verbringen sowie die Einfuhr und Durchfuhr von Tieren und Waren (Binnenmarkt- Tierseuchenschutzverordnung - BmTierSSchV) in der jeweils gültigen Fassung
- Verordnung über meldepflichtige Tierkrankheiten in der jeweils gültigen Fassung

2. Untersuchungsmaterial

2.1 Untersuchungsmaterial für direkten Antigennachweis und Chlamydienanzüchtung

Verendete Vögel bzw. deren Organe (Milz, Lunge, Leber, Niere, Luftsäcke, Herzbeutel)

Möglichst zellreiche Tupferproben¹ (okulo-nasale, tracheale Tupfer oder Kloakentupfer), Kotproben (ca. 2 - 5 g/Vogel), Sammelkotproben von bis zu 20 Vögeln

Tupferproben sollten für den Nachweis von *C. psittaci* mittels Zellkulturmethode möglichst frisch entnommen werden. Probenmaterial jeder Art sollte gekühlt und auf dem schnellsten Weg zum Untersuchungsort

¹ Bei der Gewinnung der Tupferproben ist darauf zu achten, dass möglichst viele Epithelzellen gewonnen werden. ACHTUNG: Baumwolltupfer mit HOLZSCHAFT sind UNGEEIGNET, da das nachzuweisende Antigen an Holz adsorbiert und dadurch Ergebnisse verfälscht werden. Z. B. IDEIA Chlamydia-Probenentnahmeset (2 unterschiedlich große Tupfer und Transportmedium in Schraubflasche) der Fa. Dako Diagnostika, Hamburg.

Psittakose/Ornithose (*Chlamydia psittaci*)

transportiert werden. Zusätzlich können kommerziell verfügbare Transportmedien² bzw. das in der Anlage angegebene Medium verwendet werden. Können die Proben nicht innerhalb von 24 Stunden aufgearbeitet werden, müssen sie bei < -80 °C eingefroren werden (ohne Transportmedium!).

2.2 Untersuchungsmaterial für den Antikörpernachweis

Nativblutproben³ (Blut ohne Stabilisator), Serum

Im Anschreiben ist anzugeben:

- Wer sendet ein? (Veterinäramt, Bearbeiter; inkl. dienstlicher und eventuell privater Telefon- und Faxnummer)
- Was wird eingesandt? (Art des Materials, von welchen Tieren, Anzahl etc.)
- Aus welchem Bestand stammen die Proben?
- Was wurde wann in dem Bestand festgestellt? (anamnestischer Kurzbericht)

3. Untersuchungsgang

Beachte:

Alle Laborarbeiten zum Erregernachweis sind unter entsprechenden Sicherheitsvorkehrungen (Biohazard-Werkbänke in S2- bzw. S3-Laboratorien) durchzuführen. Aufgrund der aerogenen Übertragbarkeit der Erreger haben Ultraschallarbeiten, Zentrifugationsschritte u. a. grundsätzlich im geschlossenen System zu erfolgen.

3.1 Antigennachweismethoden

3.1.1 Direktnachweis⁴ von *C. psittaci* mittels histologischer Färbemethoden und Immunfluoreszenz

Herstellung von Abklatsch bzw. Tupferpräparaten

- Tupfer ohne Transportmedium direkt auf fettfreie Objektträger ausstreichen
- Tupfer mit Transportmedium 15 Sek. auf einem Vortexer schütteln, die Suspension nach Entfernen des Tupfers für 5 bis 10 min bei 800 x g zentrifugieren und nach vorsichtigem Abnehmen des Mediums das Sediment z. B. mit einer Platinöse auf Objektträger ausstreichen
- Präparate lufttrocknen
- Fixierung für Giménez-Färbung: 30 min in 96%igem Ethanol p.A., lufttrocknen

² Kommerziell verfügbare Transportmedien, z. B. von Dako oder SPGA-Stabilisator, siehe Anhang

³ Blut ist aus der *Vena jugularis* zu entnehmen. Bei kleineren Vögeln (z. B. Wellensittiche) können etwa 0,5 ml und bei größeren Vögeln bis zu 1,5 ml Blut entnommen werden (Kanüle 0,70 x 30 mm). Blutproben möglichst nicht aus der *Vena ulnaris* entnehmen, da es häufig zu Hämatombildung kommt.

⁴ Bedingung für den direkten Nachweis von Chlamydienantigenen mittels histologischer bzw. fluoreszenzserologischer Methoden ist eine ausreichende Anzahl von Zellen. Da bei negativem Ergebnis weitere Untersuchungen (Zellkulturmethode und PCR-Nachweis) durchzuführen sind, sollten die ohne Medium eingesandten Tupfer in geeignetes Medium verbracht werden. Bei den mit Transportmedium zu untersuchenden Tupfer, sollte das restliche Zellpellet im abgESAUGTEN Transportmedium wieder resuspendiert werden.

Psittakose/Ornithose (*Chlamydia psittaci*)

- Fixierung für Immunfluoreszenz: 10 min Aceton p.A., lufttrocknen bzw. nach Anweisung des Konjugatherstellers verfahren

Färbung nach Giménez

- fixierte Präparate gründlich mit Aqua dest. spülen und 6 min mit Karbolfuchsin-Gebrauchslösung färben
- Farblösung abgießen und zweimal in Aqua dest. spülen
- mit 0,8%iger Malachitgrün-Lösung 30 bis 60 Sek. gegenfärben
- Malachitgrünlösung abgießen
- zweimal in Aqua dest. spülen
- Färbung mit Malachitgrün-Lösung wiederholen
- Malachitgrünlösung abgießen
- mit Aqua dest. spülen
- zwischen Fließpapier unter mäßigem Druck trocknen
- lichtmikroskopische Beurteilung bei 400- bis 1000-facher Vergrößerung

Beurteilung: Als positiv werden eindeutig im Zellplasma liegende Einschlusskörperchen gewertet. Die unterschiedlich großen Einschlusskörperchen (Elementarkörperchen: 0,2 bis 0,3 µm; Retikularkörperchen: 0,8 bis 1,5 µm) färben sich intensiv rot ein. Der Hintergrund zeigt eine grünliche Färbung. Die Einschlusskörperchen sind von Artefakten durch ihre Lage in der Zelle und durch ihre Form und Anordnung zu unterscheiden. Eine negative Färbung schließt nicht aus, dass eine Chlamydieninfektion vorliegt, da die Erregermenge zu gering sein kann bzw. die Erreger in anderen Organen lokalisiert sein können. Bei negativen Ergebnissen ist zum Ausschluss einer Chlamydieninfektion ein Zellkulturverfahren bzw. ein DNA-Nachweis mittels qPCR durchzuführen.

Direkte Immunfluoreszenz

Es stehen verschiedene kommerzielle Konjugate zur Verfügung (z. B. ImagenTM Immunofluorescence Test von Oxoid mit FITC-gebundenen Antikörpern gegen genuspezifisches Lipopolysaccharid). Der Test ist nach der entsprechenden Produktinformation durchzuführen.

Beurteilung: Chlamydien spezifisch ist eine leuchtend apfelgrüne, granuläre Fluoreszenz im Zellzytoplasma. Der Test ist valide, wenn chlamydienhaltige Kontrollpräparate spezifische Fluoreszenz und negative Kontrollpräparate keine Fluoreszenz aufweisen. Ein negatives Immunfluoreszenzresultat schließt eine Chlamydieninfektion nicht mit Sicherheit aus. Bei negativen Ergebnissen ist zum Ausschluss einer Chlamydieninfektion ein Zellkulturverfahren bzw. ein DNA-Nachweis mittels qPCR durchzuführen.

Psittakose/Ornithose (*Chlamydia psittaci*)

3.1.2 Anzucht und Vermehrung von *C.-psittaci* mittels Zellkulturmethode und Nachweis mittels histologischer Färbung bzw. Immunfluoreszenz

Vorbereitung des Untersuchungsmaterials

Tupferproben

- Tupfer mit Transportmedium⁵ für 15 Sek. auf einem Vortexer schütteln
- Suspension zur sicheren Freisetzung der Chlamydien aus den Zellen mit Ultraschall (Becherresonator z. B. Fa. Branson, Amplitude 80 %, 8 Sek. mit 10 Schlägen und 0,2 Sek. Pause) behandeln
- Tupfer ausdrücken und entsorgen
- Bei Tupfern ohne Transportmedium Röhrchen mit 2 ml Transportmedium auffüllen, 10 min bei Zimmertemperatur stehen lassen und anschließend wie die in Transportmedium versandten Tupfer behandeln

Organmaterialien

- ca. 1 g Organmaterial im Mörser unter Zusatz von sterilem Seesand homogenisieren
- in 10 ml Transportmedium aufnehmen und in 15-ml-Zentrifugenröhrchen überführen
- zur Freisetzung der Chlamydien aus den Zellen die Proben dreimal mit Ultraschall behandeln (s. unter Tupferproben), zwischen den Behandlungen Probe aufschütteln
- Organanreicherung bei 500 x g für 15 min bei 18 °C zentrifugieren
- Überstand zum Beimpfen der vorbereiteten Zellkulturen verwenden
- Hinweis: Zellkultur möglichst gleich beimpfen; bei Leberanreibungen Vorverdünnung von 1 : 10 vornehmen (Material sehr aggressiv für Zellen)

⁵ a.a.O., Fußnote 3

Einzel- und Sammelkotproben

- 1 g Kot im Mörser unter Zusatz von sterilem Seesand homogenisieren und eine 10%ige Suspension mit Transportmedium herstellen
- bei 500 x g für 15 min bei 18 °C zentrifugieren
- Überstand möglichst sofort auf die Zellkultur bringen
- Hinweis: Kotproben sind oft stark kontaminiert, deshalb ist eine vorherige Filtration durch einen Spritzenfilter der Porengröße 0,45 µm empfehlenswert

Einzel- und Sammelkotproben in Transportmedium

- im Transportmedium eingesandte Kotmaterialien mit einem Vortexschüttler homogenisieren
- eine 10%igen Lösung mit Transportmedium herstellen
- weiteres Vorgehen wie oben beschrieben

Vorbereitung der Zellkultur

Verwendet wird die permanente Buffalo-Green-Monkey (BGM)-Zelllinie (siehe Anhang Zellkultur). Die Zellen werden bei 37 °C bebrütet und ein- bis zweimal wöchentlich im Verhältnis 1 : 3 bis 1 : 10 gesplittet.

Es empfiehlt sich, die Zellen einmal pro Monat auf Mykoplasmen zu untersuchen.

Für die Isolierung der Chlamydien in Zellkulturen können verschiedene Kultursysteme verwendet werden (z. B. sterile Flachbodenröhrchen mit Deckgläschen oder 24-Loch-Gewebekulturplatten, in die sterile Deckgläschen mit entsprechendem Durchmesser gegeben werden). Die Zelldichte wird auf die gewünschte Zellzahl (z. B. 1×10^5 Zellen/ml) eingestellt. Nach Aussaat werden die Kulturen bis zur Beimpfung mindestens 24 h bei 37 °C im CO₂-Brutschrank bebrütet. Der Zellrasen wird mikroskopisch auf Konfluenz geprüft (abhängig von der Einsaatdichte evtl. erst nach 3 - 4 Tagen konfluenter Zellrasen erreicht).

Beimpfung der Zellkulturen

- Im ersten Ansatz je Probe mindestens vier Röhrchen der vorbereiteten BGM-Zellkulturen (Deckglasröhrchen mit jeweils 1 ml Zellsuspension entsprechend folgendem Schema mit Probenüberstand beimpfen:
 - 1 Rö: 30 µl Überstand
 - 2 Rö: 100 µl Überstand
 - 1 Rö: 300 µl Überstand
- Überstand zur Unterstützung der Anheftung von Chlamydien an die Zellen bei 3,400 x g für eine Stunde bei 37 °C im geschlossenem System aufzentrifugieren (z. B. Zentrifuge Rotanta 96 RS mit ausschwingbarem Rotor und aerosoldichten Zentrifugenbechern)
- für 2 h bei 37 °C und 5 % CO₂ (Deckel für Gasaustausch etwas aufschrauben) inkubieren

Psittakose/Ornithose (*Chlamydia psittaci*)

Mediumwechsel

- Überstand absaugen
- je nach Bedarf mit PBS (mit Ca und Mg-Ionen) waschen
- je Röhrchen 2 ml Medium einfüllen, Zusätze zur Unterdrückung der Begleitflora (siehe Anhang Zellkultur)
- beimpfte Zellkulturen bei 37 °C und 5 % CO₂ 18 h inkubieren
- erneuter Mediumwechsel
- nach weiteren 48 h Zellrasen mikroskopisch beurteilen: wenn Zellrasen bei allen drei Beimpfungsmengen noch fest ist, Deckgläschen von Röhrchen mit 100 µl Beimpfungsmenge anfärben

Bei positivem Nachweis: Anreicherung der Chlamydien durch Anlegen einer Passage ausgehend vom Röhrchen mit der größten Beimpfungsmenge bei intaktem Zellrasen; dafür Zellen durch Ultraschallbehandlung im Becherresonator (Fa. Branson) ablösen bei einer Amplitude von 80 %, 8 Sek. mit 10 Schlägen und 0,2 Sek. Pause, Ultraschallbehandlung wiederholen bis Zellrasen abgelöst ist, mit je 200 µl Zellsuspension die gewünschte Anzahl Röhrchen beimpfen, Inkubation und Nachweis wie beschrieben (außer Mediumwechsel nach 18 h), Chlamydien suspension zum Typisieren geben, chlamydieninfizierte Zellkulturröhrchen bei -80 °C lagern und gegebenenfalls als Vorkultur für eine Stammkonservierung einsetzen.

Bei negativem Nachweis: Anlegen einer Passage ausgehend vom Röhrchen mit der größten Beimpfungsmenge bei intaktem Zellrasen, dafür Zellen im Becherresonator (Fa. Branson) ablösen bei einer Amplitude von 80 %, 8 Sek. mit 10 Schlägen und 0,2 Sek. Pause, Ultraschallbehandlung wiederholen bis Zellrasen abgelöst ist, mit 200 µl Zellsuspension je drei Röhrchen beimpfen, alle Passageröhrchen nach der Beimpfung weiterbearbeiten wie beim ersten Ansatz beschrieben (außer Medienwechsel nach 18 h), nach zwei erfolglosen Passagen Isolierungsversuch beenden.

Kontrollen

Bei allen Anzuchtversuchen wird als Positivkontrolle ein Zellkulturröhrchen mit einem Chlamydienstamm infiziert (definierte Infektionsdosis) und als Negativkontrolle ein unbeimpftes Zellkulturröhrchen mitgeführt.

Nachweis der Chlamydien in Zellkulturen

- bei Bedarf vor der Fixierung infektiösen Überstand aus dem Röhrchen pipettieren und für eine weitere Passagierung in sterile Röhrchen überführen bzw. direkt auf vorbereitete BGM-Zellen geben
- Deckglas kurz mit Methanol spülen und anschließend 10 min mit Methanol fixieren
- Hinweise: Zellen vor dem Fixieren nicht trocken werden lassen, da sonst Ruptur der Einschlüsse möglich, Deckglaskulturen im Röhrchen fixieren

Färbung nach Giménez

- siehe oben

Nachweis mittels Immunfluoreszenz

- siehe oben
- Deckgläser im Methanolüberstand aufschütteln und mit Pinzette dem Röhrchen entnehmen
- mit Mikroskopierkleber (Entellan) auf dem Objektträger befestigen (Zellschicht nach oben) und mindestens 10 min trocknen lassen
- Probe mit 25 µl Testreagenz überschichten
- in feuchter Kammer 15 min bei 37 °C inkubieren
- Objektträger gründlich mit PBS abspülen
- Flüssigkeit auf Fließpapier etwas ablaufen lassen
- einen Tropfen IMAGEN™ - Eindeckmedium auf Probe geben
- mit Deckglas eindecken
- Auswertung unter einem Auflicht-Fluoreszenzmikroskop bei 200- bis 400-facher Vergrößerung

3.1.3 Nachweis *Chlamydia-psittaci*-spezifischer DNA mittels qPCR

Grundlagen

Es werden zwei alternative qPCR-Protokolle empfohlen, die idealerweise beide durchgeführt werden sollten. Sie stellen jeweils eine Duplex-PCR mit interner Amplifikationskontrolle dar und wurden im nationalen Referenzlabor (NRL) bei einer Vielzahl von Untersuchungen eingesetzt. Die bei der internen Validierung erzielten Ergebnisse weisen sie als spezifische, sensitive und reproduzierbare Methoden aus. Das erste Protokoll beruht auf der Amplifikation eines spezifischen Fragments des *ompA*-Gens von *C. psittaci* (PANTCHEV *et al.*, 2009) und kann *C. psittaci*-Stämme klar von nah verwandten *C. abortus*-Stämmen abgrenzen. Allerdings werden einige Stämme des Genotyps C nicht detektiert, wodurch die Methode an Sensitivität verliert. Das zweite Protokoll amplifiziert ein Fragment des *incA*-Gens des Erregers (MENARD *et al.*, 2006) und detektiert alle bekannten Genotypen. Es treten jedoch Kreuzreaktionen mit *C. abortus*-Stämmen auf, so dass die Methode nicht absolut *C. psittaci*-spezifisch ist.

Probenaufarbeitung (DNA-Extraktion)

Infizierte Zellkulturen

- 1 ml Kultur in einem Eppendorf-Tube 10 min bei 14,000 rpm zentrifugieren
- Pellet in 200 µl PBS-Puffer (10 mM Na₂HPO₄, 10 mM NaH₂PO₄, 0,145 M NaCl, pH 7,0) resuspendieren
- mit kommerziellen Kit nach Herstellerangaben aufarbeiten (z. B. High Pure PCR Template Preparation Kit, Roche)
- bei Bedarf DNA zur Aufkonzentration aus Eluat mit 0,6 VT Isopropanol (30 min, RT) fällen, zentrifugieren (mind. 12,000 g, 10 min) und Präzipitat in 20 µl Tris-Puffer (10 mM) lösen

Psittakose/Ornithose (*Chlamydia psittaci*)

Gewebeproben

- ca. 25 mg zerkleinertes Gewebe in 200 µl Lysepuffer des High Pure PCR Template Preparation Kit suspendieren
- nach Herstellerangaben aufarbeiten
- bei Bedarf DNA zur Aufkonzentration aus Eluat mit 0,6 VT Isopropanol (30 min, RT) fällen, zentrifugieren (mind. 12,000 g, 10 min) und Präzipitat in 20 µl Tris-Puffer (10 mM) lösen

Tupferproben

- trockene Tupfer (z. B. Kottupfer) direkt in 200 µl Lysepuffer eines kommerziellen Präparationskits (z. B. High Pure PCR Template Preparation Kit, Roche) aufnehmen und nach Herstellerangaben weiterverarbeiten
- feuchte Tupfer auspressen in einer halb abgeschnittenen 1-ml-Pipettenspitze in einem zweiten Röhrchen nochmals 2 min zentrifugieren, um Restflüssigkeit zu gewinnen
- Probenflüssigkeit vereinigen und 15 min bei 14,000 rpm zentrifugieren
- Pellet in 200 µl Lysepuffer eines kommerziellen Präparationskits (z. B. High Pure PCR Template Preparation Kit, Roche) aufnehmen und nach Herstellerangaben weiterverarbeiten

Amplifikation

Folgende Primer und Sonden kommen zum Einsatz:

Tabelle 3: *Chlamydia-psittaci*-spezifische Primer und Sonden

	Primer	Sonde	Nukleotidsequenz (5'-3')
PCR1	Cpps-F		CAC TAT GTG GGA AGG TGC TTC A
	Cpps-R		CTG CGC GGA TGC TAA TGG
		Cpps-S	FAM-CGC TAC TTG GTG TGA C-BHQ1 (<i>MGB-Sonde</i>)
PCR2	F1-incA-Cpsi		GCCATCATGCTTGTTCGTTT
	R1-incA-Cpsi		CGGCGTGCCACTTGAGA
		S-Cpsi-incA-NM	FAM-TCATTGTCATTATGGTGATTCAGGA-MGBNFQ

Amplikonlänge: 76 bp bzw. 74 bp

Tabelle 4: Primer und Sonde für die interne Amplifikationskontrolle

Template-DNA*	INTYPE-IC-DNA (Qiagen)	Dosierung 0,25 µl je Reaktion (500 Kopien)
Primer 1	EGFP-1-F	GAC CAC TAC CAG CAG AAC AC
Primer 2	EGFP-10-R	CTT GTA CAG CTC GTC CAT GC
Sonde	EGFP-HEX	HEX-AGC ACC CAG TCC GCC CTG AGC A-BHQ1

Amplikonlänge: 177 bp

*Erhältlich bei Indical Bioscience Leipzig, Cat. IC289980
Qiagen, Labordiagnostik Leipzig, Cat. 289980

Psittakose/Ornithose (*Chlamydia psittaci*)

Die Amplifikation wird in für qPCR geeigneten 96-Well-Platten in 25 µl-Ansätzen durchgeführt. Ein Reaktionsansatz enthält:

12,5 µl	rtPCR Mastermix 2X (enthält Taq DNA-Polymerase, dNTPs, MgCl ₂ , Enhancer u. a.)
je 2,0 µl	Primerlösung (Endkonzentration 800 nM)
1,0 µl	Sonde (Endkonzentration 200 nM)
2 µl	IC2-Primer-Sonden-Mix (F : R : S = 2 : 2 : 1; Endkonz. 800 nM : 800 nm : 400 nM)
0,25 µl	INTYPE-IC-DNA-Template (enthält 500 Kopien)
2,0 µl	Proben-DNA
3,25 µl	H ₂ O entionisiert

Für jede **Probe** sind mindestens zwei Wells vorzusehen (Doppelbestimmung). Nach erfolgter Pipettierung werden die Platten an der Oberseite mit Plastikfolie versiegelt und 30 Sek. bei 1000 rpm zentrifugiert.

Als **Kopienstandards** benutzt man die Verdünnungsreihe eines DNA-Extraktes aus der Zellkultur eines bekannten Chlamydienstammes mit definiertem Gehalt an einschlussbildenden Einheiten (EBE). Wenn eine quantitative Auswertung beabsichtigt ist, werden Konzentrationen von 10⁴ bis 10⁻¹ Kopien pro µl jeweils doppelt aufgetragen.

Die **Reagenzienkontrollen** (NTC, non-template controls) enthalten die gleichen Volumina an universellem Master Mix, Primern und Sonde, aber 2 µl Wasser anstelle des DNA-Template.

Temperatur-Zeit-Profil (Standardprogramm des Cyclers):

	2 min	50 °C
	10 min	95 °C
45 Zyklen	15 Sek.	95 °C
	60 Sek.	60 °C

Auswertung

Als **positives** Ergebnis gilt, wenn eine Probe in beiden Ansätzen einen Cq-Wert (Schnittpunkt der Amplifikationskurve mit dem Schwellenwert) von unter 36 erreicht. Werden höhere Cq-Werte erreicht (36,0 bis 40,0), gilt das Ergebnis als **fraglich** und die jeweilige Probe muss nochmals analysiert werden.

Falls die **NTC-Kontrollen** in mindestens einem Falle einen Cq-Wert unter 40 zeigen, ist die betreffende Probenserie zu wiederholen.

Die Cq-Werte der *internen Amplifikationskontrolle* (IC, Signal HEX) sollen sich in einem Bereich von 26,0 bis 32,0 bewegen und untereinander relativ einheitlich sein (Variationsbreite unter den Proben eines Laufes max. 2 Cq-Einheiten). Sobald eine als Chlamydien-negativ beurteilte Probe einen stark abweichenden Cq-Wert der IC zeigt, ist diese zu wiederholen.

Psittakose/Ornithose (*Chlamydia psittaci*)

Tabelle 5: Richtlinie für die Bewertung

Cq-Wert des spezifischen Signals (hier: Bewertung FAM)	
2x < 36	Positiv
2x 36 – 40	fraglich positiv (Wiederholung)
1x < 36, 1x kein Cq	fraglich positiv (Wiederholung)
1x 36 – 40, 1x kein Cq	fraglich negativ (Wiederholung)
2x kein Cq	Negativ

3.2 *Chlamydia-psittaci*-Antikörpernachweise

Serologische Untersuchungen dienen vor allem zur Diagnose von subklinischen persistierenden Chlamydieninfektionen, da bei dieser Verlaufsform i. d. R. keine Erreger ausgeschieden werden. Sie ist die häufigste Form bei adulten Vögeln. Zum Nachweis von Antikörpern gegen *C. psittaci* dienen die Komplementbindungsreaktion (KBR) oder das ELISA-Verfahren. Lange Zeit stellte die KBR den einzigen Test zum Nachweis von Antikörpern dar. Da bei Vögeln nach einer Chlamydieninfektion nur geringe Mengen an komplementbindenden Antikörpern gebildet werden, ist die Methode allerdings ungeeignet. Sie erlaubt weder eine Speziesunterscheidung noch eine Differenzierung zwischen den Antikörperklassen.

Zurzeit existiert kein kommerzielles, vom FLI zugelassenes ELISA-Verfahren für die serologische Diagnostik der aviären Chlamydiose.

Positive serologische Befunde besitzen **keine seuchenrechtliche Relevanz** und dienen nicht zur Seuchenfeststellung.

Anhänge

Anhang Medien, Puffer, Chemikalien

Transportmedium (SPGA-Stabilisator)

Bovarnick, M.R.; Miller, J.C., and Snyder, J.C. (1950) Journal of Bacteriology, 59, 509-522

Medium zum Transport von Tupfern, Herstellen von Organanreibungen und Kryokonservieren von Chlamydienstämmen

Saccharose	74,60 g
KH ₂ PO ₄	0,52 g
K ₂ HPO ₄	1,25 g
L-Glutaminsäure (Na-Salz)	0,92 g
bovines Albumin, Fraktion V	1,00 g
Aqua bidest.	ad 1000 ml

- Substanzen in angegebener Reihenfolge in Aqua bidest. lösen (außer bovines Albumin)
- bis zum Eichstrich auffüllen, danach bovines Albumin zugeben und lösen
- sterilfiltrieren, portionieren und bei -20 °C lagern

- Bevorratung ohne antibiotische und antimykotische Zusätze
- Zusätze frisch zugeben und Medium innerhalb von 24 h verbrauchen

Nystatin-Stammlösung:

45 g in 5 ml Aqua dest. lösen → Endkonzentration im Medium 25 E/ml

Gentamicin-Stammlösung:

400 mg in 10 ml Aqua dest. lösen → Endkonzentration im Medium 40 µg/ml

Vancomycin-HCL-Stammlösung:

250 mg in 10 ml PBS lösen → Endkonzentration im Medium 25 µg/ml

- alle drei Stammlösungen vereinigen und in Portionen zu je 250 µl abfüllen
- Zugabe von 250 µl zu 100 ml Medium ergibt die gewünschte Endkonzentration

Psittakose/Ornithose (*Chlamydia psittaci*)

Karbolfuchsinlösung für Färbung nach Giménez

Stammlösung

- 100 ml 10%ige Fuchsinlösung (10 g Fuchsin gelöst in 100 ml 95%igem Ethanol)
- + 650 ml Aqua dest.
- + 250 ml 4%iges wässriges Phenol
 - vor Gebrauch 48 h bei 37 °C stehen lassen
 - Stammlösung 10 Monate haltbar

Gebrauchslösung

- 40 ml Stammlösung
- + 100 ml PBS pH-Wert 7,2
 - Haltbarkeit 40 h
 - direkt vor Gebrauch filtrieren

Malachitgrünlösung für Färbung nach Giménez (0,8%ig)

- 8 g Malachitgrünoxalat in 1000 ml Aqua dest. lösen
 - vor Gebrauch filtrieren

Medien für Zellkulturen, Suspensionsmedien und Puffer

Zellkulturmedium EMEM

- 500 ml Minimum Essential Medium Eagle (EMEM) mit Earle's Salzen und NaHCO₃ ohne L-Glutamin
- + 5 ml einer 200 mmol Glutaminlösung (z. B. von Lonza) → Endkonz. 2 mmol/ml
- + 5 % fetales Kälberserum (FKS) (z. B. von PAA)
 - fest verschlossen im Kühlschrank bei 4 °C ± 2 °C lagern, nicht unnötig erwärmen und innerhalb von 4 Wochen nach Zugabe der Zusätze verbrauchen

EMEM mit Zusätzen für Chlamydienanzüchtung

- EMEM-Herstellung siehe oben
- Zusätze frisch zugeben und Medium am Tag der Zugabe verbrauchen

Amphotericin B-Stammlösung:

25 mg in 10 ml Aqua dest. lösen → Endkonzentration im Medium 2,5 µg/ml

Gentamicin-Stammlösung:

100 mg in 10 ml Aqua dest. lösen → Endkonzentration im Medium 10 µg/ml

Vancomycin-HCL-Stammlösung:

250 mg in 10 ml Aqua dest. lösen → Endkonzentration im Medium 25 µg/ml

Psittakose/Ornithose (*Chlamydia psittaci*)

- alle drei Stammlösungen vereinigen und in Portionen zu je 300 µl abfüllen und bei ≤ -18 °C einfrieren. Zugabe von 100 µl zu 100 ml Medium ergibt die gewünschte Endkonzentration

Trypsin-EDTA-Lösung (pH-Wert 7,2 - 7,3)

NaCL	8,0 g
KCL	0,8 g
Glucose	1,0 g
NaHCO ₃	0,58 g
Trypsin	0,5 g
EDTA	0,2 g
Aqua bidest.	ad 1000 ml

- Substanzen in angegebener Reihenfolge in Aqua bidest. lösen, dann pH-Wert einstellen
- bis zum Eichstrich auffüllen, sterilfiltrieren, portionieren und bei ≤ -18 °C einfrieren

PBS (pH-Wert 7,2 - 7,4) ohne Ca- und Mg-Ionen

(Puffer zum Waschen der Zellen vor dem Umsatz)

NaCL	8,0 g
KCL	0,2 g
Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O	2,31 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
Aqua bidest.	ad 1000 ml

- Substanzen in angegebener Reihenfolge in Aqua bidest. lösen, dann pH-Wert einstellen
- bis zum Eichstrich auffüllen, sterilfiltrieren, portionieren und im Kühlschrank lagern

PBS (pH-Wert 7,2-7,4) mit Ca- und Mg-Ionen

(Puffer zum Waschen der Zellen ohne Umsatz)

NaCL	8,0 g
KCL	0,2 g
Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O	2,31 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g

Psittakose/Ornithose (*Chlamydia psittaci*)

MgCl ₂	0,0468 g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,132 g
Aqua bidest.	ad 1000 ml

- Substanzen in angegebener Reihenfolge in Aqua bidest. lösen, dann pH-Wert einstellen
- bis zum Eichstrich auffüllen, sterilfiltrieren, portionieren und im Kühlschrank lagern

Suspensionsmedium für Verreibungen

Basismedium mit 0,1 % Tween 20, jedoch ohne Zusatz von NEAA, Antibiotika und Antimycotika

Anhang Zellkultur

Verwendet wird die permanente Buffalo Green Monkey (BGM)-Zelllinie (ATCC CCL 26, BS-C-1 [Kidney, African Green Monkey, *ceropithecus aethiops*]) (Angaben in Klammern für Zellkulturflaschen T75)

Anzucht in Zellkulturflaschen

- bewachsene Zellkulturflasche leicht schwenken, umdrehen und Medium absaugen
- 1x mit 5 ml (10 ml) PBS-Puffer waschen, um abgestorbene Zellen, Medienbestandteile und Stoffwechselprodukte zu entfernen und absaugen
- 2 ml (5 ml) Trypsin-EDTA-Lösung auf Zellrasen geben und 5 bis 10 min bei 37 °C einwirken lassen, gelegentlich schwenken und klopfen

Hinweise: Zeitangabe nur Richtwert, Einwirkzeit abhängig von dem Alter der Zellen und dem Alter der Trypsin-EDTA-Lösung

Sichtkontrolle makroskopisch: Zellen fließen mit der Flüssigkeit am Flaschenboden herunter

Sichtkontrolle mikroskopisch: Großteil der Zellen schwimmt in abgekugelter Form in der Flüssigkeit

- 2 ml (5 ml) Zellkulturmedium zugeben (das im Medium enthaltene Serum neutralisiert sofort die Wirkung des Trypsins und teilweise den zytotoxischen Einfluss des EDTA)
- Zellen mittels Pipette gründlich suspendieren und in Röhrchen geben
- Suspension 12 min bei 1500 U/min und 18 °C zentrifugieren
- Überstand sofort vorsichtig absaugen, sonst Zellschädigung durch EDTA (Anwesenheit von EDTA erschwert außerdem die erneute Anheftung der Zellen bei der Aussaat)
- 2 ml (4 ml) Kulturmedium auf Zellpellet geben und gründlich resuspendieren, um die Zellen zu vereinzeln
- Zellen nach Umsatzrate (z. B. 1 : 5) umsetzen oder Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer bestimmen
- Kulturmedium in Zellkulturflasche vorlegen und errechnete Menge Zellsuspension zugeben und durch Schwenken gleichmäßig verteilen

Psittakose/Ornithose (*Chlamydia psittaci*)

- Inkubation im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂
- bei Zellkulturflaschen ohne Sterilfilter in der Verschlusskappe diese ca. eine halbe Umdrehung aufschrauben, um den Gasaustausch zu gewährleisten

Nach zwei bis vier Tagen erfolgt die Ausbildung eines geschlossenen Zellrasens (abhängig von der Einsattdichte der Zellen).

Anzucht in Röhrchen mit Deckglas

- Zellen umsetzen wie oben beschrieben
- nach Bedarf entsprechende Menge Zellsuspension mit einer Zelldichte von 1×10^5 /ml herstellen
- 1 ml je Röhrchen einfüllen, auf gleichmäßige Durchmischung achten, da Zellen sich schnell absetzen
- Röhrchendeckel etwas aufschrauben, um Gasaustausch zu gewährleisten
- Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂
- nach 1 h kontrollieren, ob noch alle Deckel locker sind

Hinweis: Bei festgesaugtem Deckel und dadurch verhindertem Gasaustausch bleibt die Mediumfarbe unverändert, während sich das Medium durch den Gasaustausch etwas orange verfärbt.

Nach zwei bis drei Tagen erfolgt die Ausbildung eines geschlossenen Zellrasens (mikroskopische Kontrolle!).

Psittakose/Ornithose (*Chlamydia psittaci*)

Anhang Materialien und Geräte für die Real-Time-PCR

Verzeichnis der Reagenzien

PBS-Puffer (10 mM Na₂HPO₄, 10 mM NaH₂PO₄, 0,145 M NaCl, pH 7,0)

High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics) oder vergleichbares Produkt zur DNA-Extraktion aus klinischen Proben

Isopropanol z.A.

Tris-Puffer 10 mM

Lysepuffer (100 mM Tris, pH 8.5, 0.05 % Tween 20)

Proteinase K (1%ige Lösung, w/v)

Reinstwasser

TaqMan Universal MasterMix (Fa. Applied Biosystems, Weiterstadt) oder gleichwertiges Produkt eines anderen Herstellers, enthält Hot-Start *Taq*-DNA-Polymerase, Reaktionspuffer, dNTPs und Farbstoffe

Primer und Sonden (siehe Tabellen 3 und 4)

Verzeichnis der Geräte

GeneAmp® 7700 (oder 5700) Sequence Detection System (Applied Biosystems) oder Mx3000 Real-Time PCR System (Stratagene, Amsterdam)

Vortexschüttler

Tischzentrifuge

Laborzentrifuge mit Rotor für Mikrotiterplatten, z. B. Biofuge Stratos (Kendro Laboratory Products, Langenselbold)

Automatische Pipetten, 0,1 - 2,5 µl, 0,5 - 10µl, 2 - 20 µl, 10 - 100 µl, 20 - 200 µl und 100 - 1000 µl

Mehrkanalpipette, z. B. 8-Kanalpipette 10 - 100 µl

Verzeichnis der Verbrauchsmaterialien

MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plates (Applied Biosystems) oder andere für Real-Time-PCR geeignete Mikrotiterplatten

Thermische Verschließfolie, z. B. MicroAmp Clear Adhesive Films (Applied Biosystems) oder Adhesive Plate Seal (Biodeal, Markkleeberg)

Filterspitzen für o. g. automatische Pipetten

Reaktionsgefäße 0,2 ml, dünnwandig (für PCR)

Reaktionsgefäße 1,65 ml und 2,0 ml (für Probenaufbereitung)

Einmalhandschuhe (bei allen Arbeitsschritten zu tragen)

Literatur

- ANDERSEN, A.A (1997): Two new serovars of *Chlamydia psittaci* from North American birds. J Vet Diagn Invest 9:159-164
- GEENS, T., DESPLANQUES, A., VAN LOOCK, M., BÖNNER, B.M., KALETA, E.F., MAGNINO, S., ANDERSEN, A.A., EVERETT, K.D.E., VANROMPAY, D. (2005): *Chlamydophila psittaci ompA* sequencing reveals the new genotype E/B and the need for a rapid discriminatory genotyping method. J Clin Microbiol 43:2456-2461
- JANECZEK, F. (1989): *Chlamydia psittaci* - Diagnostik bei *Psittaciformes*: Vergleichendes Untersuchungen zum Antigennachweis in der Zellkultur und im ELISA sowie zum Antikörpernachweis in der Komplementbindungsreaktion und im Blocking ELISA. Vet Diss München
- KALETA E.F. (1997): Aktuelle Fragen der Diagnose und Bekämpfung der Psittakose. Tierärztl Umschau 52, 36-44
- MENARD, A., CLERC, M., SUBTIL, A., MEGRAUD, F., BEBEAR, C., DE BARBEYRAC, B., 2006. Development of a real-time PCR for the detection of *Chlamydia psittaci*. J. Med. Microbiol. 55, 471-473
- NÜCHTER, H., SACHSE, K., KALETA, E.F. (2004) Die aviäre Chlamydiose und ihre Bekämpfung in der Europäischen Union. Amtstierärztlicher Dienst und Lebensmittelkontrolle, 11, 97-102 (Teil 1) und 189-194 (Teil 2)
- PANTCHEV, A., STING, R., BAUERFEIND, R., TYCZKA, J., SACHSE, K. (2009) New real-time PCR tests for species-specific detection of *Chlamydophila psittaci* and *Chlamydophila abortus* from tissue samples. Vet. J. 181, 145-150
- VANROMPAY, D., BUTAYE, P., SAYADA, C., DUCATELLE, R., HAESEBROUCK, F. (1997): Characterization of avian *Chlamydia psittaci* strains using *omp1* restriction mapping and serovar-specific monoclonal antibodies. Res Microbiol 148:327-333