FRIEDRICH-LOEFFLER-INSTITUT
FLI
Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Federal Research Institute for Animal Health

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 *omp*A-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, Küken, Fasan, Pute	**mittel**
C	**Ente**, Schwan, Gans	**hoch** (insbesondere in Farmen, Schlacht- und Federverarbeitungsbetrieben)
D	**Pute**	**hoch** (insbesondere in Farmen, Schlacht- und Federverarbeitungsbetrieben)
E	**Taube**, Ente Pute, Strauß, Nandu	**hoch** (identisch mit humanem Isolat von 1934; Tauben sind Reservoir; 20 % der Taubenisolate gehören zum Serovar II; eng verwandt mit A und B)
F	Sittich (bisher ein Isolat)	**nicht bekannt** (evtl. neuere Mutation; evtl. Vorkommen in noch wenig untersuchten 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 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**[1]. 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).

[1] Gesetz zur Vorbeugung vor und Bekämpfung von Tierseuchen (Tiergesundheitsgesetz – TierGesG) vom 22. Mai 2013 (BGBl. I S. 1324)
Verordnung über meldepflichtige Tierkrankheiten in der Fassung der Bekanntmachung vom 11. Februar 2011 (Bundesgesetzblatt I Seite 252), zuletzt geändert durch Artikel 5 der Verordnung vom 17. April 2014 (Bundesgesetzblatt I S. 388)

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 angestrengte Atmung beobachtet. Konjunktivitis und Keratokonjunktivitis treten bei manchen Vogelarten nicht auf, bei anderen (Tauben, Neophemaarten, 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	**Inkubations-zeit in Tagen**	**Krankheits-dauer**	**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**
Aktivierte persistierende Form	> 3 Monate bis Jahre	> 2 Monate	Aktivierung durch endogene u. exogene Faktoren, dann Apathie, Anorexie, Diarrhoe, Kachexie, respiratorische Symptome

Vögel mit chronischer Psittakose sind meistens anämisch. Das Serum-Gesamtprotein bewegt sich, bedingt durch Dehydration und Anstieg von g - und b -Globulinen Globulinen, an der Obergrenze der Norm oder ist leicht erhöht. Bei infizierten Vögeln können Leukozytenzahlen von über 10.000/mm^3 festgestellt werden. Erhöhte Lactat-Dehydrogenase (LDH) und Aspartat-Aminotransferase (AST) Serumwerte weisen auf eine

Schädigung der Leber hin, erhöhte Harnsäure- und Kreatininwerte auf eine renale Dysfunktion (zit. nach JANECZEK, 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 2334

1.6 Rechtsgrundlagen

- Gesetz zur Vorbeugung vor und Bekämpfung von Tierseuchen (Tiergesundheitsgesetz – TierGesG) vom 22. Mai 2013 (BGBl. I S. 1324)
- Verordnung über das innergemeinschaftliche Verbringen sowie die Einfuhr und Durchfuhr von Tieren und Waren (Binnenmarkt-Tierseuchenschutzverordnung - BmTierSSchV). In der Fassung der Bekanntmachung vom 6. April 2005 (BGBl. I S. 997) zuletzt geändert durch: Artikel 1 der Verordnung vom 17. April 2014 (BGBl. I S. 388)
- Verordnung über meldepflichtige Tierkrankheiten in der Fassung der Bekanntmachung vom 11. Februar 2011 (Bundesgesetzblatt I Seite 252), zuletzt geändert durch Artikel 5 der Verordnung vom 17. April 2014 (Bundesgesetzblatt I S. 388)

2. Untersuchungsmaterial

2.1 Untersuchungsmaterial für direkten Antigennachweis und Chlamydienanzüchtung

Verendete Vögel bzw. deren Organe (Milz, Lunge, Leber, Niere, Luftsäcke, Herzbeutel)
Möglichst zellreiche Tupferproben[2] (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 transportiert werden. Zusätzlich können kommerziell verfügbare Transportmedien[3] bzw. das in der Anlage angegebene Medium verwendet werden. Können die Proben nicht innerhalb von 24 h aufgearbeitet werden, müssen sie bei < -76 °C eingefroren werden (ohne Transportmedium!).

2.2 Untersuchungsmaterial für den Antikörpernachweis

Nativblutproben[4] (Blut ohne Stabilisator), Serum

Im Anschreiben ist anzugeben:

- Wer sendet ein? (Veterinäramt, Bearbeiter; inkl. dienstlicher und eventuell privater Telefon- und Fax-Nummer)
- 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 mit entsprechenden Sicherheitsvorkehrungen (Biohazard-Werkbänke bzw. L3-Laboratorien) vorzunehmen. Aufgrund der aerogenen Übertragbarkeit der Erreger haben Ultraschallarbeiten, Zentrifugationsschritte u. a. grundsätzlich im geschlossenen System zu erfolgen.

---

[2] 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.

[3] Kommerziell verfügbare Transportmedien, z. B. von Dako oder SPGA-Stabilisator, siehe Anhang

[4] 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.

3.1 Antigennachweismethoden

Für den Nachweis von *Chlamydia-psittaci*-Antigen werden folgende drei Labormethoden beschrieben:

3.1.1 Direktnachweis[5] von *C.-psittaci*-Einschlusskörperchen durch histologische Färbemethoden bzw. von *C.-psittaci*-Antigen mittels Immunfluoreszenz

Herstellung der Abklatsch bzw. Tupferpräparate

Bewährt hat sich folgendes Verfahren:

Herstellung von Abklatschpräparaten auf fettfreien Objektträgern (Organe, Tupfer). Bei Einsendung von Tupfern ohne Transportmedium sind die Tupfer direkt auf die Objektträger auszustreichen. Werden diese mit Transportmedium eingesandt, so sind sie 15 Sek. auf einem Vortex-Schüttler zu mischen, die Suspension ist nach Entfernen des Tupfers für 5 bis 10 min bei 800 x g zu zentrifugieren und nach vorsichtigem Abhebern des Mediums das Sediment z. B. mit einer Platinöse auf Objektträger auszustreichen.

Präparate lufttrocknen

Präparate fixieren

Fixierung für Giménez-Färbung: 30 min in 96%igem Ethanol p.A., lufttrocknen;

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

[5] Bedingung für den direkten Nachweis von Chlamydienantigen mittels histologischer bzw. fluoreszenzserologischer Methoden ist eine ausreichende Anzahl von Zellen. Da bei negativem Ergebnis weitere Untersuchungen (Zellkulturmethode bzw. Antigen-ELISA) 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*)

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 an. Der Hintergrund zeigt eine grünliche Färbung. Die Einschlusskörperchen sind von Artefakten einmal durch ihre Lage in der Zelle und zum anderen 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 sicheren Ausschluss einer Chlamydieninfektion ein Zellkulturverfahren durchzuführen.

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

Beachte:

Alle Laborarbeiten zum Erregernachweis sind mit entsprechenden Sicherheitsvorkehrungen (Biohazard-Werkbänke bzw. L3-Laboratorien) vorzunehmen. Bei Ultraschallarbeiten sind zusätzlich Atemschutzmasken zu tragen.

Vorbereitung des Untersuchungsmaterials

Tupferproben

Tupfer mit Transportmedium[6]

für 15 Sek. auf einem Vortex-Schüttler homogenisieren

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

Tupfer ohne Transportmedium

Röhrchen mit 2 ml Transportmedium auffüllen, 10 min bei Zimmertemperatur stehen lassen und anschließend wie die mit Transportmedium versandten Tupfer behandeln

Organmaterialien

Ca. 1 g Organmaterial im Mörser unter Zusatz von sterilem Seesand oder mit einem Ultraturrax homogenisieren, in 10 ml Transportmedium aufnehmen und in 15-ml-Zentrifugenröhrchen überführen. Zur sicheren Freisetzung der Chlamydien aus den Zellen die Proben dreimal mit Ultraschall behandeln.

ca. 10 min stehen lassen (Sedimentation der "groben" Bestandteile) und Überstand in ein Zentrifugenröhrchen (mit Schraubverschluss) überführen

Zentrifugation der Organanreibung bei 500 x g für 15 min bei 18 °C

Überstand zum Beimpfen der vorbereiteten Zellkulturen verwenden

[6] a.a.O., Fußnote 3

Hinweis: Zellkultur möglichst gleich beimpfen; bei Leberanreibungen Vorverdünnung von 1:10 vornehmen (Material sehr aggressiv für Zellen)

Einzel- und Sammelkotproben

1 g Kot im Mörser unter Zusatz von sterilem Seesand oder mit einem Ultraturrax homogenisieren; Herstellung einer 10%igen Suspension mit Transportmedium

Homogenisate ca. 10 min stehen lassen (Sedimentation der "groben" Bestandteile) und Überstand in ein Zentrifugenröhrchen (möglichst mit Schraubverschluss) überführen

Zentrifugation bei 500 x g für 15 min bei 18 °C

Probe möglichst gleich auf die Zellkultur bringen

Kotproben sind oftmals so stark kontaminiert, dass auch die obligat zugesetzten Antibiotika eine Verunreinigung der Zellkultur nicht verhindern können. Eine vorherige Filtration durch einen Spritzenfilter der Porengröße 0,45 µm ist deshalb zu empfehlen.

Einzel- und Sammelkotproben in Transportmedium

Homogenisierung der im Transportmedium eingesandten Kotmaterialien mit einem Vortexschüttler

Herstellung einer 10%igen Lösung mit Transportmedium

Homogenisate ca. 10 min stehen lassen (Sedimentation der "groben" Bestandteile)

Überstand in ein Zentrifugenröhrchen (mit Schraubverschluss) überführen

weiteres Vorgehen wie oben beschrieben

Beimpfen der Zellkulturen

Vorbereitung der Zellkultur

Verwendet wird die permanente Buffalo-Green-Monkey (BGM)-Zelllinie (siehe Anhang 2). 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. $1x10^5$ Zellen/ml) eingestellt. Nach Aussaat werden die Kulturen bis zur Beimpfung mindestens 24 Stunden bei 37 °C im CO_2-Brutschrank bebrütet. Der Zellrasen wird mikroskopisch auf Konfluenz geprüft (evtl. erst nach 2 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 von 1x105 ml) entsprechend folgendem Schema beimpfen:

- 1 Rö: 30 µl Überstand
- 2 Rö: 100 µl Überstand
- 1 Rö: 300 µl Überstand

Aufzentrifugation des Überstandes auf die Zellen zur Unterstützung der Anheftung von Chlamydien an die Zellen bei 3,400 x g für 1 h bei 37 °C im geschlossenem System, dafür z. B. Zentrifuge Rotanta 96 RS mit ausschwingbarem Rotor verwenden
Inkubation für zwei Stunden bei 37 °C und 5 % CO_2 (Deckel für Gasaustausch etwas aufschrauben) (Anhang 1)

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 1)
Inkubation der beimpften Zellkulturen bei 37 °C und 5 % CO_2
Nächster Mediumwechsel nach 18 h
Nach weiteren 48 h Zellrasen mikroskopisch beurteilen: wenn Zellrasen bei allen drei Beimpfungsmengen noch fest ist, Deckgläschen von Röhrchen mit 100 µl Überstand 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), Chlamydiensuspension zum Typisieren geben, chlamydieninfizierte Zellkulturröhrchen bei £ -76 °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

Infizierten Überstand aus den Röhrchen pipettieren und für Passagierung in sterile Röhrchen überführen bzw. direkt auf vorbereitete BGM-Zellen geben

einmal kurz mit Methanol spülen und anschließend 10 min mit Methanol fixieren

- Zellen vor dem Fixieren nicht trocken werden lassen, da sonst Ruptur der Einschlüsse möglich
- Deckglaskulturen im Röhrchen fixieren

Färbung nach Giménez (siehe oben)

Der Test ist valide, wenn Negativ- und Positiv-Kontrollen entsprechend ausgewertet werden können.

Nachweis mittels Immunfluoreszenz

Für den Immunfluoreszenz-Nachweis von Chlamydienantigen stehen verschiedene kommerzielle Konjugate zur Verfügung. Die Durchführung ist nach der entsprechenden Produktinformation durchzuführen[7].

Test der Firma Dako: Der Fluoresceinisothiocyanat (FITC) - konjugierte, gattungsspezifische monoklonale Antikörper richtet sich gegen das auf der Oberfläche aller bekannten Chlamydienstämme vorkommende Lipopolysaccharid (LPS).

Deckgläser mit Pinzette dem Röhrchen entnehmen, mit Mikroskopierkleber (Entellan) auf dem Objektträger befestigen (Zellschicht nach oben) und trocknen lassen.

Probe mit 25 µl Testreagenz überschichten

in feuchter Kammer 15 min bei 37 °C inkubieren

Objektträger mit PBS abspülen und anschließend 5 min im PBS- Schüttelbad waschen

Flüssigkeit auf Fließpapier etwas ablaufen lassen

einen Tropfen IMAGEN ™ - Eindeckmedium auf Probe geben

mit Deckglas eindecken

Auswertung unter einem Auflicht-Fluoreszenzmikroskop bei 400- bis 1000-facher Vergrößerung

Der Test ist valide, wenn Negativ- und Positiv-Kontrollen entsprechend ausgewertet werden können.

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

Grundlagen

Das nachstehende Verfahren wurde am CVLUA Stuttgart in Zusammenarbeit mit dem nationalen Referenzlabor für Psittakose (NRL) entwickelt und beruht auf der Amplifikation eines spezifischen Fragments aus dem *omp*A-Gen von *C. psittaci*. Es stellt eine Duplex-PCR mit interner Amplifikationskontrolle (IC2) dar und wurde im NRL bei einer Vielzahl von Untersuchungen eingesetzt. Die bei der internen Validierung er-

[7] Bei den Konjugaten z. B. der Fa. Medac, Hamburg bzw. DAKO, Hamburg handelt es sich um FITC (Fluorescein-Iso-Thio-Cyanat)-gebundene, monoklonale Antikörper gegen ein allen Chlamydienarten gemeinsames, genus-spezifisches Lipopolysaccharid (LPS).

zielten Ergebnisse weisen es als spezifische, sensitive und reproduzierbare Methode aus. Darüber hinaus hat sich diese Methode in einem bundesweiten Ringversuch des NRL Psittakose im Jahre 2006 als sehr zuverlässig erwiesen. Benötigte Reagenzien und Geräte sind dem Anhang 3 zu entnehmen.

Probenaufarbeitung (DNA-Extraktion)

Infizierte Zellkulturen

1ml Kultur werden in einem Eppendorf-Tube 10 min bei 14,000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wird in 200 µl PBS-Puffer (10 mM Na_2HPO_4, 10 mM NaH_2PO_4, 0,145 M NaCl, pH 7,0) resuspendiert. Zur DNA-Extraktion verwendet man das High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche), bei welchem die DNA nach der Zelllyse über eine Minisäule gereinigt wird, oder vergleichbare Erzeugnisse anderer Hersteller, wie das QIAamp DNA Mini Kit. Nach Abarbeitung des mitgelieferten Protokolls erhält man ein Eluat von 200 µl, welches zur Aufkonzentrierung der DNA mit 0,6 VT Isopropanol (30 min, RT) gefällt werden kann. Das durch Zentrifugation (mind. 12,000 *g*, 10 min) gesammelte Präzipitat löst man dann in 20 µl Tris-Puffer (10 mM) und setzt davon 1 µl direkt in der PCR ein.

Klinisches Material

Ein **Gewebestück** von ca. 25 mg wird in 200 µl Lysepuffer des High Pure PCR Template Preparation Kit suspendiert und nach dem Protokoll des Herstellers verarbeitet. Nach Abarbeitung dieses Protokolls erhält man ein Eluat von 200µl, welches zwecks Aufkonzentrierung der DNA mit 0,6 VT Isopropanol (30 min, RT) gefällt werden kann. Das durch Zentrifugation (mind. 12,000 *g*, 10 min) gesammelte Präzipitat löst man dann in 20 µl Tris-Puffer (10 mM) und setzt davon 1 µl direkt in der PCR ein.

Tupferproben können nach einem alternativen Verfahren aufgearbeitet werden. Dazu vermischt man die Tupfer mittels Vortex-Schüttler in einem 2ml-Eppendorf-Reagenzröhrchen mit 500 µl Lysepuffer (100 mM Tris, pH 8.5, 0.05 % Tween 20) und zentrifugiert 30 Sek. bei 12,000 rpm. Um sämtliche Flüssigkeit aus dem Tupfer zu gewinnen, wird dieser in einer halb abgeschnittenen 1-ml-Pipettenspitze in einem zweiten Röhrchen nochmals 2 min zentrifugiert. Die Probenflüssigkeit wird vereinigt und 15 min bei 14,000 rpm zentrifugiert. Das Pellet ist in 50 µl Lysepuffer aufzunehmen und mit 20 µl 1%iger Proteinase K zu verdauen (2 h bei 60 °C, dann Inaktivierung 15 min bei 97 °C). Nach 5-minütiger Zentrifugation wird 1 µl des Überstandes als Template eingesetzt. Eine Aufarbeitung des Pellets mit einem kommerziellen DNA-Präparationskit ist ebenfalls möglich.

Amplifikation

Folgende Primer und Sonden kommen zum Einsatz:

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

Primer	Sonde	Nukleotidsequenz (5'-3')
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 *(MGB-Sonde)*

Amplikonlänge: 76 bp

Tabelle 4: Primer und Sonde für die interne Amplifikationskontrolle

Template-DNA*	IC2	Dosierung 0,25 µl je Reaktion (2500 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

* Kloniert und präpariert von Dr. Bernd Hoffmann, FLI Insel Riems

Die Amplifikation wird in für Real-Time-PCR 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 Cpps-F/R (Endkonzentration 800 nM)
1,0 µl	Sonde Cpps-S (Endkonzentration 200 nM)
2 µl	IC2-Primer-Sonden-Mix (F:R:S=1:1:2; Endkonz. 400 nM:400 nm:200 nM)
0.25 µl	IC2 DNA-Template (enthält 250 Kopien)
2,0 µl	Proben-DNA
3,25 µl	H_2O 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 Einschluss-bildenden Einheiten (EBE). Wenn eine quantitative Auswertung beabsichtigt ist, werden Konzentrationen von 10^4 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 1 µl Wasser anstelle des DNA-Templates.

Psittakose/Ornithose (*Chlamydia psittaci*)

Folgendes **Temperatur-Zeit-Profil** wird gefahren (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 Ct-Wert (Schnittpunkt der Amplifikationskurve mit dem Schwellenwert) von unter 36 erreicht. Werden höhere Ct-Werte erreicht (36,0 bis 40,0), gilt das Ergebnis als **fraglich** und die jeweilige Probe muss nochmals gefahren werden.

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

Die Ct-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 Ct-Einheiten). Sobald eine als Chlamydien-negativ beurteilte Probe einen stark abweichenden Ct-Wert der IC zeigt, ist diese zu wiederholen.

Tabelle 5: Richtlinie für die Bewertung

Ct-Wert des spezifischen Signals (hier: Bewertung FAM)	
2x <36	Positiv
2x >36	fraglich positiv (Wiederholung)
1x <36, 1x kein Ct	fraglich positiv (Wiederholung)
1x 36-40, 1x kein Ct	fraglich negativ (Wiederholung)
2x kein Ct	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 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 wenig sensitiv. Sie erlaubt weder eine Speziesunterscheidung noch eine Differenzierung zwischen den Antikörperklassen.

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

4. Anhänge

Anhang Medien, Puffer, Chemikalien

Transportmedien (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_2PO_4	0,52 g
K_2HPO_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 mg 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

- Stammlösungen mischen 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 $NaHCO_3$ ohne L-Glutamin
+ 5 ml einer 200 mmol Glutaminstammlösung (siehe 1.4.2)
→Endkonz. 2 mmol/ml
+ 5 % fetales Kälberserum (FKS) (derzeit Fa. PAA)
→ fest verschlossen im Kühlschrank bei 4 °C ± 2 °C lagern, nicht unnötig erwärmen und innerhalb von 4 Wochen nach Zugabe der Zusätze verbrauchen

Glutaminstammlösung

2,922 g L-Glutamin (zellkulturgetestet) in 100 ml Aqua bidest. lösen, sterilfiltrieren, portionieren und bei ≤ -18 °C einfrieren

EMEM mit Zusätzen für Chlamydienanzüchtung

- EMEM-Herstellung siehe unter 1.4.1
- 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

- Stammlösungen mischen und in Portionen zu je 300 µl abfüllen und bei ≤ -18 °C einfrieren

Zugabe von 300 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

Psittakose/Ornithose (*Chlamydia psittaci*)

Na_2HPO_4 x 12 H_2O	2,31 g
KH_2PO_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_2HPO_4 x 12 H_2O	2,31 g
KH_2PO_4	0,2 g
$MgCl_2$	0,0468 g
$CaCl_2$ x 2 H_2O	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

<u>Suspensionsmedium für Verreibungen</u>
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)

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 ® 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

- 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

- Inkubation im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO_2

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 Einsaatdichte der Zellen).

Anzucht in Röhrchen mit Deckglas
Zelle umsetzen wie oben beschrieben
nach Bedarf entsprechende Menge Zellsuspension mit einer Zelldichte von $1x10^5$/ml herstellen
1ml / Röhrchen einfüllen

- auf gleichmäßige Durchmischung achten, da Zellen sich schnell absetzen

Psittakose/Ornithose (*Chlamydia psittaci*)

Röhrchendeckel etwas aufschrauben, um Gasaustausch zu gewährleisten
Inkubation bei 37 °C und 5 % CO_2
nach 1h kontrollieren, ob noch alle Deckel locker sind

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

nach 2 bis 3 d Ausbildung eines geschlossenen Zellrasens (mikroskopische Kontrolle)

Anhang Materialien und Geräte für die Real-Time-PCR

Verzeichnis der Reagenzien

PBS-Puffer (10 mM Na_2HPO_4, 10 mM NaH_2PO_4, 0,145 M NaCl, pH 7,0)
High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics) od. 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) od. gleichwertiges Produkt eines anderen Herstellers, enthält Hot-Start *Taq*-DNA-Polymerase, Reaktionspuffer, dNTPs und Farbstoffe
Primer: Stammlösung 100 pmol/µl, Arbeitsverdünnung 1:20, ergibt Arbeitskonzentration 5 pmol/µl) (Sequenzen und andere Angaben siehe Tabellen 3 und 4)
Sonde: lösen in 1mM Tris-HCl pH 8.0/0,01mM EDTA, so dass sich eine Konzentration von 5 pmol/µl bzw. 5 µM ergibt; in Portionen zu je 200µl einfrieren. (Sequenzen und andere Angaben siehe Tabellen 3 und 4)

Es handelt sich um eine MGB®-Sonde.

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 (Appl. Biosystems) od. 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)

5. 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

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)

VANROMPAY, D., BUTAYE, P., SAYADA, C., DUCATELLE, R., HAESEBROUCK, F. (1997): Characterization of avian *Chlamydia psittaci* strains using *omp*1 restriction mapping and serovar-specific monoclonal antibodies. Res Microbiol 148:327-333

Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Naumburger Str. 96a, D-07743 Jena, www.fli.bund.de