



Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för Veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för Kliniska Vetenskaper

Förekomst av *Chlamydia/Chlamydophila* spp hos gris med och utan konjunktivit.

Frida Arnlund

Uppsala

2010

Examensarbete inom veterinärprogrammet

ISSN 1652-8697
Examensarbete 2010:56

Förekomst av *Chlamydia/Chlamydophila* spp hos gris med och utan konjunktivit.

Presence of *Chlamydia/Chlamydophila* spp in pigs with and without conjunctivitis.

Frida Arnlund

*Handledare: Magdalena Jacobson, Institutionen för Kliniska Vetenskaper
Biträdande handledare: Nils Lundeheim, Institutionen för Husdjursgenetik*

Examinator: Bernt Jones, Institutionen för Kliniska Vetenskaper

*Examensarbete inom veterinärprogrammet, Uppsala 2010
Fakulteten för Veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för Kliniska Vetenskaper
Kurskod: EX0239, Nivå: X, 30hp*

Nyckelord: Chlamydiaceae spp, Chlamydia spp, Chlamydophila spp, gris, konjunktivit, slaktsvin

*Online publication of this work: <http://epsilon.slu.se>
ISSN 1652-8697
Examensarbete 2010:56*

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Ord- och Förkortningslista.....	7
Abstract.....	13
Sammanfattning.....	14
Introduktion.....	15
Bakgrund och syfte.....	15
<i>Chlamydia</i> och <i>Chlamydophila</i>	15
Patogenes.....	16
Historik.....	16
Diagnostik.....	18
Klinik.....	19
Konjunktivit.....	20
Övriga sjukdomar.....	22
Material och metoder.....	26
Besättningar.....	26
Djur.....	26
Provtagning.....	27
Hantering av proverna.....	27
Preparering.....	27
PCR.....	28
Provbedömning.....	29
Statistisk metod.....	29
Resultat.....	31
Diskussion.....	33
Provbedömning.....	33
Analysmetod.....	33
Urvalskriterier.....	34
Tidpunkt för provtagning.....	35
Studier av <i>Chlamydiaceae</i> före och efter 1999.....	36
Skillnader mellan analysmetoder.....	36
Slutsatser.....	37
Tack.....	38
Litteraturförteckning.....	39

ORD- OCH FÖRKORTNINGSLISTA

Amplifiera: Förstärka. I detta sammanhang att föröka mängden DNA i ett prov till detekterbar nivå.

Amplikon: En DNA-sträng som bildas genom naturlig eller konstgjord duplicering av DNAt, exempelvis polymeraskedjereaktion (PCR), ligasekedjereaktion (LCR), eller naturlig DNA-syntes. I detta sammanhang avses produkten av en PCR-process.

Annealing: Momentet då primrarna fäster på DNA-strängen i en PCR-process.

Antikroppstiter: mängden antikroppar i serum anges i titreringsgrader (antal spädningar av serumet). Högt titervärde innebär hög koncentration antikroppar i serumet, dvs serumet kan spädas kraftigt och fortfarande ha detekterbara nivåer antikroppar närvarande.

ATP: Adenosintrifosfat. En nukleotid väsentlig för cellens energihantering.

Basofil infärgning: sura strukturer i ex. histologiska preparat där basisk färg fäster. Vanligaste exemplet på basofil infärgning är de celler/strukturer som färgas mörkt lila med hematoxylin.

Baspar: Två nukleotider som binder till varandra i dubbelsträngat DNA. Basparen utgörs alltid av kombinationen A-T eller C-G.

Biovar: en variant prokaryot stam som skiljer sig biokemiskt och/eller fysiologiskt från andra stammar i en viss art.

Ct-värde: Cycle threshold, antal cykler tills den genererade fluorescensen i en realtidsPCR-process väl överskrider det fastställda gränsvärdet. Gränsvärdet är godtyckligt definierat för att ge en bild av vilken tidpunkt i reaktionsförloppet en tillräcklig mängd amplikon har tillverkats.

Denaturering: dubbelsträngat DNA separeras till två enkelsträngar genom värmebehandling.

DNA: Deoxyribonukleinsyra. Nukleotidkedja som inhyser cellens genetiska information. DNA-kedjans ryggrad utgörs av sammanlänkade deoxyribosmolekyler (en pentos) och fosfatmolekyler, varannan fosfat och varannan deoxyribos. Den ände av ryggraden som utgörs av en fosfatgrupp kallas 5'-ände och änden som utgörs av en hydroxylerad pentosmolekyl kallas 3'-ände. I dubbelsträngat DNA ligger de båda ryggraderna antiparallellt. Ryggraderna länkas samman av en i nukleotiden ingående bas, genom att motstående baser bildar par. (Se även nukleotid.)

DNA-polymeras: ett enzym som katalyserar sammanfogningen av nukleotider vid DNA-replikation.

Elementarkropp: *Chlamydiaceae* infektiiva livsstadie. Är metaboliskt inaktiv och robust i konstruktionen, anpassad till extracellulära omgivningar.

Elongering: sker när enzymet polymeras förlänger en nukleotidkedja med en befintlig nukleotidkedja som mall. Nukleotidkedjor byggs i en bestämd riktning, med start i 5'-ändan och riktning mot 3'-ändan

Enzymbaserad immunoassay: designade antikroppar binds till den eftersökta strukturen och de bundna antikropparna markeras i sin tur med anti-antikroppar som har ett enzym kopplat till sig. Till antikroppskomplexen sätts en molekyl som spjälkas av enzymet och mängden av produkt som enzymet producerar visar att eller var den eftersökta strukturen finns och även i vilken koncentration. Exempelvis Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) och Immunohistokemi (IHC).

Endosom: är ett plasmamembranomgärdat utrymme i den eukaryota cellen bildat genom endocytos. Den är en del i cellens mekanism för transport av material in och ut ur cellen.

Eukaryota: en av tre domäner delar in organismer, enligt modern systematik. Eukaryoten är en organism med en eller flera komplexa celler där arvsmassan är belägen i en cellkärna omgiven av ett cellmembran.

Forward primer: primer som är designad för att fästa till eftersökt DNA-sekvens 5'-ände. (Se även DNA ovan.)

Giemsafärgning: Giemsafärg är en blandning av metylenblått och eosin. Färgen används till infärgning av histologiska preparat och blodutstryk. Färgen har hög affinitet till DNA.

Gold standard: den metod som har en etablerad eller allmänt accepterad noggrannhet för att fastställa en diagnos, vilken ger en standard som nya screenings- eller diagnostiska tester kan jämföras mot. Termen 'gold standard' ersätts allt mer av termen 'criterion standard' i nyare publikationer.

GPIC: Guinea Pig Inclusion Conjunctivitis

Immunofluorescens: innebär märkning av antikroppar eller antigen med fluorescerande färg. Tekniken används för att visualisera strukturer i och på celler. Märkta vävnadsprov eller kulturer studeras med hjälp av fluorescensmikroskop eller konfokalmikroskop. (Se även immunohistokemi.)

Immunohistokemi: är en metod för lokalisering av intracellulära proteiner (antigen) i vävnadsprov genom att använda designade antikroppar. Visualiseringen av antikropp-antigen-komplexen åstadkoms genom att antikroppen eller en anti-antikropp är konjugerad med ett enzym som katalyserar en färgningsprocess.

Inklusionskropp: är nukleära eller cytoplasmiska aggregat av proteiner som är oanvändbara för cellen, antingen pga av att de är av främmande ursprung eller felveckade.

Lag-period: den tidsrymd som förflyter innan en reaktion eller tillväxtprocess har ett märkbart resultat, trots att processen initierats.

LCR: Ligase Chain Reaction är DNA-amplifieringsteknik som utförs genom ligering av oligonukleotidsonder. Sönderna är designade för att motsvara två angränsande sekvenser av specifikt mål-DNA exakt. Reaktionen upprepas i tre steg i närvaro av ett överskott av sondmaterial; denaturering av dubbelsträngat DNA, bindning av sonder till mål-DNA och ligering av sönderna. Efter att reaktionen upprepats 20-30 gånger mäts mängden ligerat sondmaterial.

LPS: lipopolysackarid är en lipoglykan och är en livsviktig byggsten i det yttre membranet hos Gram-negativa bakterier. Strukturen har stor antigen potential.

Lymfogranuloma venerum: är en könssjukdom som är ovanlig i Sverige. Sjukdomen är vanligast i Afrika och Asien samt i Central- och Sydamerika. Sjukdomen orsakas av vissa underarter av *Chlamydia trachomatis*. Inkubationstiden är ofta lång, upp till en månad. Första symtom är små smärtfria, ytliga slemhinnesår genitalt eller analt, vilka ofta inte noteras. Efter inkubationstid svullnar lokala lymfkörtlar. Svullnaden kan vara omfattande och är mycket smärtsam. Obehandlat sker en lymfkörtelnekros och det kan ske fistelbildning med hudgenombrott. Förblir sjukdomen obehandlad kan vävnadnekrosen och medföljande kronisk ärrbildning bli omfattande och invalidiserande.

Lysering: när cellväggar i eukaryota eller prokaryota celler bryts ned eller förstörs.

Lysosom: är den organell i den eukaryota cellen där enzymatisk nedbrytning av makromolekyler sker.

Mastermix: den premixade blandning av reagenser som PCR-processen äger rum i efter det att templatet tillsatts.

Mimic: är en intern kontroll av PCR-processen. Mimicen består av en DNA-sekvens som helt skiljer sig från den i analysen eftersökta sekvensen, men den har samma primerpar. Om varken mimicamplikon eller provDNA-sekvensamplikon bildas vet man att det negativa resultatet av reaktionen beror på att processen inte fungerat som avsett. Bildas mimicamplikon men inte provDNA-sekvensamplikon vet man att processen fungerat och att provet inte innehållit den eftersökta DNA-sekvensen.

Nukleotid: molekylär byggsten i nukleinsyrorna DNA och RNA. Består av en kvävebas, en sockermolekyl (deoxiribos i DNA och ribos i RNA) samt en eller flera fosfatgrupper. Kvävebaserna utgörs av antingen purinerna adenin (A) eller guanin (G) alternativt pyrimidinerna cytosin (C), tymidin (T) eller uracil (U). Kvävebaserna parar vid kontakt ihop sig purin-pyrimidin, i kombinationerna A och T (enbart i DNA) alt. U (enbart i RNA) samt G och C.

Patogenicitet: en patogens förmåga att orsaka infektiös sjukdom hos en värd.

PCR: Polymerase Chain Reaction, artificiell förökning (amplifiering) av ett specifikt DNA-sekvensavschnitt. Reaktionen sker i en buffertlösning med tillsatta primrar, nukleotider och ett värmeresistent DNA-polymeras med hjälp av en termocykler.

Peptidoglykan: beståndsdel i den bakteriella cellväggen. Peptidoglykan har betydelse för hur en bakterie klassas som grampositiv eller gramnegativ. Grampositiva bakterier har en ca 40 lager tjock vägg bestående av peptidoglykan som yttersta cellvägg. Gramnegativa bakterier har en 1-2 lager tunn peptidoglykanvägg mellan ett yttre och inre cellmembran.

Pellett: sedimenterat material i botten på ett provrör innehållande en centrifugerad suspension.

PMWS: Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome

Polymerisering: polymerisation, en kemisk reaktion där enstaka molekyler (monomerer) sätts samman i längre kedjor (polymerer).

PPV: Porcine Parvo Virus

Prevalens: Andelen i en specifik sjukdom insjuknade individer i en population vid en viss tidpunkt.

Primer: består av en nukleotidkedja och fungerar som startpunkt för DNA-replikering. Primerns utformning är väsentlig för kvaliteten av resultatet av en PCR.

Proteinas K: är ett serinendoproteas (enzym) med bred kapacitet att sönderdela proteiner. Enzymet inaktiverar nukleaser (enzym som bryter ned DNA) effektivt, är stabilt i ett brett pH-spann (4-12) och är aktivt även i närvaro av kemikalier som denaturerar andra proteiner.

PRRSV: Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus

PRV: Porcine Reovirus

RV: Rota Virus

Receptor: mottagare, en molekyl i cellväggen eller cellkärnan som har uppgiften att motta och vidarebefordra externa signaler.

Retikulärkropp: *Chlamydiaceae* intracellulära metaboliskt aktiva och replikerande livstadie. Är inte stabil i extracellulär miljö och inte heller infektiös.

Rewerse primer: primer som är designad att fästa in på eftersökt DNA-sekvens 3'-ände. (Se även DNA ovan.)

Sekvensering: är att ta reda på en DNA-sekvens uppbyggnad baspar för baspar. Utförs med kemisk metodik eller genom kedjetermineringsmetodik. Den vanligaste metoden idag är den sk Sanger-dideoxy-metoden för längre sekvenser och pyrosekvensering för kortare sekvenser.

Sensitivitet: andelen korrekt identifierade positiva prov, dvs. andelen sjuka individer som testet identifierar som positiva.

Seropositiv: individer som bildat antikroppar mot ett specifikt antigen (sjukdomsagens) är seropositiva med avseende på denna agens.

Serovar: en variant prokaryot stam som skiljer sig i antigen karaktär (avseende de antigena ytmolekylerna) jämfört med andra stammar i en viss art.

Slaktsvin: gris i slaktgrisuppfödning i åldern ca 12 till 28 veckor (ca 25-110 kg).

Smågris: (spädgris) gris från födsel till avvänjning vid ca 5-7 veckors ålder.

Southern blot: är en teknik för att fastställa molekylvikt och relativ mängd av en specifik DNA-sekvens. Southern blot består av flera steg; DNA-provet fragmenteras oftast med ett restriktionsenzym innan det separeras med hjälp av gelelektrofores. Efter detta överförs DNA-fragmenten från gelen till ett membran där fragmenten får hybridisera till en prob (märkt DNA-sekvens). Prober som inte bundit till DNA-sekvenserna tvättas bort. Därefter detekteras proben och bilden som erhålls visar den eller de DNA-fragment som proben bundit till, dvs storleken på DNA-fragmentet, och signalens styrka ger ett mått på den relativa mängden bundet DNA-fragment.

Specificitet: andelen korrekt identifierade negativa prov, dvs. andelen friska individer som testet identifierar som negativa.

STD: Sexually Transmitted Diseases

Supernatant: Vätskefasen ovanför sedimenterat material i ett provrör efter centrifugering av en suspension.

Templat: det DNA som utgör mallen för polymerisering av nukleotider i PCR-processen. I detta fall består templatet av DNA från klamydiaorganismer i provtaget från gris.

Termocykler: en benämning på den apparatur som används vid en PCR-process. Namnet beskriver apparatens egentliga funktion vilken är att med jämna tidsintervall ändra temperaturen i ett varierande antal provrörspatser. Apparaturen kan vara av enklare modell eller mycket komplex med inbyggd spektrofotometer och avancerad mjukvara.

TGEV: Transmissible Gastro Enteritis Virus

Tillväxtgris: gris från ca 2 veckor efter avvänjning (sker vid 4-7 veckors ålder) till ca 12 veckors ålder, innan leverans till slaktgrisuppfödning (sker vid ca 25-30 kg kroppsvikt).

Trakom: en ögonsjukdom som är en av de största orsakerna till blindhet globalt sett. Orsakas av *Chlamydia trachomatis*. Barn drabbas i störst utsträckning. Konjunktivan infekteras och upprepade och/eller obehandlade infektioner leder till keratokonjunktivit med ärrbildning och skador i hornhinnan vilket leder till blindhet.

Validera (genus): göra giltigt, bekräfta.

Vortex: skaka, vibrera. Apparatur som används för att snabbt blanda innehåll i en vätska.

Viabel: levande, levnadsduglig.

Värdspecificitet: olika mikroorganismarter är kapabla att kolonisera vissa värdar men inte andra. Bred värdspecificitet innebär att ett flertal arter kan vara värdar för samma mikroorganism, smal värdspecificitet begränsar mikroorganismens utbredning till en eller ett par värdar.

ABSTRACT

Chlamydia and *Chlamydophila* are species of a family of bacteria (*Chlamydiaceae*) that cause a range of diseases, including conjunctivitis, in a variety of animals including pigs and humans. Some species cause zoonotic disease. This study examined the occurrence of *Chlamydiaceae* in samples taken from the lower eyelid conjunctiva in pigs with and without conjunctivitis. The study was initiated based on a herd investigation aimed to examine the experienced increase of conjunctivitis in some finisher herds. This study was conducted as a case-control study, by collecting samples from 62 case pigs (16-26 weeks old) and an equal number of controls, from three herds in Uppland, Sweden. The samples were analysed by real-time PCR (23S rRNA gene of *Chlamydiaceae*). When employing a threshold value of Ct 36, a significant difference in the occurrence of *Chlamydiaceae* between the entire case group (83% positive samples) and the control group (65% positive samples) was detected. In one of the herds a significantly higher occurrence of *Chlamydiaceae* was shown in pigs with conjunctivitis, compared to pigs without conjunctivitis. In the other two herds no significant difference was shown. The study revealed no significant difference in the occurrence of *Chlamydiaceae* between the herds. When employing a threshold value of Ct 38, the difference between the case and the control group were no longer significant. Hence, a relationship between *Chlamydiaceae* spp and conjunctivitis in pigs could not be convincingly demonstrated in the present study. However, based on the total results of this study, it is possible that such a relationship exist but with varying expression of clinical signs. The variation in clinical expression could be due to differences in infectious dose, differences in virulence between sub-species of *Chlamydia/Chlamydophila*, mixed infections of *Chlamydia/Chlamydophila* or mixed infection with other microorganisms such as *Mycoplasma* spp or virus. Conjunctivitis caused by *Chlamydiaceae* could at reinfections be a delayed hypersensitivity reaction, be caused by the fact that several species within the *Chlamydiaceae* exhibit the ability to induce a delayed hyper-sensitivity reaction in the host. The presence of *Chlamydiaceae* in pigs, their pathogenicity and the pig's immune response to the microorganism is not well studied and these fields require both extended and advanced studies.

SAMMANFATTNING

Chlamydia spp och *Chlamydophila* spp är arter i en familj bakterier (*Chlamydiaceae*) som orsakar en rad sjukdomar, bl a konjunktivit, hos ett stort antal djur inklusive gris och människa. En del av arterna har även zoonotisk potential. Denna studie har undersökt förekomsten av *Chlamydiaceae* i prover tagna från nedre ögonlockets konjunktiva hos grisar med och utan konjunktivit. Studien initierades efter en besättningsutredning föranledd av en ökad förekomst av konjunktivit i vissa besättningar. Undersökningen har genomförts som en fall-kontrollstudie, genom provtagning av 62 stycken slaktsvin och lika många kontroller i åldern 16-26 veckor, från tre stycken uppländska besättningar. Proverna har analyserats med realtids-PCR av 23S rRNA-genen hos *Chlamydiaceae*. När Ct <36 användes som tröskelvärde, påvisades en signifikant skillnad i klamydiaförekomst mellan fall (83 % positiva prov) och kontroll (65 % positiva prov) totalt i det undersökta materialet, samt i en av de tre provtagna besättningarna. Hos de övriga två besättningarna sågs ingen signifikant skillnad i klamydiaförekomst mellan fall och kontroller. Det sågs heller ingen signifikant skillnad i klamydiaförekomst mellan besättningarna. När Ct <38 användes som tröskelvärde, sågs inga signifikanta skillnader mellan fall- och kontrollgrupperna. Studien kunde därför inte påvisa något distinkt samband mellan klamydiaförekomst och konjunktivit. Dock tolkas resultatet som att *Chlamydiaceae* spp sannolikt orsakar konjunktivit hos grisar, men med varierad uttrycksgrad av kliniska symtom. Variationen i kliniskt uttryck skulle kunna bero på skillnader i infektionsdos, skillnader i virulens hos olika underarter av *Chlamydia/Chlamydophila*, blandinfektioner av olika *Chlamydia/Chlamydophila* eller blandinfektion med andra mikroorganismer som exempelvis mykoplasmer eller virus, samt när i inflammationsförloppet grisen provtas. Konjunktivit orsakad av *Chlamydiaceae* skulle, vid reinfektioner, kunna bero på en fördröjd hypersensibilitetsreaktion hos värdjuret, då flera arter inom *Chlamydiaceae* förmår utlösa en sådan reaktion. Då förekomsten av *Chlamydiaceae* hos gris samt deras patogenicitet och hur grisens immunförsvar hanterar mikroorganismerna är ett tämligen utforskat område krävs både utvidgade och fördjupade studier inom området.

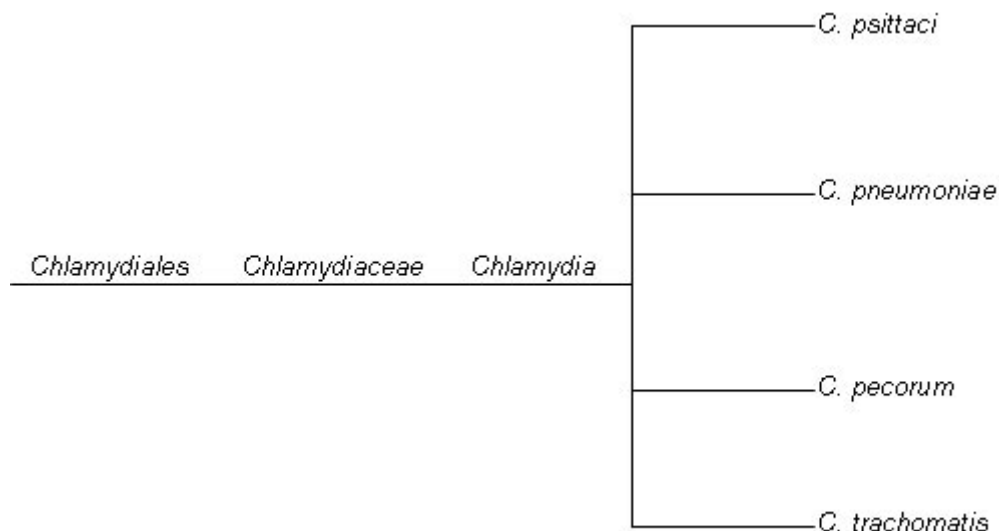
INTRODUKTION

Bakgrund och syfte.

Sektionen för gris- och fjäderfäsjukdomar vid Institutionen för kliniska vetenskaper SLU, kontaktades hösten 2006 av en besättningsveterinär i Uppland med en förfrågan angående konjunktivit hos slaktsvin. Veterinären upplevde att förekomsten av konjunktivit generellt ökat under senare år och dessutom var relaterad till specifika besättningar. I syfte att försöka utröna orsaken till problemet med konjunktivit genomfördes en besättningsutredning i en av de uppmärksammade besättningarna. Besättningsutredningen utfördes av en studentgrupp med lärare som ett led i undervisningen i svinmedicin vid veterinärprogrammet. Vid utredningen kunde ingen uppenbar orsak hittas i miljön. Genom mikrobiologisk provtagning från nedre ögonlockets konjunktiva på grisar med konjunktivit påvisades förekomst av *Chlamydiaceae* i två av fem prover. Resultatet kunde dock inte tolkas som att det skulle vara *Chlamydiaceae* som orsakar konjunktivit. Det var därför önskvärt att genomföra en utökad provtagning för att undersöka förekomsten av *Chlamydiaceae* i ögonen hos grisar både med och utan konjunktivit, vilket också var syftet med detta arbete.

Chlamydia och *Chlamydophila*.

Familjen *Chlamydiaceae* tillhör ordningen *Chlamydiales* och innefattar i nuläget två genera, *Chlamydophila* och *Chlamydia*, som tillsammans består av nio species. Denna klassificering baseras på sekvensering av generna för 16S och 23S rRNA. (Everett et al, 1999a) Ribosomalt RNA (rRNA) har de evolutionärt bäst konserverade generna i alla celltyper hos alla organismer och används därför vid undersökningar av evolutionära samband och vid taxonomisk gruppering. (Smit 2007) Detta innebär också, att gensekvenser avseende denna specifika gen är kända hos ett stort antal bakteriearter. *Chlamydiaceae* är gramnegativa obligat intracellulära bakterier som är helt beroende av den eukaryota värdcellens ATP eller GTP för sin replikation. Utvecklingscykeln för *Chlamydiaceae* består av två morfologiskt olika former, den extracellulära infektiiva elementarkroppen och den intracellulära replikerande retikulärkroppen. Elementarkropparna är 200-300 nm, metaboliskt inerta och osmotiskt stabila. De är omgivna av ett cytoplasmiskt membran, en periplasmisk spalt och ett yttre hölje som innehåller en familjespecifik lipopolysaccharid (LPS). Övriga familjer i *Chlamydiales* saknar denna lipopolysaccharid varför *Chlamydiaceae* kan identifieras med hjälp av antikroppar mot denna struktur. Det periplasmiska utrymmet har inget detekterbart peptidoglykanlager och elementarkropparna anses behålla sin osmotiska stabilitet med hjälp av höljeproteinerna sammanlänkade genom disulfidbryggor. Höljeproteinerna inkluderar ett ”major outer membrane protein” (MOMP; en translationsprodukt av genen *ompA*), ett hydrofilt cysteinrikt protein och ett litet cysteinrikt lipoprotein. När elementarkroppen omvandlas till en retikulärkropp sker en kemisk reduktion av höljeproteinerna. Retikulärkroppen är ca 1 µm stor, osmotiskt känslig och metaboliskt aktiv. Replikation sker genom celledelning. (Everett et al, 1999b, Hatch, T.P, 1996)



Figur 1. Schematisk figur av *Chlamydiales* taxonomi, så som den beskrevs före revision av ordningen utförd av Everett et al. 1999.

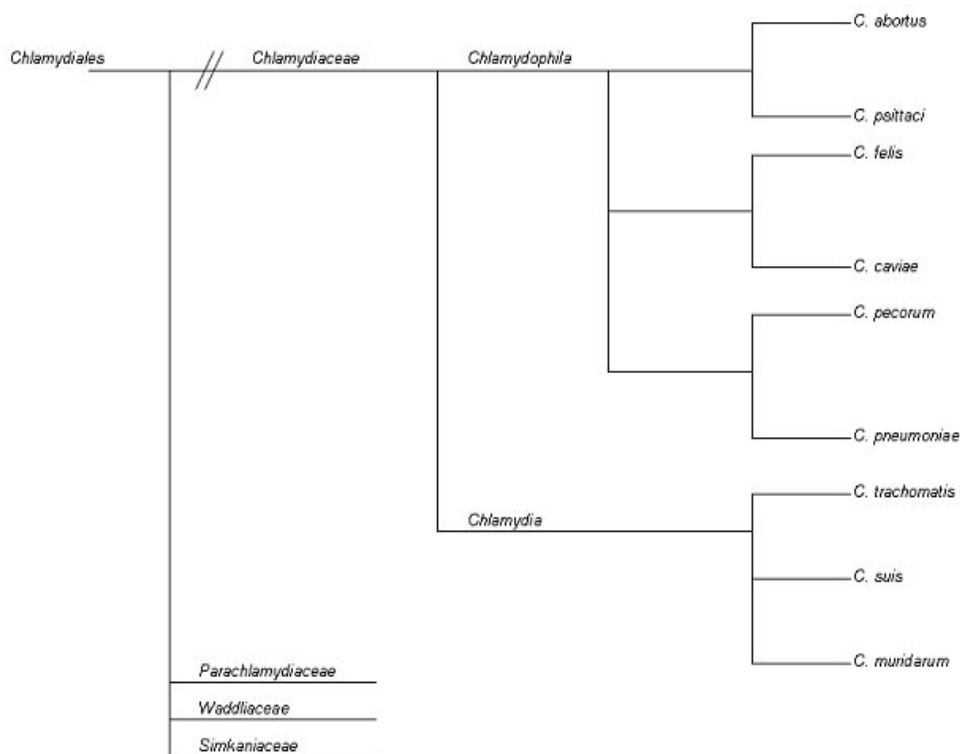
Patogenes

Elementarkropparna tar sig in i epitelcellen via receptormedierad endocytos, där det exakta tillvägagångssättet varierar mellan species. Sammansmältning av endosom och lysosom med efterföljande pH-sänkning förhindras genom att endosomen, som initierats av *Chlamydiaceae*, inte uppvisar de klassiska värdcellsmarkörerna för fusion. Efter att bakterien tagit sig in i cellen sker under några timmar en omstrukturering av mikroorganismen då den övergår till retikulärkropp och påbörjar replikering. Vid infärgning av infekterade celler ses endosomer innehållande klamydiabakterier som inklusioner i cytoplasman. Replikation påbörjas ca 2 timmar efter inträde i värdcellen och pågår i endosomer upp till 72 timmar efter infektion. Replikationen blir dock asynkron ungefär 20 timmar efter infektion, då vissa retikulärkroppar fortsätter dela sig och andra kondenseras till elementarkroppar. Under replikationen dubblar mikroorganismen sitt DNA på 2-3 timmar och när cellen till slut lyserar frisläpps samtliga utvecklingsstadier. Replikationen kan bli fördröjd om tillgängligheten till cystein eller tryptofan är dålig, eller vid närvaro av penicillin eller Interferon- γ , vilket resulterar i en persistent infektion. (Hatch, T.P, 1996)

Historik

De första kända omnämningarna av misstänkt klamydiaorsakad sjukdom hittas i antika kinesiska och egyptiska manuskript. I dessa manuskript beskrivs en trachom-liknande ögonsjukdom. 1907 beskrevs i en artikel av Halberstaedter och von Prowazek hur trachom kunde överföras mellan människa och orangutang genom inokulering av konjunktivalskrap i konjunktiva. I samband med försöken upptäcktes inklusionskroppar innehållande elementarkroppar i Giemsa-infärgade konjunktivalceller och även retikulärkroppar kunde ses. Helt korrekt blev slutsatsen av upptäckten att partiklarna var den sjukdomsorsakande organismen, vilken döptes till Chlamydozoa (höljeförsedd protozo). Strax efter denna upptäckt hittades liknande inklusionskroppar i konjunktivalceller från spädbarn med "neonatal konjunktivit ej orsakad av gonockocker" och även i cervixepitel från några av spädbarnens mödrar. Samma typ av inklusionskroppar hittades även i

urethraepitel från män med ”urethrit ej orsakad av gonockocker”. Dessa organismer som orsakade såväl trachom, neonatal konjunktivit och infektion i genitalier antogs till en början vara virus, eftersom de inte gick att odla i artificiellt media och inte heller var möjliga att samla upp med filter som normalt sett fångar upp bakterier. 1929-30 uppstod utbredda utbrott av atypiska och ofta allvarliga pneumonier överförda till människa från papegojfåglar. Sjukdomen blev namngiven psittakos (papegojsjuka) och de omfattande utbrotten och sjukdomens allvarlighetsgrad ledde till forskning. Levinthal, Coles och Lillie beskrev oberoende av varandra fynd av små basofila partiklar i Giemsainfärgade blod- och vävnadsprover från sjuka papegojfåglar och människor. Bedson *et al* bevisade det etiologiska sambandet mellan partiklarna och psittakos och gick sedan vidare med att beskriva utvecklingscykeln som idag definierar medlemmarna i *Chlamydiales*. Bedson beskrev partikeln som en obligat intracellulär parasit med drag liknande en bakterie och hans fynd namngavs till *Bedsoniae*. Redan 1934 drog Thygeson uppmärksamhet till likheterna kring utvecklingen och morfologin mellan inklusionerna i trachom, neonatal konjunktivit och psittakos. Fyndet av en för dessa agens gemensam komplementbindande antigen, som dessutom inkluderade agens för lymfogranuloma venerum (LGV) och pneumoni hos möss förstärkte hypotesen om att de alla tillhörde samma unika grupp. 1931 hade man lyckats uppföröka det agens som orsakar LGV i aphjärna och 1935 odlades det psittakosorsakande agens fram i allantochorion hos kycklingembryon. 1957 lyckades T'ang *et al* odla fram ”trachomviruset” i gulesäcken hos kycklingembryon och 1958 fastslogs det etiologiska sambandet mellan organismen och konjunktivit respektive infektioner i genitalia, genom inokulering på frivilliga försökspersoner och babianer. Namnet *Chlamydia* dök först upp i litteraturen 1945. Tidigare benämningar på denna organism hade då varit *Bedsonia*, *Miyagawanella*, *Halprowia*, Ornithosisagens, TRIC-agens och PLT-agens. I och med att tekniker för cellkulturer och elektronmikroskopi utvecklades kunde man 1965 bevisa att klamydiaorganismen inte var ett virus. Detta genom att man upptäckte bakteriellt rRNA, ribosomer och cellväggstrukturer hos organismen. (Collier 1990) *Chlamydia* grupperades med *Rickettsia* fram till dess att Page validerade genuset *Chlamydia* 1966. Under många år var *Chlamydiales* den enda bakterieordningen med endast en familj (*Chlamydiaceae*) och ett genus (*Chlamydiae*). Vid publiceringen av Approved List of Bacterial Names 1980 ansågs alla organismer med klamydialiknade morfologi, biokemi och replikationskaraktär antingen tillhöra *C. trachomatis* (glykogeninnehållande granula och känslig för sulfazidin) eller *C. psittaci* (ej glykogeninnehållande granula och resistent mot sulfa). Men redan före 1980 hade man funnit isolat som inte riktigt passade i denna gruppering. Då nya diagnostiska metoder introducerades på 1980 och 90-talet, vilket bla möjliggjorde DNA-baserad klassificering och associering med sjukdomar som tidigare haft okänd etiologi, tillkom en stor del forskningsresultat kring organismen. Två nya arter upptäcktes, *C. pneumoniae* 1989 och *C. pecorum* 1992. 1993 hittades genom DNA-sekvensanalys ytteligare en art *C. trachomatis*-liknande *Chlamydiae* isolerad från gris. Efter det fyndet gjordes en rad upptäckter av nära besläktade klamydiaisolat från gris bla av Rogers *et al.* 1993 och 1996 samt Rogers och Andersen 1996. I och med all ny, molekylärbiologiskt baserad information om *Chlamydiales* genomfördes en revision av klamydians taxonomi publicerad av Everett *et al.* 1999. (Everett 1999)



Figur 2. Schematisk beskrivning av Chlamydiales taxonomi, fastställd efter revision av ordningen utförd av Everett et al. 1999.

Diagnostik

När klamydiainfektioner först började diagnostiseras var påvisandet av karaktäristiska klamydiainklusioner i odlade celler den enda metod som fanns att tillgå. Specificiteten hos infekterade cellkulturer är 100 % och metoden anses vara ”gold standard” (criterion standard), dock anges sensitiviteten till 60-80% som bäst. Metoden är helt beroende av viabla mikroorganismer, vilket ställer höga krav på provtagning och provbehandling. Stora framsteg inom klamydiadiagnostik gjordes då tekniker som exempelvis direkt immunofluorescens och enzymbaserade immunoassays utvecklades, eftersom dessa inte kräver viabla organismer. Serologi för påvisande av antikroppar mot klamydia är till viss del användbart vid ex. populationsscreening men sällan diagnostiskt. (Stary 2000) Antikroppar kan kvarstå i höga titrar efter en genomgången infektion och det finns även en lag-period innan immunförsvaret hunnit bilda antikroppar mot antigenet vid akut sjukdom. Den idag vanligen använda metoden vid klamydiadiagnostik är att påvisa bakteriens nukleinsyra, vilket innebär PCR-, LCR- och hybridiseringstekniker.

PCR är en teknik för att amplifiera nukleinsyra till detekterbara nivåer, vilket kan användas för att hitta små mängder DNA från organismer med känd arvsmassa tex svårodlade bakterier eller virus. Detta görs med hjälp av primrar, lösa nukleotider och ett DNA-polymeras. Primrarna definierar den del av DNA som skall amplifieras (templat) baserat på en unik identitet och längd hos det valda avsnittet. Primrarna designas på sådant sätt att deras basparssekvens blir tillräckligt skild från andra basparssekvenser, så att korsreaktioner med icke eftersökt DNA förhindras. Amplifieringsprocessen börjar med att DNA denatureras vid ca 95°C för att bli enkelsträngat, vilket samtidigt aktiverar

DNApolymeraset. Temperaturen sänks så att primrarna hybridiserar till templatet (annealing) och elongering av primrarna genom polymerisering påbörjas så att en amplikon bildas. Varje fas har ett bestämt tidsintervall och därefter höjs återigen temperaturen och en ny cykel påbörjas. Vanligtvis körs 20-30 cykler och mängden amplikon ökar, undantaget första cykeln, teoretiskt sett exponentiellt enligt 2^n , där n är antalet cykler. I praktiken är effektiviteten i varje cykel inte 100 %. Vid konventionell PCR analyseras PCR-produkten med hjälp av gelelektrofores och efterföljande infärgning med etidiumbromid, där det fastställs om det skapats någon amplikon och vilken storlek den har. En snabbare och mindre arbetskrävande PCR-teknik är Realtids-PCR. Amplifieringen av DNA följer samma princip som vid konventionell PCR, skillnaden ligger i att amplikonen märks med en fluorescerande prob. Denna prob består av en oligonukleotid med en för den eftersökta PCR-produkten matchande sekvens och till den en vidhäftad fluorescerande molekyl. Fluorescensen i provet avläses fortlöpande under amplifieringen och data behandlas kontinuerligt.

Mimic är en internkontroll som används vid vissa typer av PCR-analyser för att fastställa att PCR-processen fungerat enligt plan. Det är helt nödvändigt för validiteten att kunna skilja ett prov som är negativt på grund av hämning av reaktionen från ett prov som är negativt på grund av att templat saknas. Mimicen består av en basparssekvens som är helt åtskild från templatets basparssekvens och den är infogad mellan basparssekvenser vilka matchar primrarna till templatet. Vid Realtids-PCR används en separat prob till mimic-sekvensen.

Det är svårt att konstruera väl fungerande arts specifika primrar för Realtids-PCR av *Chlamydiaceae*. Det är önskvärt med basparssekvenser som alltid förekommer hos klamydia inom samma art och som är konservativa och sällan förändras genom mutation. Samtidigt är det önskvärt med sekvenser som skiljer sig mellan olika klamydiaarter. Vid Realtids-PCR krävs dessutom en kort PCR-produkt, helst under 150 baspar, vilket ytterligare begränsar möjligheterna att konstruera ett primerpar. Hos *Chlamydiaceae* är variationerna i basparssekvens för liten mellan arter och för stor inom arter, vilket medför att sekvensområden som är lämpliga för primers och samtidigt ger en optimal PCR saknas. (PM Stina Englund, SVA) Artbestämning genomförs istället genom sekvensering av amplikonet.

Klinik

Chlamydiaceae hos gris har en världsomfattande spridning. Fem arter i familjen *Chlamydiaceae*, *C. suis*, *C. trachomatis*, *C. psittachi*, *C. abortus* och *C. pecorum*, har hittills återfunnits hos svin i varierande omfattning. Dessa har associerats med pneumoni (Sorodoc 1961, Guenov 1961, Hoesle 2000), konjunktivit (Pavlov 1963, Rogers 1993, Becker 2007), polyartrit (Kazemba 1978), intestinala infektioner och PMWS (Pospischil 1987, Carrasco 2000) samt med reproduktionsstörningar som exempelvis abort och orchit (Bohac 1965, Popovici 1972, Surdan 1965, Kauffold 2006a). Flera arter av *Chlamydiaceae*, eller antikroppar mot dessa, har även isolerats från kliniskt friska grisar i flera sammanhang vilket talar för förekomst av subkliniska infektioner (Kolbl 1969, Wilson 1966, Harris 1976). Mag- och tarmkanal anses vara normala habitat för vissa klamydia-arter, varifrån de kan sprida sig till andra organsystem. (Barker 1993, Shewen 1980).

Konjunktivit

Konjunktivit är en relativt ospecifik reaktion som kan bero på många orsaker förutom patogena mikroorganismer, t ex trauma, mekanisk irritation, uttorkning, allergener eller toxiner. Konjunktivit kan ofta associeras med övre luftvägsinfektion. Kliniska symtom på akut konjunktivit karaktäriseras av stasade kärl i konjunktivan och medföljande chemos (svullnad i konjunktiva) samt ögonflöde som kan vara seröst, mucöst eller mucopurulent. Cytologiskt ses infiltration av neutrofiler. Vid kronisk konjunktivit ses histologiskt ett ökat antal bågarceller, epitelcellshyperplasi, subepitelial ansamling av lymfocyter och plasmaceller samt keratinisering av epitelceller. I det fall som konjunktiviten även åtföljs av inflammation i kornea är benämningen keratokonjunktivit. (Donald McGavin 2001)

Vid en undersökning av konjunktivala svabbprov från kliniskt normala grisar i fyra åldersgrupper (spädgris, tillväxtgris, slaktgris och suggor) fann man att *α*-streptococker sp var den vanligaste bakterien följt av *Staphylococcus epidermis* och *Staphylococcus* sp. *Mycoplasma* sp. kunde inte påvisas, däremot återfanns *Chlamydia* spp i 28 % av de utvärderade proverna vid undersökning med ELISA. (Davidson 1994)

Vid provtagning av svin från besättningar med hög prevalens av konjunktivit och keratokonjunktivit har man kunnat påvisa *Chlamydia* vid ultrastrukturell undersökning av vävnadsprover från konjunktiva. I studien provtogs 7 st grisar i åldern 2-8 veckor samt en sugga. Smågrisarna hade mukopurulent konjunktivit och histologiskt sågs lymfoplasmocytär konjunktivit med lindrig lymfocellulär hyperplasi. Hos suggan sågs histologiskt kraftig lymfocellulär hyperplasi i konjunktivan och ulcerativ keratit med nyvaskularisering. Vid elektronmikroskopering gjordes fynd som medförde att samtidig infektion med mykoplasma inte kunde uteslutas, dessutom upptäcktes cytomegal inklusionsvirusrhinit hos flera av de 7 grisarna. (Rogers 1993)

I en studie på gnotobiotiska grisar visades att *Chlamydia trachomatis*-like organism strain H7 (omklassificerad till *C. suis* 1999) orsakar subklinisk konjunktivit hos gris. Klamydiaorganismen hämtades från tillväxtgrisar med konjunktivit eller keratokonjunktivit, typades och uppförökades genom odling i cellkultur. Två grupper med 3 dagar gamla grisar inokulerades med antingen klamydia eller negativ kontroll. Grisarna undersöktes två gånger per dygn med avseende på tårflöde, fotofobi, hyperemisk konjunktiva, exsudat från kornea och hornhinnesår. Grisarna avlivades och obducerades dag 7, 14, 21 och 28 efter inokulering och vävnadsprov för histologisk undersökning togs från konjunktiva. Innan avlivning togs svabbprover från konjunktiva och noshåla för odling av klamydia, mykoplasma och allmän aerob bakterieodling. Ingen av grisarna uppvisade kliniska symtom på konjunktivit vid något tillfälle under studien. Grisarna som avlivades 7 dagar post inokulering (DPI) med Strain H7 uppvisade histologiska lesioner i form av lindrig till måttlig fokal konjunktivit med framförallt lymfocyter men även mindre mängder makrofager, plasmaceller och neutrofiler i konjunktiva bilateralt. Även klamydiaantigen påvisades immunohistokemiskt i epitelcellerna hos grisarna med konjunktivit. Ingen av grisarna avlivade 7 DPI uppvisade lesioner i cornea. Även hos grisarna avlivade 14 DPI sågs histologiska lesioner i konjunktivan bilateralt, dessa då bestående av

lindrig multifocal lymfoplasmocytisk till lymfocytisk konjunktivit med avsaknad av lesioner i kornea. Hos grisar avlivade 21 och 28 DPI sågs liknande lesioner hos 2 av 3 grisar, ingen hade lesioner i kornea. Från grisarna avlivade 14, 21, 28 DPI påvisades inte klamydiaantigen i epitelcellerna från konjunktiva. Klamydia kunde återisolerats i svabbprover från noshåla och konjunktiva hos samtliga Strain H7-inokulerade grisar avlivade 7 DPI, samt i svabbprov från noshåla hos 1 av 3 grisar avlivade 14 DPI och 2 av 3 grisar avlivade 21 DPI. Hos samtliga Strain H7-inokulerade grisar kunde man återisolera klamydian från avföringsprover. (Rogers 1999)

I Tyskland och Schweiz genomfördes 2006 en undersökning av förekomst av *Chlamydia suis* hos grisar med och utan kliniska symtom på konjunktivit, för att se om det är möjligt att påvisa samband mellan förekomst och kliniska symtom. I Tyskland provtogs 10 st olika besättningar med tillväxtgrisar, fördelat på 5 st grisar med företrädesvis kraftiga kliniska symtom och 5 st grisar utan kliniska symtom inhysta i samma avdelning. I Schweiz provtogs 15 st slaktsvin från 5 olika besättningar, med så många prover som möjligt från grisar med konjunktivit, då kliniska symtom på konjunktivit inte var vanligt förekommande. Proverna analyserades med PCR och *C. suis* hittades i 89 % av de tyska proverna och i 41,3 % av de schweiziska. Det gick inte att bekräfta något samband mellan förekomsten av *C. suis* och kliniska symtom på konjunktivit i den tyska studien. I de schweiziska proverna sågs ett annat mönster, *C. suis* hittades i 21 av 27 prover från grisar med kliniska symtom på konjunktivit och i 10 av 48 prover från grisar utan konjunktivit. Då hela provmaterialet analyserades sågs signifikanta skillnader i fynd av *C. suis* mellan Tyskland och Schweiz och ett samband mellan förekomst av *C. suis*, kliniska symtom på konjunktivit och cytologiska lesioner. (Grosse Beilage 2006)

Det misstänks att grisar i intensiv produktion är predisponerade för konjunktivit orsakad av klamydia. 102 grisar i intensivt produktionssystem från Tyskland och 79 grisar i extensiv produktion från Schweiz, med och utan konjunktivit, undersöktes med avseende på förekomst av *Chlamydiaceae*. Proverna analyserades med PCR. Grisar med symtom på konjunktivit uppvisade en hög förekomst av *Chlamydia suis* i båda grupperna, 90 % i den tyska gruppen och 79 % i den schweiziska. Hos grisar utan symtom var förekomsten av *C. suis* 88 % i tyska gruppen och 23 % i den schweiziska. (Becker 2007)

I en studie gjord på marsvin har det fastslagits att inflammation orsakad av klamydiaallergen är omöjlig att särskilja histologiskt från inflammation orsakad av en primär klamydiainfektion och att patogenesen vid klamydiaorsakad konjunktivit är immunmedierad. Försöket visade också att okulär fördröjd hypersensitivitet kan provoceras fram av primärinfektioner i andra slemhinnor än konjunktivalslemhinnan om än med varierande tydlighet avseende kliniska symtom. I försöket användes *C. trachomatis* serovar H och B samt *C. psittaci* strain Mn Cal-10 och *C. psittaci* GPIC (omklassificerad till *C. caviae* 1999). Marsvinen infekterades först med viabla elementarkroppar av *C. psittaci* strain GPIC konjunktivalt, vaginalt eller intestinallyt (med mild enterit som följd). Klamydia återisolerades från de okulärt och vaginalt infekterade djuren. Tre till fyra veckor efter att kliniska symtom på sjukdom upphört testades marsvinen för okulär eller kutan hypersensitivitet med icke viabla extrakt samt viabla elementarkroppar av det agens de infekterats med. Hos de marsvin som testats

med viabla elementarkroppar var det inte möjligt att återisolera klamydia från konjunktiva vare sig efter 24 timmar eller efter fem dagar post inokulering. Histologisk undersökning utfördes på övre och undre ögonlock samt på ögongloben. De huvudsakliga symtomen vid GPIC primärinfektion var hyperemi och ödem i konjunktiva på ögonglob och ögonlock, med mucopurulent ögonflöde. Kliniska symtom sågs först 3-4 dagar post inokulering och fortlöpte under ca 14 dagar för att sedan avläka utan komplikationer. Histologiska prover togs dag 4 och 7 i sjukdomsförloppet och visade ödem och kraftig infiltration av lymfocyter och stora mononucleära celler i palpebrala konjunktivans *lamina propria*. Konjunktivans epitel var sparsamt infiltrerat med neutrofiler och bitvis söndertrasat med förlust av epitelceller som följd. Det mononucleära infiltratet sträckte sig över till den bulbära konjunktivan och fram till men inte över limbus till cornea. Efter inokulering med agens för att provocera fram hypersensitivitet sågs hos de tidigare infekterade marsvinen symtom på akut konjunktivit redan efter 12 timmar, med topp mellan 18 och 36 timmar och helt avläkt efter 72 timmar. Histologiskt var utseendet på konjunktivan och cellinfiltraten i konjunktivan identiska med de i proverna från de primärinfekterade marsvinen, med undantag för en nytilkommen eosinofil infiltration i limbus hos de marsvin som blivit inokulerade med extrakt av klamydia. Hypersensitivitet kunde inte ses hos de kontroldjur som inte utsatts för primärinfektion. En grupp marsvin var immuniserade intramuskulärt med *C.psittaci* strain GPIC i adjuvans och testade för hypersensitivitet okulärt och intrakutant en vecka efter sista injektion. Efter primärinfektion vaginalt och okulärt sågs en kraftig hypersensitivitetsreaktion, efter intestinal infektion sågs en måttligare reaktion och efter intramuskulär immunisering sågs en mycket svag reaktion. I försöket kom man även fram till att hypersensitiviteten utlöses av ett för klamydia genus specifikt och värmekänsligt allergen. Detta genom att testa både immuna (primärinfekterade med *C.psittaci* strain GPIC) och naiva marsvin med extrakt från *C. trachomatis* serovar H och B, *C. psittaci* strain Mn Cal-10 och GPIC, *E. coli*, *N. gonorrhoeae* samt renat LPS från *C. psittaci* strain GPIC. Endast immuna marsvin uppvisade hypersensitivitet och då endast mot extrakt av klamydia. (Watkins 1986)

Övriga sjukdomar

Reproduktionsorganen

Klamydia sammankopplas med reproduktionsstörningar hos gris. Prevalensen bland suggor avseende förekomst av antikroppar mot *Chlamydia* beräknades till 33 % i en tysk studie. Andelen positiva provresultat varierade mellan besättningar med 4,3 % som lägst och 72,7 % som högst. Andel seropositiva suggor korrelerade positivt med förekomst av MMA-syndromet (mastit, metrit, agalakti), omlöp, och sjuklighet hos kulingarna. De undersökta besättningarna hade lägre antal avvanda kulingar per sugga och kull än normalt. Jämförelse inom besättningarna visade att seropositiva suggor hade sämre reproduktionsdata än seronegativa. Statistiskt signifikanta samband mellan hög andel seropositiva suggor och dålig hygien, samt mellan seropositiva suggor och fjäderfäuppfödning påvisades. Bakteriologisk provtagning från cervix och aborterade foster visade 50 % klamydiapositiva prover vid PCR-analys. 20 % av de positiva proverna kom från kliniskt friska suggor och resterande 80 % från suggor med symtom på sjukdom i reproduktionsorganen. Ett statistiskt signifikant samband mellan positiva prover och abortincidens, dödfödda kulingar samt svagfödda kulingar påvisades. En del av proverna från cervix undersöktes även med avseende på

andra bakterier. 70 % av proverna från suggor med reproduktionsproblem innehöll rikligt med andra bakterier av olika arter, emedan endast 35 % av suggorna utan symptom uppvisade dessa fynd. Vid artbestämning genom Southern blot påvisades *Chlamydophila psittaci* i samtliga prover, 8 prover innehöll även *Chlamydia trachomatis*. (Eggemann 2000)

En schweizisk forskargrupp har undersökt klamydiaförekomsten i två suggbesättningar, grupp A med reproduktionsproblem bestående av stora variationer i intervallet avvänjning till första brunst och grupp B utan reproduktionsproblem. Från grupp A togs blodprov samt cervikala svabbprov från levande suggor och vävnadsprover från könsorganen hos slaktade djur. Från grupp B togs cervikala svabbprov och blodprov. Svabbprov och vävnadsprov undersöktes med PCR (16S rRNA). Serologin utfördes med ELISA mot *Chlamydiaceae* lipopolysaccharid. *Chlamydophila abortus* påvisades i 6 av 65 svabbprov från grupp A och i 0 av 128 svabbprov från grupp B. *Chlamydia suis* påvisades i 1,5 % av svabbproven från grupp A och i 2,3 % av svabbproven från grupp B. *C. abortus* hittades i 33 % av vävnadsproven från grupp A. Den serologiska undersökningen gav 61,7 % positiva prover, utan statistiskt signifikant skillnad mellan grupp A (52,3% positiva) och grupp B (66,4%). Det påvisades klamydialiknande organismer i både grupp A och B. (Camenisch 2004).

Det har konstaterats att klamydiainfektion i könsorganen hos gris drabbar livmodern men det är oklart om klamydiainfektion även ger specifika histopatologiska förändringar i äggledarna och påverkar deras funktion. I en tysk studie undersöktes förekomsten av klamydiabakterier och inflammation i livmoder samt äggledare hos slaktade suggor med nedsatt fertilitet. Av 42 st prover analyserade med PCR (*OmpA*) var 26 klamydiapositiva. 19 av suggorna hade infektion i en eller båda äggledarna, 14 st hade infektion i livmodern och 7 st i både livmoder och en eller båda äggledarna. Vid sekvensering fann man *C. psittaci*, *C. abortus*, *C. trachomatis* och *C. suis*. 24 suggor hade inflammation i äggledarna och 36 suggor hade inflammation i livmodern. Inget samband sågs mellan histopatologi och PCR-resultat. Författarna menar att fördjupade studier behövs. (Kauffold 2006a)

Det är osäkert om klamydiainfektion i könsorganen hos gris är en sexuell överförbar smitta. Två studier gjorda samma år visar motstridiga slutsatser. Kauffold *et al* undersökte sädesvätska och faeces med avseende på klamydiaförekomst från avelsgaltar i två besättningar. Även serologisk undersökning utfördes. Klamydia detekterades i 5,2 % respektive 24 % av proverna på sädesvätska och i 40,1 % och 8,3 % av faecesproverna. Vid sekvensering framkom att *C. suis* var vanligare förekommande i faecesproverna än *C. psittaci* vilken var den oftast förekommande i proven från sädesvätska. Det serologiska testet visade att 46,8 % respektive 9,7 % av galtarna hade antikroppar mot klamydia. Ingen korrelation sågs mellan den serologiska undersökningen och resultatet av PCR-analysen. Författarna drog slutsatsen att det finns potential för venerisk överföring av klamydia hos grisar. (Kauffold 2006b) Teankum *et al* undersökte sädesvätska och könsorgan från en schweizisk (Grupp A) och en tysk grupp galtar (Grupp B) med LPS-ELISA, immunohistokemi, PCR och bakteriologisk metodik. I grupp A var 1 av 25 ejakulat positiva för klamydia (*C. psittaci*) vid PCR-analys. Två ejakulat var positiva för en klamydialiknande organism. Tre av grisarna i grupp A var seropositiva för klamydia. Varken hos

seropositiva eller hos seronegativa galtar var det möjligt att med immunohistokemi samt PCR påvisa bakterier i könsvägarna. I grupp B var 10 ejakulat positiva för klamydia (*C. suis*) och 2 positiva för klamydialiknande organism vid PCR-analys. Författarna drar slutsatsen att sexuellt överförd smitta inte är en sannolik orsak till klamydiaorsakade reproduktionsproblem hos gris. (Teankum 2006)

Genom försök med *C. trachomatis* på Svinmakak (*Macaca nemestrina*) har det histologiskt påvisats fördröjd hypersensitivitet i äggledare som tidigare infekterats med *C. trachomatis*. Fördröjd hypersensitivitet är samma vävnadsreaktion som vid ögoninflammation orsakad av *C. trachomatis*, vilket tyder på liknande patogenes vid salpingit som vid trachom. (Patton 1994).

Övre och nedre luftvägar

Det har fastställts att *Chlamydia* spp orsakar pneumoni och rhinit hos gnotobiotiska grisar. Ett klamydiaisolat hämtat från grisar med pneumoni uppförökades i cellkultur, typades till *Chlamydia trachomatis*-liknande och benämndes R33. 15 st 3 dagar gamla gnotobiotiska grisar inokulerades med R33 intralaryngealt och nasalt. 5 st 3 dagar gamla gnotobiotiska grisar inokulerades med negativ kontroll. Grisarna undersöktes två gånger dagligen med avseende på anorexi, ökad andningsfrekvens eller dyspne, hosta, nysningar och nosflöde. Avlivning och obduktion genomfördes vid förutbestämda tidsintervall efter infektion eller när grisarna visade uttalade symtom på luftvägssjukdom. Vid obduktion togs vävnadsprover från lunga, lever, duodenum, jejunum, ileum, colon, och conchan (nosmusslan) för histologisk och immunhistokemisk undersökning med ljusmikroskop. Vävnadsprov av lunga och nossalhinna från grisar obducerade 7 dagar efter infektion (days post infection, DPI) preparerades för elektronmikroskopering. Vid obduktion togs även prov för att reisolera klamydia samt prov för allmän bakteriologisk odling, mykoplasmaodling och virusdetektion. Fyra av grisarna visade kraftiga kliniska symtom 4-5 DPI med kroppstemperatur utanför normalvariation. Två av dessa grisar var moribunda med undertemperatur. Övriga grisar obducerades DPI 7, 14, 21, 28 och 35 och uppvisade fram till och med DPI 21 ökad andningsfrekvens vid fysisk ansträngning samt något förhöjd kroppstemperatur jämfört med kontrollgrisarna. Samtliga R33 inokulerade grisar var vid obduktion tunna med raggig päls. Grisar obducerade 7-21 DPI hade hydropericard och vattnigt innehåll i colon. Alla infekterade grisar hade ospecifika makroskopiska förändringar i lungorna i form av mer eller mindre utbredda konsolideringar av lungvävnaden i samtliga lobar. Conchorna uppvisade inga makroskopiska förändringar. Makroskopiska förändringar kunde inte ses hos kontrollgrisarna. Histopatologiskt sågs fokalt utbredd bronkointerstitiell pneumoni i lungvävnaden från grisar obducerade 7 DPI. Även i lungorna från grisar obducerade 14 och 21 DPI sågs bronkointerstitiell pneumoni, dock mindre uttalat. I lungvävnad från grisar obducerade 28 och 35 DPI sågs fortsatt minskande inflammation. Conchorna från samtliga infekterade grisar hade förekomst av intraepiteliala spalter fyllda med neutrofiler och ett flertal epitelceller var vakuoliserade. I *propria submucosa* sågs små fokala infiltrat av inflammationsceller. Hos några av grisarna obducerade 7 och 14 DPI sågs mild multifokal villiatrofi i ileum. Ingen av de infekterade grisarna hade lesioner i levern. Kontrollgrisarna saknade lesioner i samtliga vävnader. Vid immunhistokemisk infärgning av preparat från infekterade grisar

hittades rikligt med klamydiaantigen i nedre luftvägsepitel, lungvävnad och inflammationsceller från grisar obducerade 7 DPI. Antalet infärgade nedre luftvägs- och lungvävnadsceller var markant lägre i preparat från grisar obducerade 14 och 21 DPI, dock var infärgningen av immunceller likartad. I preparat från grisar obducerade 28 och 35 DPI sågs sparsam infärgning endast i alveolarmakrofager. I epitel från conchorna sågs hos samtliga grupper av infekterade grisar en svag infärgning. Vid infärgning av ileum med villiatrofi påvisades klamydiaantigen i enterocyterna. Vid elektronmikroskopisk undersökning av lungvävnad och conchaepitel hittades klamydia och glykogenpartiklar i cytoplasman endast i lungvävnad. Intracytoplasmiska klamydia återfanns oftast i membranbundna vakuoler men även fritt i cytoplasman. Alla morfologiska stadier av klamydia kunde ses. Döda eller degenererade klamydia sågs i cytoplasman hos makrofager. Klamydia återisolerades från nossvabbprover och vävnadsprover tagna på grisar obducerade 7-21 DPI och hos en av två obducerade 28 DPI. Klamydia kunde inte isoleras från kontrollgrisar. Allmän bakteriologisk undersökning av nossvabb och vävnad från samtliga grisar obducerade 7-21 DPI var negativ, men från grisar obducerade 28 och 35 DPI kunde *Bacillus* spp (apatogen) isoleras från tarmprov. Mykoplasmer, PRV, PPV, PRRSV, RV och TGEV från vävnad eller faeces kunde inte påvisas vare sig hos infekterade grisar eller hos kontrollgrisar. (Rogers 1996a)

Gastrointestinalkanalen

Klamydia har satts i samband med tarminfektion, både hos normala och gnotobiotiska grisar. Vid undersökning av tunntarm från 6 st kultingar från olika besättningar (varav 4 st uppvisat diarré före avvänjning, 1 st uppvisat diarré 5 dagar efter avvänjning och 1 st avvand kulting uppvisat viktförlust och lindrig hosta) fann man lindrig-måttlig nekrotiserande enterit i distala jejunum och ileum, mild-måttlig villiatrofi med nekrotiskt eller påverkat villiepitel, ökat antal neutrofiler i *lamina propria* samt varierande mängd debri och fibrin på slemhinnans yta. I två av preparaten, från ej avvand kulting och avvand kulting kunde man påvisa porcint rotavirus, men i övrigt kunde inga kända tarmpatogener som exempelvis TGEV, *E.coli* K88, *E.coli* K99, *E.coli* 987P eller *Isospora suis* hittas med immunohistokemisk infärgning eller elektronmikroskopi. Klamydia påvisades genom direkt immunohistokemisk infärgning med monoklonala anti-klamydiaantikroppar känsliga för både *C. trachomatis* och *C. psittaci*. Klamydia från preparat återisolerades på cellkulturer, vilka uppvisade toxiskt och cytopatologiskt utseende 48-72 h efter infektion. Vid undersökning av preparat med elektronmikroskopi hittades intracytoplasmiska strukturer kompatibla med *Chlamydia* spp. (Nietfeld 1993).

I ett försök med syfte att utröna om klamydiabakterier isolerade från grisar i produktionsbesättning orsakar enterokolit, användes två klamydiaisolat som inokulat på gnotobiotiska grisar. Isolaten hämtades från tarmen hos kultingar med diarré. Dessa typades som *C. trachomatis*, eller en nära släkting till denna, och benämndes R19 och R27. (Båda isolaten omklassificerades till *C. suis* 1999) Grisarna inokulerades *per oralt* vid 3-4 dagars ålder, 10 st med 10^9 IFU (inclusion forming unit) och 14 st med 10^6 IFU av R27, samt 20 st med 10^5 IFU av R19. De infekterade grisarna undersöktes två gånger dagligen avseende förekomst av diarré samt tecken på dehydrering, anorexi och letargi. Kroppstemperaturen mättes en gång per dag. Samtliga infekterade grisar fick diarré 4-5 dagar post

inokulering och hade förhöjd kroppstemperatur. Vid obduktion sågs dock skillnader i allvarlighetsgrad både makroskopiskt och histopatologiskt mellan isolaten och mellan infektionsdoser. Ingen kontrollgris utvecklade diarré eller feber. Histologiskt sågs lesioner främst i distala jejunum och ileum, vilka uppvisade fläckvis hyperemi, måttlig-kraftig multifokal villiatrofi med multifokala villinekroser och uttalad förekomst av neutrofiler och debri i lumen. Förekomst av nekros begränsades till enterocyter i villis apikala halva eller till topparna på villi, vilket stämmer väl överens med klamydians behov av celler i G₁-fas för replikering. Det syntes även en mindre mängd neutrofiler och enstaka makrofager i *lamina propria*. Vid immunhistokemisk färgning påvisades klamydiaantigen i enterocyter samt i enstaka bägarceller och kryptenterocyter. Förekomsten av klamydiaantigen var rikligast i preparaten från grisar infekterade med R27 i hög dos och den korrelerade tydligt med villiatrofi och nekros. Även i preparat som inte uppvisade histologiska lesioner eller endast uppvisade lindriga lesioner kunde klamydiaantigen påvisas i enterocyter. Antigen återfanns även i makrofager i *lamina propria* och i inflammationshärdar i submucosa och serosa. Ultrastrukturell undersökning med elektronmikroskop av ileum infekterad med endera isolatet påvisade klamydia i cytoplasman hos enterocyter samt hos enstaka bägarceller. Klamydia kunde återisoleras från ileum, colon och faeces, men även från mesenteriallymfknotor och lever. Förutom *Bacillus sp.* (apatogen) kunde inga andra bakterier eller virus påvisas hos vare sig infekterade grisar eller kontroller. (Rogers 1996b)

MATERIAL OCH METODER

Besättningar

Tre stycken slaktsvinsbesättningar i Uppland har provtagits. Besättning 1 valdes utifrån sitt goda samarbete med avdelningen för svinmedicin och fjäderfäsjukdomar, institutionen för Kliniska Vetenskaper, SLU, samt utifrån att den är en av de största svinbesättningarna i området som köper in grisar från många olika smågrisbesättningar och på grund av att konjunktivit noterats i besättningen. Besättning 2 är den besättning där den i introduktionen nämnda besättningsutredningen utfördes och som tidigare uppmärksammat konjunktivitproblem. Besättning 3 har valts ut och provtagits i samarbete med Svenska Djurhälsovården AB, då vissa avdelningar haft förekomst av konjunktivit. I samtliga besättningar hölls grisarna i konventionell slaktsvinsuppfödning inomhus med boxar om ca 10 djur/box. Strömmaterial vid provtagningstillfällena har varit spån eller hackad halm. Besättning 2 utfodrade med torrt foder, de andra två med blötfoder. Vid provtagningstillfället förekom ingen överbeläggning av stallar eller boxar. Djurhållningen kunde vid tidpunkten för provtagning anses vara god i samtliga besättningar och stallmiljön bra.

Djur

De provtagna djuren var slaktsvin i varierande ålder som satts in i stallarna ca 4 till 14 veckor tidigare. Provtagningen har gjorts som en fall-kontrollstudie där förekomst av måttlig-kraftig konjunktivit har ansetts vara fall och kontrollen har varit en gris från samma box med ingen eller lindrig konjunktivit. Lindrig hyperemi i synliga delar av konjunktiva, utan markant chemos och utan epiphora har bedömts som 'lindrig konjunktivit'. Hyperemisk och chemotisk konjunktiva med sparsam till kraftig epiphora alternativt muköst/mukopurulent ögonflöde har

beroende på uttrycksgrad bedömts som 'måttlig konjunktivit' och 'kraftig konjunktivit'. Tydlig skillnad med avseende på ögonstatus mellan fall och kontroll har eftersträvat. I besättning 1 provtogs 21 st grisar med lika många kontroller fördelat på 7 st prov vardera ur besättningens tre stall. Även i besättning 2 provtogs 21 st grisar med konjunktivit plus kontroller, fördelat på 7 st prover från tre stall. I besättning 3 provtogs 20 st grisar och 20 kontroller från en och samma avdelning.

Provtagning

Provtagningen har genomförts under oktober 2007 och har utförts av författaren enligt provtagningsanvisningar från SVAs klamydialab. Efter att medhjälpare bremsat grisen har ett svabbprov tagits från konjunktivalslemhinnan på insidan av nedre ögonlocket på både höger och vänster sida. En steril bomullspinne har förts in innanför nedre ögonlocket och roterats mot slemhinnan i syfte att fånga upp epitelceller. Svabbarna har därefter placerats i sterilt mjölkkrör (ett per gris) som märkts med boxnummer samt som prov eller kontroll.

Hantering av proverna

Proverna frystes inom 5 timmar från provtagning och förvarades frysta vid -70°C fram till preparering.

Preparering

Prover och kontroller har preparerats vid olika tillfällen. Även besättningarna har till viss del separerats från varandra då kapaciteten hos laborieutrustningen begränsat antalet prover möjliga att iordningställa vid ett och samma tillfälle.

Metoden för extraktion av DNA från svabbproverna som använts är "DNA-preparation från svabb enl. K. Sachse", Instruktion nr KLA/INS-018, vilket är den som används rutinemässigt vid Klamydialab, Avdelningen för bakteriologi, SVA. Utförandet har dock avvikit från protokollet på två punkter; sax och pincetter (3 st) som använts har spritats av med Desytol 70 och tillåtits torka mellan proverna istället för att ha enskilda instrument för varje prov alternativt avbränning mellan proverna som protokollet anger, samt att koncentrationen på det Proteinase K som använts har varit 20 mg/ml och inte 10 mg/ml vilket innebar ändring av volymdelar vid mixandet av brukslösning för att erhålla den enligt protokollet rätta koncentrationen av Proteinase K. Arbetet med extraktionen utfördes i LAF-bänk och med handskar. Safe-lock-rör och Eppendorffrör märktes upp med löpnummer, tre per prov. Eppendorffrören förseddes med avklippta pipettspetsar och Safe-lock-rören med 500 μL lyseringsbuffert (50 mM Tris-HCl pH 8.4, 1 mM EDTA, 0,5 % Tween-20). De avklippta svabbarna placerades i rören med lyseringsbuffert, vortexades under 1 min och centrifugerades vid $12000 \times g$ i 30 sekunder. Svabbarna fördes därefter över till rören med pipettspetsarna och centrifugerades vid $12000 \times g$ i 1 minut. Svabbar med pipettspets avlägsnades och vätskan från svabben förflyttades över till respektive Safe-lock-rör. Proven centrifugerades vid $12000 \times g$ i 15 minuter. Proteinase K- blandningen mixades till brukslösning: 10 μL Proteinase K och 50 μL Lyseringsbuffert pH 8,5 beräknades per prov. Blandningen vortexades och centrifugerades vid $3000 \times g$ i 30 sekunder. Supernatanten i Safe-lock-rören avlägsnades och till pelletten sattes 60 μL brukslösning innehållande Proteinase K. Proven vortexades, centrifugerades vid $3000 \times g$ i 30 sekunder och inkuberades därefter i värmeblock vid 60°C i minst 2

h. Därefter vortexades proven igen och centrifugerades vid $3000 \times g$ i 30 sekunder varefter de inkuberades i 15 minuter vid $97^\circ C$ för att inaktivera Proteinase K. Ytterligare en uppsättning rör märktes med löpnummer, ett 1,5 ml och ett 0,5 ml Eppendorffrör per prov. Efter inaktivering av Proteinase K centrifugerades proven vid $12000 \times g$ i 5 minuter för att avlägsna större proteinfragment och debris. Varje prov späddes 1:10 i 0,5 ml Eppendorffrör; i detta fall 5 μL prov + 45 μL DNAsfritt vatten, och resterande supernatant fördes över till 1,5 ml Eppendorffrör. Proverna frystes vid $-20^\circ C$ fram till PCR. Använd utrustning och LAF-bänk rengjordes och UV-ljusbestrålades i 30 minuter. För att säkerställa god laboratorierutin har användning av röröppnare och handskbyte efter vart 8-10:e prov samt vid behov, tillämpats.

PCR

Använd analysmetod är en realtids-PCR för påvisande av 23S rRNA-genen hos *Chlamydiaceae*. De primrar som använts amplifierar en DNA-sekvens som är gemensam för alla *Chlamydiaceae*, detta eftersom det inte finns väl fungerande artspecifika primrar lättillgängligt. Metoden är kvalitativ och används vid Klamydialab, Avdelningen för bakteriologi, SVA, för att undersöka förekomsten av klamydofila/klamydia i svabb- eller organprov (Analysnr BKT/KLA/M-100).

Reagenser:

- DNAs/RNAs-fritt vatten 10x PCR Buffert II (Applied Biosystems)
- $MgCl_2$ (25 mM, Applied Biosystems)
- dNTP (GeneAmp 10 mM dNTP Mix with dTTP, 2,5 mM av varje dNTP, Applied Biosystems)
- TQF-primer 5'-GAA AAG AAC CCT TGT TAA GGG AG-3' (Forwardprimer, brukslösning 10 pmol/ μL , Thermo Scientific)
- TQR-primer 5'-CTT AAC TCC CTG GCT CAT CAT G-3' (Reverseprimer, brukslösning 10 pmol/ μL , Thermo Scientific)
- FAM-probe 5':6-FAM 3'BHQ1 5'-CAA AAG GCA CGC CGT CAA-3' (Brukslösning 10 pmol/ μL , Thermo Scientific, prob till PCR-produkt.)
- ROX-probe 5':ROX 3'BHQ2 5'-CCG ACA GGA TGC AGA AGG AGA TCA-3' (Brukslösning 10 pmol/ μL , Thermo Scientific, prob till mimic.)
- AmpliTaq Gold polymerase (5 U/ μL , Applied Biosystems)
- Klamydiamimic, klon 50 (opublicerad gensekvens från människa), brukslösning spädning 10^{-8} .

Arbetet utfördes behandlat i LAF-bänk. Samtliga reagenser och prov tinades och vortexades innan användning.

Mastermixen bereddes i ett rent lab (premixlab) på det sätt som följer; 12,625 μL DNAs/RNAs fritt vatten, 2,5 μL 10x PCR Buffert II, 2,5 μL $MgCl_2$, 2,0 μL dNTP, 0,375 μL TGF-primer, 0,375 μL TGR-primer, 0,25 μL FAM-probe, 0,25 μL ROX-probe och 0,125 μL AmpliTaq Gold polymerase. Angivna volymer multiplicerades med antalet prov inklusive positiva och negativa kontroller plus mastermix motsvarande ett extra prov för lite marginal. De beräknade volymerna avrundas vid behov till lämplig noggrannhet möjlig att pipettera. 2 st PCR-rör per

prov märktes upp (2st spädningar), samt rör för positiv kontroll (förkortat PK, två olika spädningar) och negativ kontroll (2 st, en kontroll med mimic utan templat och en kontroll helt utan mimic eller templat). Uppmärkningen av PCR-rör och dispensering av Mastermix till rören skedde i premixlab. Till ena röret för negativ kontroll (NK 2) pipetterades 21 μL Mastermix + 4 μL DNAs/RNas-fritt vatten. Därefter tillsattes mimic till Mastermixen, 2 μL multiplicerat med antalet resterande prov och kontroller samt den extra marginalen. Mastermixen vortexades och centrifugerades kort vid $3000 \times g$. Till kvarvarande PCR-rör tillsattes 23 μL Mastermix. Till den andra negativa kontrollen (NK 1, mimic kontroll) pipetterades 2 μL DNAs/RNas-fritt vatten. De kvarvarande rören förflyttades sedan över till templatlab där det tillsattes 2 μL prov eller positiv kontroll.

DNA-amplifieringen skedde i en Rotorgene 3000-termocykler med följande PCR-program:

Vid körningens början, när temperaturen i rören nått 60°C , utför maskinen en kalibrering där signalförstärkningen ställs in för de våglängder som FAM- och ROX-proben sänder ut.

- 94°C 10 min \times 1 (denaturering och aktivering av *Taq* Gold)
- 95°C i 15 s följt av 59°C i 1min \times 45 cykler.
- 25°C 5 min \times 1 (avsvalning)
- Acquiring on FAM and ROX. Instrumentet mäter signaler på våglängder som motsvarar fluoroforena FAM (klamydiaprob) och ROX (mimicprob).

Resultaten av PCRen analyseras kontinuerligt genom spektrofotometrisk mätning av den fluorescens som avges från proverna.

Provbedömning

PCR-processen i sin helhet anses tillförlitlig när; Den negativa kontrollen NK 2 inte har något Ct-värde för vare sig FAM-prob eller ROX-prob, vilket innebär att mastermixen inte innehållit någon kontaminering av DNA. Kurvan över uppmätt fluorescens har en S-liknande form i rådataprogrammet och inte är för flat. Den positiva kontrollen har för FAM-proben ett Ct-värde som ligger i intervallet 31-34 för PK^{-5} och 23-26 för PK^{-3} .

Ett prov bedöms som negativt när Ct-värdet för ROX-proben är lägre än 38 och inget Ct-värde för FAM-proben erhålls. Om inget värde för vare sig FAM- eller ROX-prob erhålls är provet negativt pga hämning av PCR-processen vilket innebär att ingen produkt bildats. Provet bedöms som positivt när Ct-värdet för FAM-proben är lägre än 36. Ct-värden för FAM-prob mellan 36-38 ligger i "gråzon" för att vara positiv. Om Ct-värdet för antingen FAM-prob eller ROX-prob överstiger 38 bedöms provet som osäkert och skall köras om.

Statistisk metod

För att analysera om förekomsten av *Chlamydiaceae* skilde sig mellan grisar med respektive utan konjunktivit användes χ^2 -test. Denna analys genomfördes både i materialet totalt samt inom respektive besättning. I den senare analysen användes

även Fisher's Exakta test, eftersom antalet observationer bedömdes vara alltför lågt för att använda enbart X^2 -test.

Skillnader som resulterade i ett P-värde $\leq 0,05$ bedömdes som signifikanta.

RESULTAT

Efter provresultatsbedömning och borträkning av de prov-kontroll-par där endera parten eller båda parterna inte hade tillförlitliga provresultat alternativt hämmad PCR-process återstod totalt 54 st prov-kontroll-par då positivt analys svar bedömdes vara Ct-värde lägre än 36 för FAM-prob (resultat i "gråzonen" för positivt analys svar uteslutna) och 58 st prov-kontroll-par då positivt analys svar bedömdes vara Ct-värde lägre än 38 för FAM-prob (resultat i "gråzonen" för positivt analys svar inkluderade), fördelat över besättningarna som följer; **Besättning 1** 19/21 prov-kontroll-par i gruppen "Ct <36 för FAM-prob = positivt analys svar" och 19/21 prov-kontroll-par i gruppen "Ct <38 för FAM-prob = positivt analys svar". **Besättning 2** 17/21 prov-kontroll-par i gruppen "Ct <36 för FAM-prob = positivt analys svar" och 19/21 prov-kontroll-par i gruppen "Ct <38 för FAM-prob = positivt analys svar". **Besättning 3** 18/20 prov-kontroll-par i gruppen "Ct <36 för FAM-prob = positivt analys svar" och 20/21 prov-kontroll-par i gruppen "Ct <38 för FAM-prob = positivt analys svar".

Tabell 1. Resultat från provtagning och analys avseende Chlamydiaceae spp., där Ct < 36 bedömdes vara positivt analys svar, i tre slaktsvinsbesättningar (Besättning 1-3) med förekomst av konjunktivit bland slaktsvinen.

Positiv = Ct-värde <36 på FAM-prob.	Antal (n) klamydiapositiva	% Klamydiapositiva
Totalt (108 prover)	80	74
<i>Kontroll (54 st)</i>	35	65
<i>Konjunktivit (54 st)</i>	45	83
Besättning 1 (38 prover)	30	79
<i>Kontroll (19 st)</i>	12	63
<i>Konjunktivit (19 st)</i>	18	95
Besättning 2 (34 prover)	27	79
<i>Kontroll (17 st)</i>	14	82
<i>Konjunktivit (17 st)</i>	13	76
Besättning 3 (36 prover)	23	64
<i>Kontroll (18 st)</i>	9	50
<i>Konjunktivit (18 st)</i>	14	78

Det fanns en signifikant skillnad i klamydiaförekomst hos grisar med och utan konjunktivit totalt i det undersökta materialet (P=0,03). På besättningsnivå sågs en signifikant (P= 0,04) högre klamydiaförekomst hos grisar med konjunktivit, jämfört med grisar utan konjunktivit i besättning 1. I besättning 2 och 3 förekom ingen skillnad mellan grupperna (P= 1,0 resp. P= 0,16). Vid jämförelse av

klamydiaförekomst mellan de tre besättningarna, hos kontrollgrisar och konjunktivitgrisar var för sig, sågs ingen skillnad i klamydiaförekomst (P=0,13 resp. P=0,25).

Tabell 2. Resultat från provtagning och analys avseende Chlamydiaceae spp., där Ct < 38 bedömdes vara positivt analys svar, i tre slaktsvinsbesättningar (Besättning 1-3) med förekomst av konjunktivit bland slaktsvinen.

Positiv = Ct-värde <38 på FAM-prob.	Antal (n) klamydiapositiva	% Klamydiapositiva
Totalt (116 prover)	90	78
<i>Kontroll (58 st)</i>	42	72
<i>Konjunktivit (58 st)</i>	48	83
Besättning 1 (38 prover)	32	84
<i>Kontroll (19 st)</i>	14	74
<i>Konjunktivit (19 st)</i>	18	95
Besättning 2 (38 prover)	32	84
<i>Kontroll (19 st)</i>	17	89
<i>Konjunktivit (19 st)</i>	15	79
Besättning 3 (40 prover)	26	65
<i>Kontroll (20 st)</i>	11	55
<i>Konjunktivit (20 st)</i>	15	75

Det fanns ingen signifikant skillnad i klamydiaförekomst hos grisar med och utan konjunktivit totalt i det undersökta materialet (P=0,18). Inte heller observerades någon signifikant (P= 0,18, P= 0,65 resp. P=0,13) skillnad i klamydiaförekomst inom besättningarna. Det förekommer ingen skillnad i klamydiaförekomst mellan besättningarna hos vare sig kontrollgrisargruppen (P=0,13) eller konjunktivitgruppen (P=0,24).

DISKUSSION

Syftet med denna studie var att undersöka förekomsten av *Chlamydiaceae* hos grisar med och utan konjunktivit i försök att utröna om *Chlamydia/Chlamydomphila* är en orsak till konjunktivit i slaktsvinsbesättningar. I det undersökta materialet förekommer *Chlamydiaceae* i konjunktivalsvabbprover från både grisar med och utan kliniska symtom på konjunktivit. Att det inte är någon tydlig skillnad i klamydiaförekomst hos grisar med och utan symtom på konjunktivit kan tänkas bero på ett antal faktorer ensamma eller i kombination.

Provbedömning

Bortfallet av prov-kontroll-par har gett ett något mindre provunderlag än planerat. Exkludering har skett pga svårtolkade provsvar och/eller hämning av PCR-processen i en eller båda av provets spädningar. Denna minskning skulle möjligen ha kunnat undvikas genom om-analys av de berörda proverna och genom ytterligare spädning av de prover där PCR-processen hämmats. Detta alternativ har dock valts bort eftersom det som mest räknades bort 8 st prov-kontroll-par, vilket inte påverkade möjligheten till statistisk bearbetning negativt. Det finns två alternativ till resultat beroende på provbedömning. Det första alternativet ("Ct <36 för FAM-prob = positivt analys svar") har en snävare bedömning av vad som betraktas som ett positivt provsvar och det andra alternativet ("Ct <38 för FAM-prob = positivt analys svar") har en mer generös bedömning. Höga Ct-värden kan bero på antingen liten mängd DNA i provet eller på närvaro av inhibitorer. När ett högt Ct-värde på FAM-proben beror på närvaro av inhibitorer återspeglas detta i Ct-värdet på ROX-proben, som även det är högt. Den snävare provbedömningen ger skillnader i klamydiaförekomst mellan fall och kontroll i en av tre besättningar samt i materialet totalt sett, men den övergripande tolkningen av studiens resultat blir dock att det inte är skillnad i klamydiaförekomst mellan fall och kontroller.

Analysmetod

Det som undersökts i denna studie är förekomsten av *Chlamydiaceae* vilket innebär att det fortfarande är okänt om de testade grisarna bär på samma art, olika arter eller flera arter av *Chlamydia/Chlamydomphila*. Dean *et al.* drar i sin studie från 2008 slutsatsen att förekomsten av blandinfektioner sannolikt är orsaken till att *C. trachomatis* inte kunnat diagnosticeras hos patienter med trachom, i de fall när analysmetoden är specifikt riktad mot enbart denna art. Denna slutsats skulle kunna förklara skillnader i denna studies resultat jämfört med andra studiers resultat där en mer artspezifisk analys har genomförts. Den använda analysmetoden i denna studie visar heller inte om det förekommer en eller flera underarter inom eller mellan besättningarna. Art- och typbestämning skulle ge mer information om huruvida arter och/eller stammar skiljer mellan besättningarna, vilket i sin tur skulle bidra till mer kunskap kring klamydiaförekomst och kliniska symtom. Det är inte helt osannolikt att virulensen kan skilja mellan olika underarter av *C. suis* (och kanske även andra ev. underarter av *Chlamydia/Chlamydomphila* återfunna hos gris) på samma sätt som den skiljer sig mellan underarter av *C. trachomatis*. Utöver ovanstående är analysmetoden kvalitativ och kan inte bestämma mängden *Chlamydiaceae* i provet. Även infektionsdosen kan vara relevant då den sannolikt påverkar allvarlighetsgraden i lesioner orsakade av klamydiainfektion (Rogers 1996b). Ett

lågt antal bakterier i provet skulle kunna förklara skillnaden i resultat mellan Ct 36 och Ct 38. Metoden kan heller inte skilja mellan viabel och avdödad *Chlamydiaceae*.

Urvalskriterier

Urvalskriteriets ”med och utan kliniska symtom på konjunktivit” har begränsningar. Resultaten i denna studie liknar delvis resultatet i en tidigare studie gjord av Grosse Beilage *et al.* 2006, vilken studerade förekomst av *C. suis* hos grisar med och utan konjunktivit i Tyskland och Schweiz. Där påvisades en signifikant skillnad i förekomst av *C. suis* hos grisar med och utan symtom på konjunktivit totalt i det undersökta materialet samt i det schweiziska materialet, men inte inom det tyska materialet. Det schweiziska materialet utgjordes av grisar i extensiv produktion där konjunktivit var relativt sällsynt medan det tyska materialet utgjordes av grisar i intensiv produktion där konjunktivit var mer vanligt förekommande. Kanske skulle större noggrannhet i vilken grad av konjunktivit som väljs som ”prov” ha gett denna studie ett mer distinkt resultat. Konjunktivit är en ospecifik reaktion som kan orsakas av både irriterande och infektiösa agens och har ett brett ”spann” av allvarlighetsgrad i uttrycket. Konjunktivit tenderar att bli mer uttalad i uttrycket om den orsakas av blandinfektion eller om det finns förvärrande miljöfaktorer samtidigt (Rogers 1999). Graden av konjunktivit varierade mellan besättningarna och mellan stallar, med kraftiga skillnader mellan fall och kontroll i vissa fall (t ex ej konjunktivit hos kontrollgris och måttlig-kraftig konjunktivit hos provgris) och mindre skillnader mellan provgrupp och kontrollgrupp i vissa fall (t ex lindrig konjunktivit hos kontrollgris och måttlig-kraftig konjunktivit hos provgris). Sannolikt förkommer även en ”lagperiod” hos klamydiainficerade grisar där klamydia finns i konjunktivalepitelcellerna innan immunförsvaret reagerat på infektionen. I studien av Watson *et al.* uppges tiden från inokulering till kliniska symtom på konjunktivit till 3-4 dagar. Detta innebär att i denna studie ingående kontroller några dagar senare skulle kunna komma att tillhöra provgruppen. Kanske skulle ett annat försöksupplägg, dvs provtagning av en hel besättning/avdelning med noteringar om vilka djur som har kliniska symtom på konjunktivit inkl. gradering, ge bättre översikt över klamydiaförekomst kopplat till symtom på sjukdom. Ett sådant försöksupplägg skulle påvisa antalet infekterade i besättningen/avdelningen och även visa andelen djur med olika grader av konjunktivit, andelen infekterande utan symtom och andelen icke infekterade djur med och utan konjunktivit, eftersom samtliga grisar i en sluten population provtas. Tre provtagna grisar i denna studie, med kliniska symtom på konjunktivit, hade mukopurulent ögonsekret. Dessa återfanns inom samma besättning. Förvärrande miljöfaktorer, det vill säga damm, ammoniak och drag, finns mer eller mindre i samtliga undersökta besättningar, den exakta förekomsten är dock bara undersökt i den besättning där den ursprungliga besättningsutredningen utfördes. I besättningsutredningen konstaterades det att miljöfaktorer sannolikt inte orsakade konjunktivitproblemen i just den besättningen. Det har tidigare noterats att intensiv produktion och hög beläggning i en besättning ger fler fall av konjunktivit (Grosse Beilage 2006) och mer uttalade kliniska symtom på infektion (Becker 2007, Rogers 1993) än i mindre och mer extensiva besättningar. I de länder där klamydiaorsakad ögoninfektion hos människa är endemisk återfinns liknande förhållanden med trångboddhet och dålig hygien (Dean 2008). Detta skulle kunna innebära att man kan förvänta sig

mer problem hos äldre grisar där beläggningsgraden är högre. Grisarna i denna studie var i åldern 16-26 veckor och beläggningen ca 10 st grisar per box. Det har även konstaterats att det förekommer blandinfektioner med klamydia hos gris (Schiller 1997, Hoetzle 2000) och hos människa (Dean 2008). Blandinfektioner med klamydia skulle kunna medföra en högre patogenicitet och allvarligare kliniska symtom på infektion än vid infektion med endast en art. Detta är dock inte närmare utrett.

Tidpunkt för provtagning

Tidpunkten för provtagning i sjukdomsförloppet skulle kunna vara avgörande för om ett provresultat blir positivt eller negativt gällande förekomst av klamydia, eftersom det förkommer att konjunktivit kvarstår trots att mikroorganismen eliminerats. Rogers *et al.* beskrev i sin studie 1999 att reisolering av klamydia från infekterade grisar var möjlig endast i gruppen som obducerades 7 dagar efter inokulering, men att histologisk förekomst av konjunktivit återfanns hos 3 av 3 infekterade grisar i de två tidigast obducerade grupperna, och hos 2 av 3 infekterade grisar i de sist obducerade grupperna. Ingen av de kontrollgrisar som obducerades vid samma tidpunkt hade histologisk förekomst av konjunktivit. Watkins *et al.* visade 1986 på marsvin, att klamydia har ett genus specifikt allergen som orsakar en specifik inflammationsreaktion hos immuna djur, vilket även bekräftats av ett stort antal efterföljande studier på marsvin och primater (Morrison *et al.* 1989) där det protein som gav upphov till immunreaktionen renats fram. Detta protein har sedan karaktäriserats närmare och konstaterats tillhöra familjen heat shock proteins, Hsp60 (Morrison 1989b, Morrison 1991). Hsp 60 återfinns hos *C. trachomatis*, *C. psittachi*, *C. pneumoniae* och *C. caviae* och bevis för att endera arten kan orsaka fördröjd hypersensitivitetsreaktion hos tidigare primärinfekterade människor har presenterats av Dean *et al.* 2008. Hsp är en nära besläktad familj proteiner som förkommer hos i stort sett alla celler, både prokaryota och eukaryota. Dessa proteiner är fylogenetisk konserverade med sinsemellan stora strukturella likheter, med 40 % homologa aminosyrasekvenser eller mer mellan varianterna (Amberger 1997). Hsp har ökat uttryck i celler som utsätts för stressorer, som t.ex. kemisk stress från fagocyter, eller enzymer från inflammationsceller (Wilson 2002). Hela familjen Hsp har konstaterat stor förmåga att stimulera immunförsvaret (van Eden 1998). Med detta i åtanke finns möjligheten att detta även kan gälla djurslaget gris och de *Chlamydiaceae* som infekterar gris. Data som ger upphov till misstankar om att *Chlamydiaceae* avdödas snabbare av ett aktiverat immunförsvaret jämfört med ett naivt immunförsvaret presenteras i studien av Watson *et al.* Detta skulle i så fall kunna innebära att tidsperioden för att påvisa en intakt organism vid en reinfektion är begränsad jämfört med en primärinfektion, dock kan immunförsvarsstimulerande komponenter (ex. Hsp60 eller LPS) från avdödade *Chlamydiaceae* finnas närvarande och orsaka konjunktivit vid en reinfektion. Hos marsvin har det visats att även primärinfektion på andra platser (vagina och tarm) än konjunktiva kan orsaka hypersensibilitetsreaktion i konjunktiva vid reinfektion med *C. caviae* (Watson 1986). Hur situationen ser ut hos djurslaget gris, om liknade hypersensitivitetsreaktioner förekommer och vilka arter inom *Chlamydiaceae* som i så fall kan orsaka detta, är inte närmare utrett.

Studier av *Chlamydiaceae* före och efter 1999.

Tidiga studier av *Chlamydiaceae* har inte kunnat skilja mellan arter på grund av att de diagnostiska metoder som använts varit begränsade till morfologi och biokemi, samt att vissa arter är mycket svårödlade. Detta kan leda till begreppsförvirring kring vilken klamydia som egentligen undersökts. Det är väsentligt att uppmärksamma vilket år en studie publicerats, mer exakt huruvida publiceringen inträffat före eller efter omklassificeringen av *Chlamydiales* publicerad av Everett *et al.* 1999. Vilken art som studien kan tänkas ha behandlat får skattas bl.a. baserat på djurart och kliniska symtom, såvida det inte går att finna ut med hjälp av senare publicerade artiklar avseende studier på arkiverat material. Klamydia som före 1999 klassificerats som underarter av *C. psittaci* (baserat på morfologiska och biokemiska karaktäristika samt kliniska symtom) omklassificerades 1999 till *Chlamydia abortus*, *Chlamydia caviae* eller *Chlamydia felis*. I studien gjord av Watkins 1986 används *C. psittaci* stam GPIC, vilken sedermera fick det nya namnet *C. caviae*. *C. suis* benämndes innan revisionen som *C. trachomatis* eller *C. trachomatis*-liknande, i till exempel studierna av Rogers *et al.* 1996 och 1999. Dessa två klamydiaarter är nära besläktade men skiljer sig ändå åt i klinik och värdpreferenser. Exempelvis så associeras *C. suis* med pneumoni, enterit och konjunktivit hos svin, medan *C. trachomatis* orsakar trachom, neonatal inklusionskonjunktivit och pneumoni, sexuellt överförbar infektion (STD) och infertilitet samt associeras till vissa artrit, främst hos människa. Det går även att utläsa skillnader i klinik och virulens mellan andra klamydiaarter. *C. abortus* uppvisar ytterligare en annan klinisk bild i och med att den orsakar aborter och svagfödda neonatala hos en rad olika djurslag inkl. människa. *C. caviae* däremot betraktas som en så gott som artspezifisk klamydia hos marsvin. Den är inte invasiv och orsakar konjunktivit i störst utsträckning men kan även orsaka genitalinfektioner liknande människans. Endast en stam, GPIC, har hittills hittats. Tittar man på olika underarter inom *Chlamydiaceae* kan man även där se skillnader i klinik och virulens. Den mest ingående studerade arten av *Chlamydiaceae* är *C. trachomatis* och hos denna finner man 18 serovarer samlade i två biovarer; trachoma (TRIC) och lymphogranuloma venerum (LGV). Biovar TRIC hyser 14 serovarer, med preferenser för olika typer av slemhinne-epitel, där serovar A-C i första hand associeras med endemiskt trachom och serovar D-K associeras med STD. Hos biovar LGV ses 4 serovarer som alla är STDs och kapabla att invadera lymfatisk vävnad. Skillnader i virulens mellan dessa två biovarer ses, LGV utmärker sig i både patogenicitet då den kapabel att orsaka systemisk sjukdom, och i förmågan att växa och frodas på cellkultur utan speciella omsorger. Även *C. pneumoniae* har biovarer som skiljer sig i virulens och patogenicitet. Biovar TWAR, endast återfunnen hos människa, orsakar akut och kronisk bronkit och pneumoni och har även associerats med en rad andra sjukdomar, medan biovar Koala uppges vara lågpatogen och biovar Equine endast visats orsaka asymtomatisk infektion. Hur många underarter det finns av *C. suis* och hur de kan indelas i biovarer och serovarer är ännu inte fullt utrett, dock är underarterna S45, R22, R24, R27 och H7 fastslagna. (Everett 1999)

Skillnader mellan analysmetoder

Eventuella skillnader i resultat mellan studier där vald analysmetod är serologi jämfört med studier som använt sig av odling eller PCR-analys beror på att metoderna mäter olika parametrar och därför är svåra att jämföra. Serologi påvisar

antikroppar mot ett smittämne. Närvaro av antikroppar mot ett antigen innebär att djuret varit i kontakt med detta agens och reagerat immunologiskt, men det är inte liktydigt med pågående eller kvarstående infektion. Serologi som metod ger resultat som är dåligt korrelerade med "bevis på infektion". Detta beror bl.a. på att en antikroppstiterhöjning föregås av en "lagperiod" under tiden som immunförsvaret initierar bildandet av antikroppar. Dessutom kan höga antikroppstitrar kvarstå i flera månader efter att smittämnet eliminerats av immunförsvaret. Därtill tillkommer tekniska spörsmål som exempelvis var cut-off-point för positiv antikropptiter skall läggas och om det förekommer korsreaktioner mellan olika antikroppar och antigen. Serologi som metod är generellt sett mer användbar till att utesluta sjukdom än att bekräfta den och har sin största användbarhet vid screening av populationer vid prevalensundersökningar. Klamydia är svår att odla varför denna metod inte är optimal ur diagnostisk synvinkel. Bakterien är svår att hålla viabel vilket ställer krav på transport av provmaterial (till exempel kyltransport och expressfrakt) för att organismen inte skall bli för svag för att replikera effektivt eller rentav dö. Dessutom är man beroende av en för klamydiaarten passande och korrekt skött cellkultur, vilket innebär att odling är en logistikkrävande procedur. Allt detta innebär att metoden kan ha ett stort antal falskt negativa provsvar. I gengäld så är ett positivt provsvar 100 % diagnostiskt jämfört med serologi. PCR-analys ger ett direkt bevis på förekomst av nukleinsyra från klamydia och metoden kräver inte att organismen är viabel vid analystillfället. Metoden är inte heller speciellt logistiskt krävande eller arbetskrävande jämfört med odling. Falskt negativa provsvar kan bero på att smittämnet inte fångats upp vid provtagning eller på en hämning av PCR-processen. Det går att upptäcka falska negativa provsvar som beror på inkorrekt provtagning genom att vid provanalysen även påvisa förekomst av nukleinsyra från det djurslag som provtagits, eftersom epitelceller ska följa med vid korrekt provtagningsteknik. Användandet av så kallad mimic i PCR-analysen är en metod som används för att upptäcka om ett negativt provsvar beror på hämning av reaktionen. Falskt positiva provsvar orsakas av kontaminering av provet. Metoden har hög sensitivitet (94,4 %) och specificitet (81 %) med odling i cellkultur som referensmetod (Sachse 2003). Med den i studien använda analysmetoden kan andelen falskt negativa provsvar på grund av inkorrekt provtagning inte anges eftersom förekomsten av DNA från gris inte analyserats. Den kan dock bedömas som låg eftersom provtekniken är okomplicerad och med lätthet kan genomföras med stor noggrannhet på fixerad gris.

Slutsatser

Chlamydiaceae spp återfinns hos grisar både med och utan konjunktivit, dock är det sannolikt att bakterien orsakar konjunktivit hos gris. Det är däremot svårt att korrelera kliniska symptom till förekomst av *Chlamydiaceae* spp eftersom klamydiaorganismer vid provtagning dels kan fångas upp från konjunktiva innan immunförsvaret hunnit reagera och dels för att konjunktiviteten kan kvarstå efter det att klamydiaorganismen har eliminerats av immunförsvaret. Därtill varierar graden av kliniska symptom mellan de grisar som provtagits i denna och andra studier från subkliniska till kraftiga. Variationen i kliniskt uttryck skulle kunna bero på skillnader i infektionsdos, skillnader i virulens hos olika arter och underarter av *Chlamydia/Chlamydophila*, blandinfektioner av olika arter *Chlamydia/Chlamydophila* eller blandinfektion med andra mikroorganismer ex. mycoplasmer eller virus. Konjunktivit orsakad av *Chlamydiaceae* spp skulle även,

vid reinfektioner, kunna vara icke infektiös då flera arter inom *Chlamydiaceae* uppvisar förmåga att orsaka en fördöjd hypersensibilitetsreaktion hos värdjuret. Då förekomsten av *Chlamydiaceae* spp hos gris, deras patogenicitet och hur grisens immunförsvar hanterar mikroorganismerna är ett tämligen outforskat område krävs både utvidgade och fördjupade studier inom området.

TACK

Tack till Magdalena Jacobson och Nils Lundeheim för utmärkt handledning och stort tålamod. Tack till Svenska Djurhälsovården AB för hjälp kring provtagning, samt till Robert Söderlund och Stina Englund på SVA för besvarandet av frågor. Tack även till min familj för support och överseende.

LITTERATURFÖRTECKNING

Amberger A, Maczek C, Jurgens G, Michaelis D, Schett G, Trieb K, Eberl T, Jindal S, Xu Q, Wick G. 1997. Co-expression of ICAM-1, VCAM-1, ELAM-1 and Hsp60 in human arterial and venous endothelial cells in response to cytokines and oxidised low-density lipoproteins. *Cell Stress & Chaperones*, 2, 94-103.

Barker IK, Van Dreumel AA, Palmer N. 1993. The alimentary system. In: *Pathology of domestic animals*, Ed. Jubb KVF, Kennedy PC, Palmer N, 4th ed., vol. 2, p. 253. Academic Press, San Diego, CA.

Becker A, Lutz-Wohlgroth L, Brugnera E *et al.* 2007. Intensively kept pigs predisposed to Chlamydial associated conjunctivitis. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 54(6), 307-313.

Bohac J, Menzik J. 1965. Bedsonia group agents as a cause of enzootic abortion in pigs. Conference on diseases of pigs. Coll. Vet. Med. Brno.

Brunham, RC. 1999. Human immunity to Chlamydiae. In: *Chlamydia. Intracellular biology, pathogenesis and immunity.* (Stephens, R. S. ed.). ASM Press, Washington D.C. USA. ISBN 1-55581-155-8, pp 211-238.

Camenisch U, Lu ZH, Vaughan L, Corboz L, Zimmermann DR, Wittenbrink MM, Pospischil A, Sydler T. 2004. Diagnostic investigation into the role of Chlamydiae in cases of increased rates of return to oestrus in pigs. *Vet Rec.* Nov 6;155(19):593-6.

Carrasco L, Seales J, Bautista MJ, Gomez-Villamandos JC, Rosell C, Ruiz-Villamor E and Sierra MA. 2000. Intestinal chlamydial infection concurrent with post-weaning multi-systemic wasting syndrome in pigs. *Vet. Rec.* 146: 21-23.

Collier LH. 1990. Chlamydia. In: *Topley and Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunity.* 8th edition. Published Edward Arnold, London, pp 629 - 646.

Davidson HJ, Rogers DP, Yearly TJ, Stone GG, Schoneweis DA, Chengappa MM. 1994. Conjunctival microbial flora of clinically normal pigs. *Am J Vet Res.* 1994 Jul;55(7):949-51.

Dean D, Kandel RP, Adhikari HK, Hessel T. 2008. Multiple Chlamydiaceae species in trachoma: implications for disease pathogenesis and control. *PLoS Med.* Jan 3;5(1):e14.

Donald McGavin M, Carlton WW, Zachary FJ. 2001. In: *Thomson's Special Vet Pathol.* 3rd edition. Mosby Inc, 662-664.

Eggemann G, Wendt M, Hoelzle LE, Jäger C, Weiss R, Failing K., 2000. Prevalence of *Chlamydia* infections in breeding sows and their importance in reproductive failure. *Dtsch Tierarztl Wochenschr.* Jan;107(1):3-10.

Everett K, Andersen A. 1997. The ribosomal intergenic spacer and domain I of the 23s rRNA gene are phylogenetic markers for *Chlamydia* spp. Int J Syst Bacteriol 47,461-473.

Everett K, Andersen A. 1999a. Identification of nine species of the Chlamydiaceae using PCR-RFLP. Int J Syst Bacteriol 49, 803 - 813.

Everett K, Bush R, Andersen A. 1999b. Emended description of the order Chlamydiales, proposal of Parachlamydiaceae fam. nov. and Simkaniaceae fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family Chlamydiaceae, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. Int J Syst Evol Bacteriol 49, 415 – 440

Grosse Beilage E, Becker A, Pospischil A. 2006. *Chlamydia suis* in pigs with conjunctivitis- a field study in Germany and Switzerland. Proc 19th IPVS Congress Vol 2. Abstract No P 38-18 p. 595.

Guenov I. 1961. Etudes sur la pericardite fibrineuse des porcelets due au virus de l'ornithose. Bull Off Int Epizoot 55: 1465-1473.

Harris JW. 1976. Chlamydial antibodies in pigs in Scotland. Vet Rec 98: 505-506.

Hatch TP. 1996. Disulfide cross-linked envelope proteins: the functional equivalent of peptidoglycan in *Chlamydiae*? J Bacteriol 178, 1-5.

Hoelzle LE, Steinhausen G, Wittenbrink MM. 2000. PCR-based detection of chlamydial infection in swine and subsequent PCR-coupled genotyping of chlamydial omp1-gene amplicons by DNA-hybridisation, RFLP-analysis, and nucleotide sequence analysis. Epidemiol Infect 125: 427-439.

Jacobson M, Almeren J, Arnlund F, Eriksson A, Lundin T, Lundqvist U, Olsson J, Petterson M, Sterning M. 2007. Rapport från besättningsutredning – kan Klamydia orsaka konjunktivit hos gris? Svensk Veterinärtidning, 3, 19-21.

Kauffold J, Melzer F, Berndt A, Hoffmann G, Hotzel H, Sachse K. 2006a. *Chlamydiae* in oviducts and uteri of repeat breeder pigs. Theriogenol 2006 Nov;66(8):1816-23. Epub 2006 Jul 11.

Kauffold J, Melzer F, Schulze K, Leiding C, Sachse K. 2006b. Prevalence of *Chlamydiae* in boars and semen used for artificial insemination. Theriogenol Jun;65(9):1750-8. Epub 2005 Nov 8

Kazemba NK, Kindele N, Shukla RR. 1978. Arthritis in pigs from farms of the Shaba region of Zaire. Bull Anim Health Prod Afr 26: 307-317.

Kolbl O. 1969. Untersuchungen über das Vorkommen von *Miyagawanella* beim Schwein. Wein Tierarztl Mschr 56: 443-445.

Morrison RP, Lyng K, Harlan CD. 1989a. Chlamydial disease pathogenesis. Ocular hypersensitivity elicited by a genus-specific 57-kD protein. J Exp Med. March 1; 169(3): 663–675.

Morrison RP, Belland RJ, Lyng K, Caldwell HD. 1989b. Chlamydial disease pathogenesis. The 57-kD chlamydial hypersensitivity antigen is a stress response protein. *J Exp Med.* Oct 1;170(4):1271-83.

Morrison RP. 1991. Chlamydial hsp60 and the immunopathogenesis of chlamydial disease. *Semin Immunol.* Jan;3(1):25-33.

Nietfeld JC, Janke BH, Leslie-Steen P, Robison DJ, Zeman DH. 1993. Small intestinal *Chlamydia* infection in piglets. *J Vet Diagn Invest.* 5:114-117

Patton DL, Sweeney YT, Kuo CC. 1994. Demonstration of delayed hypersensitivity in *Chlamydia trachomatis* salpingitis in monkeys: a pathogenic mechanism of tubal damage. *J Infect Dis.* Mar;169(3):680-3.

Pavlov N, Milanov M, Tschilev D. 1963. Recherches sur la rickettsiose keratoconjunctivale du porc en Bulgarie. *Ann Inst Pasteur* 105: 450-454.

Popovici V, Hiastru F, Draghici D, Berbinschi C, Dorobantu R. 1972. Isolation of *Chlamydia* from pigs with various disorders. *Lucr Inst Cerc Vet Bioprep Pasteur,* 8: 19-28.

Pospischil A, Wood RL. 1987. Intestinal *Chlamydia* in pigs. *Vet Pathol.* 24: 568-570.

Rogers DG, Andersen AA, Hogg A, Nielsen DL, Huebert MA. 1993. Conjunctivitis and keratoconjunctivitis associated with *Chlamydiae* in swine. *J AmVet Med Assoc,* 203 (9), 1321-1323.

Rogers DG, Andersen AA, Hunsaker BD. 1996a. Lung and nasal lesions caused by a swine Chlamydial isolate in gnotobiotic pigs. *J Vet Diagn Invest* 8:45-55

Rogers DG, Andersen AA. 1996b. Intestinal lesions caused by two swine chlamydial isolates in gnotobiotic pigs. *J Vet Diagn Invest* 8:433-440

Rogers DG, Andersen AA. 1999. Conjunctivitis caused by a swine *Chlamydia trachomatis*-like organism in gnotobiotic pigs. *J AmVet Med Assoc,* 11, 341-344.

Rogers DG, Andersen AA. 2000. Intestinal lesions caused by a strain of *Chlamydia suis* in weanling pigs infected at 21 days of age. *J Vet Diagn Invest* 12, 233-239.

Sachse K, Grossmann E, Jager C, Diller R, Hotzel H. 2003. Detection of *Chlamydia suis* from clinical specimens: comparison of PCR, antigen ELISA, and culture. *J Microbiol Methods* 54, 233 - 238.

Sachse K. DNA-preparation från svabb. Instruktion nr KLA/INS-018, Klamydialab, Avdelningen för bakteriologi, SVA.

Schiller I, Koesters R, Weilenmann R, Thoma R, Kaltenboeck B, Heitz P, Pospochil A. 1997. Mixed infections with porcine *Chlamydia trachomatis* / *pecorum* and infections with ruminant *Chlamydia psittaci* serovar 1 associated with abortions in swine. *Vet Microbiol* 58: 251-260.

- Shewen PA. 1980. Chlamydial infection in animals: a review. *Can Vet J* 21:2-11.
- Smit S, Widmann J, Knight R. 2007. Evolutionary rates vary among rRNA structural elements. *Nucleic Acids Res* 35 (10): 3339–54.
- Sorodo C, Surdan C, Sarateanu D. 1961. Investigation on the identification of the virus of enzootic pneumonia in swine. *Studii Cerc Inframicrobiol* 12: 355-364.
- Surdan C, Anthansiu P, Sorodoc G, Copelovici D, Strulovici D, Enach A, Mocanu A. 1965. Various epizootiologic and anatomo-clinical aspects of pararickettsial infection in pigs. II. Sow enzootic abortion and orchovaginitis in boars. *Revue Roum Inframicrobiol* 2: 165.
- Sary A. 2000. Diagnosis of genital *Chlamydia trachomatis* infections. In: *Proceedings of the Fourth Meeting of the European Society for Chlamydia Research* (Saikku, P. ed.), pp 94-97, published Esculapio, Bologna.
- Teankum K, Pospischil A, Janett F, Bürgi E, Brugnera E, Hoelzle K, Polkinghorne A, Weilenmann R, Zimmermann DR, Borel N. 2006. Detection of *Chlamydiae* in boar semen and genital tracts. *Vet Microbiol* 116, p 149-157
- van Eden W, van der Zee R, Alberta GA, Prakken BJ, Wendling U, Anderton SM, Wauben MH. 1998. Do heat shock proteins control the balance of T-cell regulation in inflammatory diseases? *Immunol Today*, 19, 303-307.
- Watkins NG, Hadlow WJ, Moos AB, Caldwell HD. 1986 Ocular delayed hypersensitivity: a pathogenetic mechanism of chlamydial-conjunctivitis in guinea pigs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 83(19): 7480–7484.
- Wilson MR, Plummer P. 1966. A survey of pig sera for the presence of antibodies to the psittacosis-lymphogranuloma-venereum group of organisms. *J Comp Pathol* 76: 427-433.
- Wilson AC, Tan M. 2002. Functional analysis of the heat shock regulator HrcA of *Chlamydia trachomatis*. *J Bacteriol* 184, 6566 - 6571.