



*Sveriges lantbruksuniversitet*  
Fakulteten för Veterinärmedicin och husdjursvetenskap  
Institutionen för BVF

# Prevalens av *Chlamydophila psittaci* hos papegojor i fångenskap

Peter Jendelund

*Uppsala*

2010

*Examensarbete inom veterinärprogrammet*

ISSN 1652-8697  
*Examensarbete 2010:79*



# Prevalens av *Chlamydophila psittaci* hos tampapegojor

Peter Jendelund

*Handledare: Lena Olsén, Institutionen för BVF*  
*Biträdande handledare: Jonas Tallkvist, Institutionen för BVF*  
*Examinator: Carina Ingvast-Larsson, Institutionen för BVF*

*Examensarbete inom veterinärprogrammet, Uppsala 2010*  
*Fakulteten för Veterinärmedicin och husdjursvetenskap*  
*Institutionen för Biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap*  
*Kurskod: EX0234, Nivå X, 30hp*

*Nyckelord: Chlamydophila psittaci*

*Online publication of this work: <http://epsilon.slu.se>*  
*ISSN 1652-8697*  
*Examensarbete 2010:79*



# INNEHÅLLSFÖRTECKNING

|  |                  |
|--|------------------|
| Sammanfattning .....                           | 1                |
| Summary .....                                  | 1                |
| Inledning .....                                | 2                |
| Litteraturoversikt .....                       | 3                |
| Organismen <i>Chlamydophila psittaci</i> ..... | 3                |
| Infektion .....                                | 3                |
| Smittspridning .....                           | 4                |
| Vilka drabbas? .....                           | 4                |
| Inkubationstid .....                           | 5                |
| Kliniska symtom .....                          | 5                |
| Provtagning .....                              | 6                |
| Material och metoder .....                     | 8                |
| Ansökan etiska nämnden .....                   | 8                |
| Djurägarmedgivande .....                       | 8                |
| Provtagning och material .....                 | 8                |
| Analys av prover .....                         | 10               |
| Resultat .....                                 | 11               |
| Diskussion .....                               | 14               |
| Konklusion .....                               | 16               |
| Litteraturförteckning .....                    | 17               |
| Djurägarmedgivande .....                       | Bilaga 1 .....18 |

## **SAMMANFATTNING**

*Chlamydophila psittaci* är en vanlig orsak till mer eller mindre allvarliga sjukdomstillstånd hos papegojor. Sjukdomen är även en zoonos som hos människa kan orsaka allvarliga hälsoproblem. Sjukdomen är kraftigt underdiagnostiserad både hos människa och hos fågel. Symtomen hos fåglar är ospecifika och kan tyda på många olika sjukdomar vilket kan göra det svårt att ställa rätt diagnos och behandla därefter. Syftet med studien var att undersöka prevalensen av *C. psittaci* i Mälardalen. För prevalensstudien användes ett ELISAantikroppstest i form utav ett snabbkit som kan användas ute på veterinärkliniker. Som en extra undersökning utfördes även en analys med ett nyligen framtaget PCR-test som ska kunna användas i prospektivt syfte. Därefter skulle provsvaren från de två skilda analyserna jämföras. I studien framkom att 30 % av de undersökta fåglarna var antikroppspositiva för *C. psittaci*. Materialet från PCR-testet var dock kvantitativt för litet för att kunna dra några slutsatser ifrån.

## **SUMMARY**

*Chlamydophila psittaci* is a common cause of diseases in parrots ranging from being less serious to more serious. It is also a zoonotic disease which poses serious health problems to humans. The disease is highly under diagnosed. The symptoms in birds are nonspecific and may be indicative of many different diseases which make it harder to diagnose and treat. The purpose of this study was to investigate the prevalence of *C. psittaci* in Mälardalen, Sweden. The study used the ELISA antibody testkit which can be used in veterinary clinics. As an additional form of investigation, an analysis that is used prospectively was conducted on a newly developed PCR-test. Subsequently, the test responses from these two separate trials were going to be compared. The study revealed that 30 % of the examined birds were positive for the antibody *C. psittaci*. The material from the PCR test was quantitatively too small to draw any conclusions from.

## INLEDNING

*Chlamydophila psittaci* är en organism som kan orsaka sjukdom både hos djur, framför allt hos fåglar och hos människor. Papegojfåglar är populära som sällskapsdjur. Utbredningen av sällskapsfåglarna gör också att sjukdom orsakad av *C. psittaci* är av stor betydelse för folkhälsan, inte minst på grund av att de ibland förekommer som burfåglar både bland äldre människor och barn (Harkinezhad m.fl., 2009). Japanska forskare skriver att den viktigaste zoonotiska patogenen är just *C. psittaci* (Okuda m.fl., 2010). Hur vanligt det är med sällskapsfåglar i Sverige finns det inte några siffror på (Tornvall, 2010) men enligt American Veterinary Medical Association finns det 11 miljoner fåglar i USA (Beeckman & Vanrompay, 2009). En annan siffra som har publicerats är att 6 % av japans alla sällskapsfåglar skulle vara infekterade med *C. psittaci* (Okuda m.fl., 2010). Det finns många papegojfåglar som är tysta smittbärare av *C. psittaci* (Gerlach, 1994). Sjukdomen bryter vanligtvis ut i samband med den stress som till exempel en flytt till ett nytt hem kan innebära. Förutom att sjukdomen orsakar lidande för fågeln så är den en zoonos som hos människa ger alltifrån lindriga till mer allvarliga luftvägsproblem (Pantchev m.fl., 2009). Utan adekvat behandling kan infektionen i värsta fall leda till en systemisk sjukdom med dödlig utgång (Okuda m.fl., 2010).

Första gången som sjukdomen beskrevs hos människa var 1879. Det var sju individer i Schweiz som efter kontakt med tropiska fåglar utvecklade en ovanlig typ av lunginflammation. Ett pandemiskt utbrott inträffade vintern 1929-1930 efter att Amazonpapegojor från Argentina hade importerats till USA och Europa. Åren därpå rapporterades 174 fall från Färöarna där mortaliteten var 20 %, värst drabbade var smittade gravida kvinnor. Smittan på Färöarna förklarades med att infekterade döda papegojor hade slängts överbord vid transporten mellan Argentina och Europa. Stormfåglar infekterades av dessa och därefter människorna då de fångade in Stormfåglarna vilka användes för människoföda (Harkinezhad m.fl., 2009).

Det finns tre sätt att påvisa en infektion av *C. psittaci* nämligen, isolering av patogenen (till exempel genom inokulation i kycklingembryon), serologi eller påvisande av deoxiribonukleinsyra (DNA) (Okuda m.fl., 2010). En säker diagnos fås vid obduktion då agens med hjälp av *Polymerase Chain Reaction* (PCR), kan påvisas från inre organ. En vanlig analysmetod som används ute på vissa djurkliniker idag är ett snabbtest i form av ett serologi test (*enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA) (Tornvall, 2010). Ett positivt antikroppssvar talar egentligen bara om att fågeln vid något tillfälle har varit i kontakt med smittämnet. Fågeln behöver inte nödvändigtvis ha agens i sig vid provtagningstillfället. På Statens veterinärmedicinska anstalt (SVA) används idag en PCR metod där man kan detektera agens från provtagna fåglar. Från levande fågel tas provet med svabbprov från företrädesvis choan (slits i övre gom), konjunktiva samt kloak. Provet analyseras därefter med Real tids PCR för påvisande av DNA. Om fågeln är död så görs analys även från prover tagna från inre organ såsom mjälte, lever etc. (Bölske, 2010).

Syftet med undersökningen är att med hjälp av ett ELISA test kontrollera prevalensen av *C. psittaci* i tambeståndet av papegojfåglar i Mälardalen. Detta ska

göras genom blodprovtagning av cirka 100 fåglar. Som en extra undersökning ska en del av proverna även analyseras enligt ett nyligen framtaget PCR test där man ska kunna provta fåglar i prospektivt syfte. Proverna enligt det försöket kunde bestå av helblod eller svabb från konjunktiva, kloak eller choan. I denna studie ska sedan resultaten av de båda testerna jämföras.

Om den nya PCR metoden fungerar så skulle den kunna vara ett användbart alternativ vid provtagning vid tillfällen som till exempel införskaffning av ny fågel. Ett väl fungerande test skulle göra att både människor och djur slipper onödigt lidande. Beroende på hur jämförelsen blir så kan det även bli möjligt att få en uppfattning om hur bra svaret från ELISA stämmer överrens med faktiskt infekterade fåglar.

## LITTERATURÖVERSIKT

### Organismen *Chlamydophila psittaci*

*C. psittaci* är en obligat intracellulär organism som är endemiskt förekommande över hela världen. *C. psittaci* innehåller både DNA och ribonukleinsyra(RNA). Liksom övriga bakterier saknar den mitokondrier och är därför oförmögen att tillverka eget ATP, utöver detta har organismen en unik utvecklingscykel. Den saknar nämligen det enzymsystem som andra bakterier har som gör det möjligt för bakterierna att använda sig av energi från cellmembranet (Gerlach, 1994). För att växa till samt föröka sig behöver därför *C. psittaci* tillgång till en värdcells ATP, detta gör att organismen inte går att odla fram i ett cellfritt medium (Carter m.fl., 2002; Gerlach, 1994).

### Infektion

*C. psittaci* finns i två former. Beroende på var i utvecklingen organismen är så kallas den för elementärkropp eller retikulärkropp. Varje elementärkropp är omgiven av ett cytoplasmiskt membran, ett periplasmiskt utrymme samt ett yttre hölje som innehåller lipopolysackarider. Det är elementärkroppsformen som är den extracellulära formen som infekterar en värdcell. Det som möjliggör infästningen till värdcellen och som är den viktigaste virulensfaktorn är ett toxin som är bundet till elementärkroppens yttermembran. Den värdcell, alltså målcellen som vanligen infekteras är en makrofag eller en epitelcell i gastrointestinkanalen (Gerlach, 1994). Efter att ha fäst till sin målcell tar sig elementärkroppen in i cellen via receptormedierad endocytos (Carter m.fl., 2002). Elementärkroppen blir i detta skede insvept i en endocytoplasmatisk vesikel (endosom) där den under hela kommande replikationen skyddas från den angripna värdens lysozymer (Grimes, 1989). Elementärkroppen har fram till nu varit metaboliskt inert och osmotiskt stabil men i och med att den i cellen genomgår en förändring till en retikulärkropp så blir den istället metaboliskt aktiv och osmotiskt instabil. Det är i denna retikulärkroppsform som *C. psittaci* replikerar sig och mognar för att senare åter bli en elementärkropp inne i endosomen, det sista sker via binär fission (celldelning). Endosomen med sitt innehåll kallas nu för en inklusion.



Replikationen kan pågå upp till 72 timmar. Organismen *C. psittaci* producerar enzymer som gör att värdcellen lyserar och släpper ut både mogna elementärkroppar, omogna retikulärkroppar samt intermediära former av dessa. Det är i detta stadium som man talar om att man har extracellulära infektiösa former av elementärkroppar (Carter m.fl., 2002).

Fria elementärkroppar i miljön är relativt ostabila och kan inaktiveras inom några dagar (Gerlach, 1994). Skyddade i torkad spillning eller damm så kan de förbli infektiösa i miljön i månader (Mitchell m.fl., 2008).

### **Smittspridning**

Elementärkroppar som finns i fåglars torkade spillning samt i damm från fjädrar sprids genom luftcirkulationen. Om ingestion av elementärkroppar sker så resulterar detta i en infektion av de intestinala epitelcellerna. Vidare är det beskrivet att det hos bland annat undulater kan förekomma vertikal överföring via ägg (Gerlach, 1994).

### **Vilka drabbas?**

Papegojsjuka orsakad av *C. psittaci* kan överföras genom direktkontakt med smittade fåglar, fågelspillning, näsflöde samt aerosol och därmed orsaka respiratoriska sjukdomskomplex hos både däggdjur och fåglar. Hos människa kan denna bakteriella infektion orsaka svåra pneumonier (Pantchev m.fl., 2009; NASPHV, 2009; Mitchell m.fl., 2008). De flesta inrapporterade humanfall orsakas av kontakt med infekterade sällskapsfåglar. Även om *C. psittaci* är endemiskt förekommande så är kliniska utbrott hos fåglar huvudsakligen orsakade av människans handhavande av djuren i fångenskap. Med detta avses många djur på små ytor, handel samt exempelvis introduktion av nya djur i flocken utan karantän. Stressen som ett miljöombyte innebär, kan sänka fågelns immunförsvar så den lättare blir mottaglig för olika infektioner. Även ett naturligt beteende som reproduktion med äggbildning, ruvning och uppmatning av ungar kan bli en sådan stress att en infekterad fågel utan kliniska symtom kan börja utsöndra *C. psittaci* och smitta andra men utan att själv bli kliniskt sjuk. Fågeln blir så kallad tyst smittbärare. De flesta primärinfektioner ger inga kliniska symtom, det vet man eftersom många fåglar hittas med antikroppar mot *C. psittaci* (Gerlach, 1994).

I det vilda orsakar organismen endast få eller inga fall med kliniska symtom eller patologiska lesioner. En relativt vanlig uppfattning hos fågelveterinärer är att vissa papegojarter är mer mottagliga för *C. psittaci* än andra. Detta berör även Gerlach (1994) i sitt kapitel om klamydiainfektion hos fåglar där författaren skriver att det är en generalisering att säga att sydamerikanska papegojarter såsom Aror och Amazoner verkar mer mottagliga för infektion med *C. psittaci* än de arter som kommer från södra Asien och Australien. De Afrikanska arterna skulle vara de som är minst mottagliga. Det är snarare så att det är den mottagliga individens immunförsvar och tillstånd som avgör om det blir en infektion eller inte. På grund av det så är unga fåglar generellt mer mottagliga för infektion än vuxna.

### **Inkubationstid**

Inkubationstiden är beroende av de olika stammarnas virulens. Enligt Gerlach (1994) är inkubationstiden minimum 42 dagar för papegojfåglar. Hos Nymfkakaduor som är frekventa bärare av klamydia har det noterats att de kan utsöndra agens i avföringen i mer än ett år innan en följande aktiv infektion noteras

### **Kliniska symtom**

De kliniska symtomen är mycket varierande. Vissa fåglar visar inga tecken alls, en del drabbas av en respiratorisk sjukdom medan andra som till exempel unga fåglar som exponeras för höga doser av en virulent stam kan utveckla akut systemisk infektion som kan leda till döden. Kliniska tecken kan vara uppburrad fjäderdräkt, konjunktivit, sinusit, dyspné, rassel från luftvägarna, letargi, dehydrering och annorlunda konsistens och färg på spillningen (figur 1 illustrerar sjuk fågel). Med tanke på de många olika sjukdomstecknen så är differential diagnoserna många och uteslutning sker genom laborieutredningar. Exempel på sådana diagnoser som då kan uteslutas är infektioner med herpesvirus, paramyxovirus, influensa A virus samt *Enterobacteriaceae* exempelvis *Salmonella* spp. (Gerlach, 1994).



Figur 1, Sjuk Amazon © Jonas Persson

Sjukdom hos människa är ofta underdiagnosticerad på grund av de ospecifika symtomen, det är inte alla individer som drabbas av pneumoniliknande symtom (Harkinezhad m.fl., 2009). Exempel på inrapporterade fall från olika länder visas i tabell 1.

Tabell 1. Årtal och antal inrapporterade fall av *C. psittaci* hos människa (efter Harkinezhad m.fl., 2009)

| Land     | -96 | -97 | -98 | -99 | -00 | -01 | -02 | -03 | -04 | -05 | -06 | -07 |
|----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Sverige  | 25  | 66  | 30  | 29  | 24  | 12  | 13  | 12  | 7   | 5   | 2   | 9   |
| Holland  | 0   | 28  |     | 25  | 36  | 24  | 17  | 27  | 33  | 49  | 59  | 27  |
| Tyskland | 134 | 124 | 155 | 109 | 86  | 53  | 40  | 42  | 15  | 33  | 26  | 12  |

### Provtagning

Att diagnostisera *C. psittaci* är inte lätt bland annat på grund av att många fåglar är bärare av smittan och kan ha subkliniska infektioner. För att få en säker diagnos krävs laboratorieundersökningar (Elder & Brown, 1999). I National Association of State Public Health Veterinarians, Inc. (NASPHV) kompendium från 2009 rekommenderas att provtagaren använder en kombination av tester såsom odling samt påvisande av antikroppar eller antigen. Detta för att om möjligt minska risken att missa de tysta smittbärarna (NASPHV, 2009; Phalen, 2006). Om agens kan identifieras vid obduktion då prov har tagits från inre organ så är diagnosen klar, ibland kan det dock krävas kompletterande odling. Då en fågel kommer in till veterinär med uppvisat nedsatt allmäntillstånd på grund av sjukdom så är det allvarligt eftersom fåglar in i det längsta maskerar att de är sjuka, detta för att undvika att bli ett byte. Veterinären gör en allmän undersökning som vanligtvis måste kompletteras med hematologi samt röntgenundersökningar för att få en helhetsbild av tillståndet. Dessa sedvanliga utredningsförfaranden kan visserligen ge en hjälp på vägen men är generellt otillräckliga för att ge en fullständig sjukdomsdiagnos. Då *C. psittaci* kan detekteras i blod redan efter en dag efter infektion kan en analys med hjälp av PCR vara ett bra sätt identifiera infekterade fåglar (Phalen, 2006).

Enligt Bölske (2010) går det inte att säga att en fågel som provtas efter en genomgången behandling är fri från sjukdom. Vid provtagningstillfället kan det vara så att organismen inte utsöndras utan gömmer sig intracellulärt. Ett sätt att öka möjligheten för att påvisa agens är att analysera både svabbprov från choan och kloak och analysera ett blodprov. (Phalen, 2006).

NASPHV uppdaterade 2009 sina rekommendationer angående standardiserade förfaranden om hur man i USA kontrollerar *C. psittaci* hos fåglar. Rekommendationerna är ett viktigt steg för att främst skydda människors hälsa. *C. psittaci* infektion har här graderats i de två följande kategorierna: Bekräftad infektion samt trolig infektion.

För att bekräfta en *C. psittaci* infektion krävs det enligt standardiseringen positivt svar på en av följande provtagningar:

- Isolering (odling) av *C. psittaci* från ett kliniskt prov

- Identifiering av *C. psittaci* genom att använda sig av immunofluorescence på fågelns vävnader
- Minst en fyrfaldig stegring av serologisk titer i två prover tagna med minst två veckors mellanrum som analyseras samtidigt på samma laboratorium
- Identifiering av *C. psittaci* i makrofager i utstryk från vävnader (lever, konjunktiva, mjälte eller luftvägssekret)

Vid troligt fall av *C. psittaci* måste papegojan visa upp kliniska symtom samt uppfylla ett av följande kriterier.

- Enstaka hög serologisk titer eller
- *C. psittaci* antigen (identifierat genom ELISA, PCR eller fluorescerande antikroppar) i faeces, svabb från kloak eller respirationsvägarna eller ögonsekret

*C. psittaci* grupperas in i sju genotyper (A-F samt en nyligen identifierad genotyp, E/B). För att i fågelprover kunna identifiera och genotypa *C. psittaci* finns en rad olika serologiska tester och molekylära metoder. Att urskilja de sju genotyperna från varandra har tidigare varit tidskrävande på grund av att flera bekräftande tester behövdes. För att snabbt kunna sätta in rätt åtgärder och behandling behövs en analysmetod där en dagsaktuell diagnos kan fås. Mitchell med medarbetare (2008) har nu lyckats utveckla en sådan analys där de med hjälp av en real tids PCR har lyckats att specifikt identifiera och genotypa *C. psittaci*. Till skillnad från en vanlig PCR som endast ger svar på om den efterfrågade patogenen är närvarande eller inte i provet ger en real tids PCR även svar på mängden agens i provet (Sachse. m.fl., 2009).

I Mitchells studie lyckades man särskilja genotyp A-F där A var den mest frekvent förekommande genotypen (71,4 %) av de som gav positivt utslag för *C. psittaci*. Genotyp A är också den genotyp som vanligtvis identifieras hos klamydiapositiva papegojfåglar. Testet kan användas för att screena fåglar i prospektivt syfte. De metoder som tidigare vanligen har använts vid genotypning är gensekvensering av *outer membrane protein A (ompA)*, *restriction fragment length polymorphism (RFLP)*, real-tids PCR och *microarray* analyser. Även odling av organismen kan utföras men det utförs sällan på grund av den stora arbetsinsatsen som krävs. Komplementfixeringstest och mikroimmunofluorescence (påvisande av antigen med mikroskop) kräver serum både från den akuta fasen av sjukdomen och senare under konvalescensen. Testen anses vara inadekvata på grund av att de är retrospektiva analyser och därför inte kan ge en dagsaktuell diagnos (Mitchell m.fl. 2008).

## MATERIAL OCH METODER

### Ansökan etiska nämnden

Universitetet hade inte något generellt tillstånd för denna typ av försök. Därför skickades en ansökan om etisk prövning av djurförsök in, behandlades och godkändes av Uppsala djurförsöksetiska nämnd.

I ansökan Nr C130/9 framgick att:

Försöksledare var Lena Olsén, BVF, enheten för patologi, farmakologi och toxikologi.

Försökets svårighetsgrad klassificerades som av ringa svårighetsgrad.

Syftet var att undersöka prevalens av *C. psittaci* samt att med blodprov utföra två typer av analyser och jämföra resultaten av dessa.

Efter godkännande av djurägaren skulle provtagning av papegojfåglar ske på djurklinik i samband med veterinärbesök eller vid hembesök.

### Djurägarmedgivande

Djurägaren fick fylla i ett medgivande för att deras fågel skulle vara med i studien. Även art, namn eller id nummer skulle fyllas i samt vart fågeln hade införskaffats. Se bilaga 1.

### Provtagning och material

Provtagning av fåglarna utfördes på djurklinik, hos privatpersoner samt ute på fågelbesättningar.

Blodprov erhöles från 74 fåglar härstammande från Afrika, Australien och Sydamerika (Tabell2).

Tabell 2. Antal provtagna fåglar samt deras ursprung i världen

| Kontinent  | Antal |
|------------|-------|
| Afrika     | 10    |
| Sydamerika | 18    |
| Australien | 46    |
| Totalantal | 74    |

Antalet Afrikanska papegojor fördelades på följande sätt:

- 8 Jako
- 2 Svarthuvad vitbukspapegoja

Sydamerikanska papegojor:

- 12 Amazon
- 6 Ara

Australiensiska papegojor:

- 14 Kakadua
- 11 Nymfkakadua
- 8 Undulat
- 13 Övriga

Vid hembesöken fångades fåglarna in av ägaren men hölls och provtogs av mig medan det var djursjukvårdspersonalen som utförde allt i samband med besök på djurkliniken. Efter sprittvätt av det kala området hos fågel på halsregionen togs blodprov från jugularvenen. På de mindre fåglarna togs 0,5 ml och de större 1 ml. I samband med provtagningen ute i fält var det praktiskt svårt att frysa ned blodproverna direkt efter provtagning som sig bör. För att undvika att RNA bryts ned, användes RiboPure Blood kit innehållande RNA-later (Qiagen AB, Sverige) som möjliggjorde förvaring i rumstemperatur. 1 ml RNA-later tillsattes i Eppendorff rör innan blodprovstagnig. Efter provtagning fördes blodet först ned i ett EDTArör (*ethylenediaminetetraacetic acid*) för att undvika koagulation. Då blodet hade blandats om med antikoagulantian överfördes 0,1 ml-0,35 ml behandlat blod över till Eppendorff röret med RNA-later i avvaktan på en senare PCR analys. För antikroppstestet fylldes serumrör med helblod.

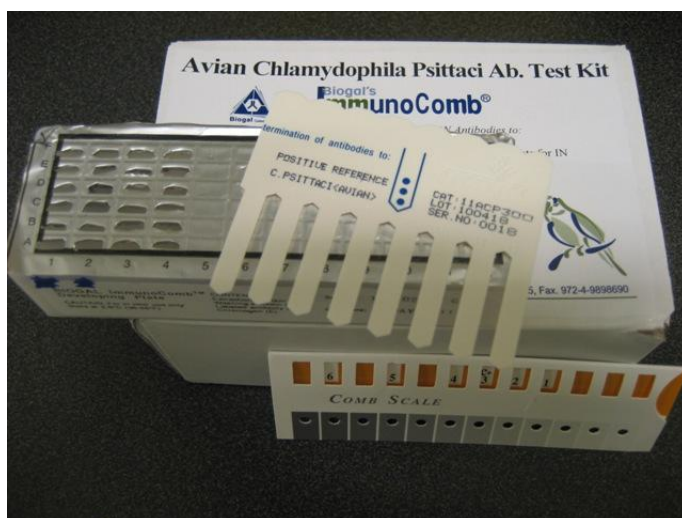


Figur2, Blodprovstagnig från jugularven på en Amazon © Jonas Persson

## **Analys av prover**

### *ELISA- metod*

För ELISA-analys användes ImmunoComb® Avian Chlamydophila psittaci Antibody Test Kit från Biogal, Israel (figur 3). Detta Immunocomb test detekterar antikroppar mot *Chlamydophila psittaci* i blod eller serum. Analysutrustningen innehåller 6 brunnar A-B med vätskor samt en plastspatel som är preparerad med *C. psittaci* antigen. Serumröret med helblod centrifugeras, 0,5 µl serum pipetteras ned i brunn A, därefter förs plastspateln ned i brunnen och inkuberas i denna under 20 minuter. Om det finns antikroppar i provet så kommer dessa nu att binda till antigenet på spateln. I brunn B ska spateln vara i 2 minuter för tvätt. Icke bundna antikroppar sköljs här av från spateln. I brunn C sker inkubation i 20 minuter, brunnen innehåller en anti-aviär IgG antikropp märkt med ett enzym, på detta vis blir de bundna antikropparna märkta. Inkubation med tvätt sker därefter i brunn D i 2 minuter och i brunn E i 10 minuter. Slutligen har det efter 2 minuter i F skett en enzymatisk reaktion som leder till en färgförändring där man mot en färgskala kan utläsa hur mycket antikroppar som finns kvar.



Figur 3. ELISA-analysutrustning

### *Realtids RT-PCR metod*

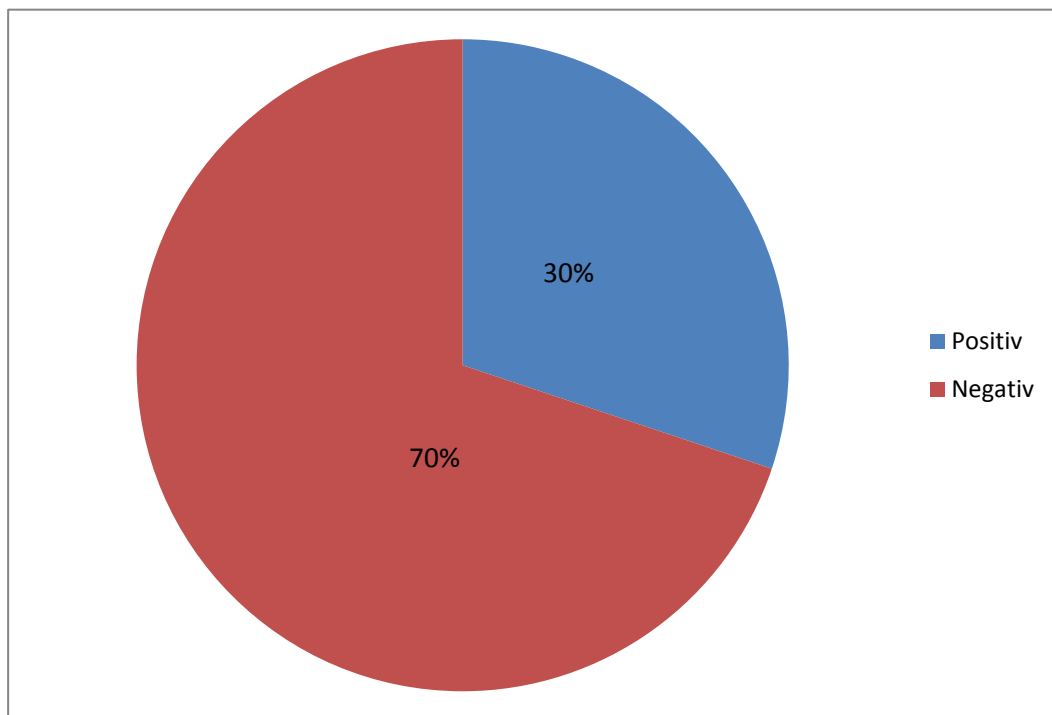
Med Mitchells studie från 2008 i förgrund, dock med en väsentlig skillnad att det var RNA och inte DNA som isolerades, analyserades proverna efter befintliga protokoll. En annan skillnad var också att detta försök endast inriktade sig på att detektera de fåglar som bar på *C. psittaci* genotyp A (vilken var den vanligaste genotypen hos just papegoj fåglar). Genom GenBank (National Center for Biotechnology Information, NCBI) erhöles information av cDNA sekvensen för *C. psittaci* omp-A (accession number EU682090.1) och därefter designades primers utifrån denna med hjälp av Primer3 (Whitehead Institute, WI, USA).

RiboPure™-Blood Kit (Ambion, USA) var det protokoll som följdes då det var dags att isolera RNA. Dubbelsträngat DNA krävs för PCR amplifieringen. Då templatet bestod av RNA utfördes en RT-PCR (reversed transcriptase PCR) som kort innebär att ett enzym möjliggör bildning av dubbelsträngat DNA från RNA. Som fluorescerande molekyl i real tids PCR analyserna användes SYBR green enligt Qiagens protokoll, Real-Time One-Step RT-PCR with SYBR-Green.

## RESULTAT

### ELISA

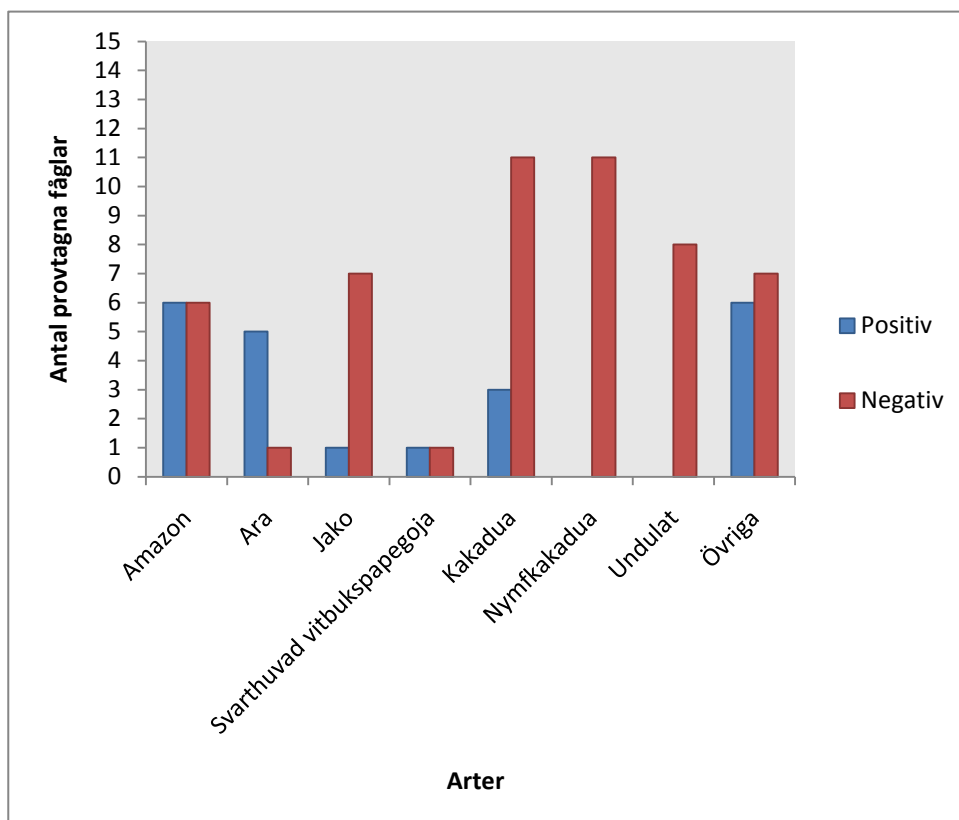
Antikroppstestet visade på en *C. psittaci* prevalens om 30 % hos de provtagna fåglarna. Resultatet graderades endast som positiv eller negativ oberoende på hur mycket antikroppar fågeln hade (figur 4).



Figur 4. Total andel positiva respektive negativa provsvar vid mätning av antikroppar.



I figur 5 illustreras antikroppsfordelningen inom de olika arterna. Kakaduorna var den största enskilda artrepresentanten med 14 individer varav 3 stycken var positiva. Amazonpapegojerna med sina 12 representanter fick ett 50/50 resultat. Nymfkakaduorna hade 11 individer i studien, alla var antikroppsnegativa. Grå Jako och Timneh Jako fick tillsammans representera gruppen Jako om 8 individer, endast en positiv. Gruppen om 8 undulater hade inga antikroppar vilket nästan var det omvända hos gruppen med 6 stycken Aror där 5 stycken hade antikroppar. En blandad övrig grupp om 13 individer där 7 stycken hade antikroppar och 6 stycken inte hade det. I minsta gruppen om endast 2 individer återfinns Svarthuvad vitbukspapegojor där en individ hade antikroppar och den andra inte hade det.



Figur 5. Antal antikroppspositiva respektive negativa provsvar.

*Tabell 3. Resultat jämförelse av prover som analyserats med både PCR och ELISA.  
Positiv eller negativ*

| Prov nummer | PCR | ELISA |
|-------------|-----|-------|
| 6           | +   | +     |
| 13          | +   | +     |
| 63          | +   | +     |
| 64          | +   | +     |
| 67          | +   | +     |
| 69          | +   | +     |
| 77          | -   | +     |
| 78          | -   | +     |
| 82          | +   | +     |
| 83          | -   | +     |
| 84          | -   | +     |

## DISKUSSION

ELISA antikroppstestet visade på en prevalens om 30 %. Att nästan en tredjedel av de provtagna fåglarna på något sätt har varit i kontakt med antigenet är på sitt sätt intressant och stödjer påståendet att smittan är vanligt förekommande. På grund av att det endast är antikropparna som detekteras i testet fås inget svar på vilka fåglar som är sjuka och smittbärare kontra fåglar som har antikroppar kvar från en gammal infektion och det är en nackdel.

I sammanställningen av resultaten användes benämningarna positiv eller negativ. I det använda ELISA testet finns en färgskala som möjliggör en gradering av de positiva resultaten. Om det hade varit praktiskt genomförbart så skulle det varit intressant att i ett första försök använda sig av den graderingen för att efter en tid göra en uppföljande undersökning. På så vis hade även en sammanställning varit möjlig att göra över hur snabbt antikropparna har sjunkit hos den enskilda fågeln.

Enligt tillverkaren till snabbtestet är testet ospecifikt för vissa arter, däribland Kakadua, Amazon, Jako och Ara vilket innebär att falskt positiva svar kan erhållas, framförallt vid förekomsten av låga halter antigen.

Realtids PCR analys ger svar på vilka djur som är sjuka eller smittbärare. Endast 11 prover var möjliga att analysera på grund av bland annat ekonomiska skäl. Eftersom 11 prover är ett kvantitativt lågt antal kan inga slutsatser dras av jämförelsen som gjordes mellan de två testmetoderna där det framgår att av 11 ELISA positiva fåglar är 7 stycken även positiva på PCR provet. En kommentar är ändå att PCR resultatet följer ELISA resultatet bra. Det kan mycket väl förhålla sig så att av de 11 ELISA proverna som jämfördes var 7 stycken fåglar sådana som utsöndrade agens vid provtagningstillfället medan de resterande 4 endast hade antikroppar mot det. Om en akut sjuk fågel provtas och visar sig vara negativ på ELISA testet kan det innebära falskt negativt svar eftersom det tar tid innan fågeln serokonverterar. Ett prov för PCR analys kan i detta läge vara ett bra komplement.

I Mitchells studie från 2008 beskrevs en metod där man identifierar de olika genotyperna med en Realtids PCR. Analysen är säkert mycket användbar vid till exempel utredningar vid epidemiologiska utbrott. För den vanligt praktiserande veterinären skulle det räcka med en bra, snabb pålitlig metod som helt enkelt identifierar *C. psittaci*, oavsett genotyp.

Sjukdomen är underdiagnostiserad hos människa (Harkinezhad m.fl., 2009). Troligen är det svårare att ställa diagnosen på människa än på fågel. Orsaker till detta kan bero på okunskap om hur smittspridning fungerar samt problematiken med att påvisa agens även i de fall som en *C. psittaci* infektion misstänks. Vid symptom på influensa är det troligen ovanligt att frågan om sällskapsfågelinnehav kommer upp vid ett läkarbesök. Är fågeln dessutom en frisk latent smittbärare vilket är vanligt och bara utsöndrar *C. psittaci* periodvis så är risken stor att ägaren inte heller själv kopplar att den ”friska” familjemedlemmen sprider smitta. Tabell 1 illustrerar antal rapporterade sjukdomsfall hos människa. För Sverige och Tyskland ses en nedgående trend från sent 90-tal och framåt. Det finns säkert olika förklaringar till detta, bland annat att man helt enkelt provtar färre

människor. En annan förklaring skulle även kunna vara att man vid trendbrottet istället för serologitester där antikroppar påvisades istället började använda sig av det under 90 talet utvecklade PCR-testet.

Sjukdomen är i princip omöjlig att utrota, därför är det viktigt att förebygga den genom god hantering av sällskapsfåglar. Det finns många faktorer i samband med handel, uppfödning och olika typer av hållning av fåglar som påverkar fågelns hälsa negativt både direkt och indirekt. Sämre förhållanden som orsakar stress kan sekundärt leda till att fågelns immunförsvar blir nedsatt. Det finns uppfödare, djuraffärer och djurägare som hanterar dessa faktorer bättre eller sämre. Låg besättningsgrad, god hygien, damm/fjäderfri miljö, adekvat kost, isolering av sjuka fåglar, karantän med eventuell provtagning för nyinförskaffade fåglar samt stressfri miljö är exempel på nyckelord som främjar en smittfri miljö. Samtidigt krävs mycket annat för att fåglar ska hålla sig friska och må bra. Det kan innebära en utmaning att både eftersträva en smittfri miljö samtidigt som utrymmen och inredning ska ge fågelns möjlighet att utöva naturliga beteenden (frågan om man överhuvudtaget ska ha papegojor i fångenskap är väl motiverad men har inte berörts i detta arbete).

En allmän uppfattning hos vissa veterinärer, trots att det inte finns vetenskaplig evidens, var enligt litteraturen att till exempel sydamerikanska papegojor skulle vara mer mottagliga för papegojsjuka än till exempel afrikanska eller australiensiska papegojor. Med det i åtanke valdes de arter som skulle provtas ut så att de kom från tre olika kontinenter. Det ultimata hade varit en jämnare fördelning arterna emellan men i praktiken var detta svårt att åstadkomma. Tacksamt provtogs istället alla fåglar som ägarna gick med på att ha med i försöket. Att de sydamerikanska papegojorna skulle vara mer mottagliga för infektionen går det självklart inte att dra några slutsatser av enligt de resultat som fått fram vid denna studie. Lite intressant är dock att procentuellt sett dominerade de sydamerikanska Amazonerna och Arorna i den antikroppspositiva gruppen.

Av de fåglar som provtogs var en del ensamfåglar från privatpersoner. En del fåglar kom från privatpersoner som hade flera fåglar med olika ursprung samt inköpstillsfalle medans andra provtogs i större besättningar. Härledning varifrån fåglarna hade införskaffats var i många fall omöjlig. Därför kunde ingen korrelation göras till om det fanns mer smitta om fågelns kom som en handelsvara från zoohandeln eller grossist jämfört med till exempel en mer sluten hemuppfödning.

Vid fall där fågelns sjukdomstillstånd samt anamnes ger misstanke om en *C. psittaci* infektion kan veterinär sätta in behandling trots att provsvaren varit negativa. På SVA's och Smittskydds institutets hemsidor rekommenderas att fåglar som sätts i karantän eller genomgår transport ska antibiotikabehandlas mot *C. psittaci*. Det kan låta märkligt ur antibiotika resistens synpunkt att behandla "friska" fåglar men med den rekommendationen förhindras troligen sjukdomsutbrott i flera fall.

## Konklusion

Det har länge varit svårt att få fram ett pålitligt test där provtagning enkelt ger svar på om den provtagna fågeln är *C. psittaci* fri eller inte. I litteraturen finns många diagnosmetoder och försök att påvisa *C. psittaci* beskrivna. Det brukar betyda att det inte finns endast ett enkelt och pålitligt sätt att identifiera organismen på, utan en del metoder fungerar i vissa fall och andra i andra fall. I denna studie testades två olika metoder som också de bekräftade att det är svårt att få fram entydiga svar. Var för sig kan de två testerna vara otillräckliga i många fall men tillsammans kan de vara ett bra verktyg för att kunna ställa en säkrare diagnos.

En krånglig, förrädisk och vanligt förekommande sjukdom som på grund av stor variation av symtom samt organismens förmåga att ”gömma” sig intracellulärt och låta bli att utsöndras vid provtagning gör att diagnos är svår att ställa. Det innebär även att det är omöjligt att genom provtagning följa upp om en medicinsk behandling har lyckats eliminera organismen helt eller om den bara har gått i vila för att blossa upp igen vid ett senare tillfälle.

Med tanke på zoonosrisk, risk att selektera för antibiotikaresistens och inte minst för fågelns skull är det en förhoppning att någon lyckas få fram en sådan bra diagnostisk metod att drabbade individer i framtiden snabbt och enkelt kan identifieras och behandlas.

## TACK TILL

Lena

Carina

Jonas

Alla ägare till de provtagna fåglarna

Ewa Sjödin

Jonas Persson

Gunnel Anderson

## LITTERATURFÖRTECKNING

- Beeckman, D.S.A & Vanrompay, D.C.G. (2009) Zoonotic Chlamydia psittaci infections from a clinical perspective. *Clinical Microbiology and Infection* 15, 11-17.
- Bölske, Göran. SVA, Uppsala. Intervju november 2010
- Carter, M. Donnelly, W. Leonard, F. Markey, B. Quinn, P. (2002) *Veterinary Microbiology and Microbial disease*. 6.ed. Great Britain: Blackwell Science Ltd.
- Elder, J. & Brown, C. (1999) Review of techniques for the diagnosis of Chlamydia psittaci infection in psittacine birds. *J Vet Diagn Invest* 11:539–541
- Gerlach, H. (1994) Chlamydia. In: Ritchie, B (Ed.) *Avian medicine: Principles and application*. 984-996. Florida: Wingers Publishing, Inc. ISBN 0-9636996-0-1
- Grimes JE: Facts, comments, and concerns in understanding the detection of chlamydial infections. *Journal of the Association of Avian Veterinarians*, Vol. 3, N0.2 1989 sid 76-77
- Harkinezhad, T., Geens, T. & Vanrompay, D., 2009. Chlamydia psittaci infections in birds: A review with emphasis on zoonotic consequences. *Veterinary Microbiology*, 135(1-2), 68-77.
- Mitchell, S.L., Wolff, B.J., Lanier Thacker, W., Ciembor, P.G., Gregory, C.R., Everett, K.D.E., Ritchie, B.W. & Winchell, J.M., "Genotyping of Chlamydia psittaci by Real-Time PCR and High-Resolution Melt Analysis," *Journal of Clinical Microbiology* 47, no. 1 (11, 2008): 175-181.
- NASPHV: Compendium of measures to control Chlamydia psittaci infection among human (Psittacosis) and pet birds (Avian Chlamydiosis) National Association of State Public Health Veterinarians, Inc. (2009)
- Okuda, H, Ohya, K, Shiota, Y, Kato, H, Fukushi, H, Detection of Chlamydia psittaci by using SYBR Green Real-time PCR. *The Journal of Veterinary Medical Science*. Under tryckning 2010
- Pantchev, A., Sting, R., Bauerfeind, R., Tyczka, J & Sachse, K., 2009. New real-time PCR tests for species-specific detection of Chlamydia psittaci and Chlamydia abortus from tissue samples. *The Veterinary Journal*, 181(2), 145-150.
- Phalen, D.N. (2006) Preventive medicine and screening. In: Harrison, G. J. & Lightfoot T. L. (Ed.) *Clinical avian medicine*. 577-578. Palm Beach, FL, USA: Spix Publishing Inc. ISBN 00-9754994-1-6
- Sachse, K., Vretou, E., Livingstone, M., Borel, N., Pospischil, A. & Longbottom, D., 2009. Recent developments in the laboratory diagnosis of chlamydial infections. *Veterinary Microbiology*, 135(1-2), 2-21.
- Tornvall, Marianne, Veterinär., Sigtuna. Telefonsamtal oktober 2010

## **Till ägare av fågel**

Som examensarbete på veterinärutbildningen gör jag en studie där vi undersöker hur utbredd förekomsten av papegojsjuka är hos våra tamfåglar samt om det går att använda sig av en ny analysmetod för att hitta smittan.

Papegojsjuka är en zoonos, kan alltså smitta från djur till människa. Förhoppningen är att i framtiden kunna erbjuda djurägarna ett billigare bra alternativ till vad som finns idag så att fler testar sina fåglar i förebyggande syfte.

För att detta ska kunna genomföras krävs blodprover från ett relativt stort antal fåglar och därför undrar jag om vi får ta ett blodprov från din fågel idag.

Självklart betalar du inget extra för provtagningen!

Resultatet av undersökningen kommer att vara värdefull för veterinärer vid diagnosticering av papegojsjuka i framtiden.

Tack för din hjälp! / Peter Jendelund vet. stud. åk. IV

**JA**, jag tillåter att ett blodprov tas från min fågel.

**Datum:** \_\_\_\_\_

**Underskrift** \_\_\_\_\_ **Namnförtydligande:** \_\_\_\_\_

**Fågels namn/Idnummer:** \_\_\_\_\_

**Fågelart:** \_\_\_\_\_

**Jag har köpt fågeln:**

- I en zooaffär eller motsvarande
- Av en privatperson som fött upp fågeln
- Från en stor uppfödare
- Annat alternativ, ange

vad: \_\_\_\_\_

**KLINIKENS ANTECKNINGAR:**

**NUMMER:**