

Vytvořil:
SÚJCHBO, v.v.i.

Certifikovaná metodika

Označení metodiky:
B2/MOLB/059

**Průkaz přítomnosti genetického materiálu *Chlamydomyxa psittaci* pro
potřeby kontroly zákazu biologických zbraní pomocí real-time PCR**

Ing. Karel Bílek, Ph.D.

Realizační výstup projektu MV ČR „Výzkum moderních metod detekce a identifikace nebezpečných CBRN látek a materiálů, metod snížení jejich nebezpečnosti a dekontaminace; výzkum moderních prostředků ochrany osob a prvků kritické infrastruktury“ číslo VF20112015013.

Oponenti: Mgr. Bronislav Šimek
RNDr. Hana Kubátová, Ph.D.

prosinec 2014

Obsah

1. CÍL METODIKY	3
2. VLASTNÍ POPIS METODIKY	3
2.1 Charakteristika bakterie <i>C. psittaci</i>	3
2.2 Laboratorní diagnostika bakterie <i>C. psittaci</i>	4
2.3 Vlastní metoda	5
2.3.1 Referenční vzorek bakterie	5
2.3.2 Izolace DNA ze vzorku	6
2.3.3 qPCR	6
2.3.4 Pracovní postup a opatření pro manipulaci s materiálem a kitem	6
2.3.5 Vyhodnocení analýzy	8
3. INOVAČNÍ ASPEKTY, NOVOST POSTUPŮ	11
4. POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY	13
5. POUŽITÁ LITERATURA	14

1. CÍL METODIKY

Hlavním cílem metodiky je poskytnout zejména inspektorům Státního úřadu pro jadernou bezpečnost (SÚJB) vhodnou metodu pro průkaz přítomnosti genetického materiálu bakterie *Chlamydophila psittaci* (nebo také *Chlamydia psittaci*, dále jen *C. psittaci*) ve vzorcích získaných při kontrole dodržování zákazu biologických zbraní.

Metodika se cíleně zaměřuje na:

- možnost detekce a identifikace *C. psittaci* např. v neznámých terénních vzorcích;
- použitelnost pro široký rozsah vzorků;
- rychlou analýzu s jasnou interpretací výsledků pro zaškolený personál;
- možnost ověření pozitivitu reakce sekvenací amplifikačních produktů (v případě nejasných výsledků primárního vyšetření).

2. VLASTNÍ POPIS METODIKY

2.1 Charakteristika bakterie *C. psittaci*

C. psittaci je taxonomicky zařazena do čeledi *Chlamydiaceae*, zástupci této čeledě jsou gram-negativní bakterie. *C. psittaci* způsobuje infekce u ptáků, savců ale i u lidí. Člověk se může nakazit vdechnutím kontaminovaného prachu nebo přímým kontaktem s nakaženým zvířetem, nejčastěji ptákem. Infekční potenciál mají tzv. infekční elementární tělíska (dále jen EB), která vynikají odolností proti vyschnutí a jsou tak schopna perzistovat v prostředí několik týdnů až měsíců. Tato skutečnost umožňuje horizontální přenos infekce i bez přímého kontaktu s nakaženým jedincem.

C. psittaci je velmi malá bakterie měřící cca 0,5 μm . Bakterie se vyznačuje specifickým růstovým cyklem, který zahrnuje EB a retikulární tělíska (dále jen RB). EB slouží jako mediátor pro vniknutí do vnímavé hostitelské buňky, která jej pozře procesem podobným endocytóze. Po vstupu do buňky se EB transformuje ve větší, neinfekční, ale metabolicky aktivní RB. Následně se RB dělí, a pak opět kondenzují v infekční EB. Délka růstového cyklu je variabilní, ale obvykle trvá 48-72 hodin. Růstový cyklus chlamydií většinou končí lýzou buňky a výsevem infekčních EB. V případě chronické infekce jsou infekční EB vypuzovány z buňky postupně. V případě *C. psittaci* není kultivace bakterie tak snadná jako u většiny bakterií. Bakterii je nutno kultivovat na kompetentních buňkách za specifických podmínek.

Komplikovaný průběh onemocnění, relativní odolnost v prostředí a velikost infekčních EB cca 300-400 nm jsou vlastnosti, které řadí bakterii do skupiny vysoce rizikových agens dle vyhlášky č. 474/2002 Sb.¹

2.2 Laboratorní diagnostika bakterie *C. psittaci*

Laboratorní diagnostiku *C. psittaci* lze provádět několika způsoby. Kultivace bakterie je velice specifická metoda, ale senzitivita takového vyšetření je na úrovni 50 %. Detekce specifických antigenů s použitím druhově specifických monoklonálních protilátek je obvykle prováděna imunofluorescencí, kde je opět zaručena vysoká specifita, ale s nízkou senzitivitou. Situaci v diagnostice komplikuje skutečnost, že různé druhy z celého řádu Chlamydiales mají podobné vlastnosti a různý stupeň sekvenční analogie nukleových kyselin, což vede někdy k problémům v diagnostice, hlavně v sérologii u rodových i druhových protilátek.

Pro detekci PCR metodami byla běžně používána poměrně konzervativní oblast ribosomální 16S rDNA resp. 23S rDNA. Zde však byla určitá limitace, z důvodu falešně pozitivních výsledků. V poslední době, kdy došlo k velkému nárůstu dostupných sekvencí, začaly převažovat metody využívající pro detekci druhově specifické sekvence genu (viz např. Okuda *et al.*, 2010; Zocevic *et al.*, 2012). S postupným zaváděním celogenomového sekvenování lze pro specifickou detekci využít i dalších unikátních sekvencí, které se vyskytují v genomu *C. psittaci* (viz Viogt *et al.*, 2012). V případě PCR metod lze konstatovat, že se v současnosti jedná o nejspolehlivější metodu při dodržení správných postupů odběru vyšetřovaného materiálu. V případě technologie real-time PCR (nebo také qPCR) jsou výhody kratšího času na zpracování a nižší ceny eliminováním post-amplifikačních analýz. Dále má tato reakce obvykle vyšší citlivost a snižuje výskyt kontaminace v porovnání s konvenční PCR. Real-time PCR také umožňuje provádět kvantitativní analýzu genových produktů, čímž predikuje aktuální dávku patogenu (Heid *et al.*, 1996).

¹ Vyhláška, kterou se provádí zákon č. 281/2002 Sb., o některých opatřeních souvisejících se zákazem bakteriologických (biologických) a toxinových zbraní a o změně živnostenského zákona.

2.3 Vlastní metoda

Metoda je vyvinuta pro zpracování celogenomové DNA izolované z vyšetřovaného vzorku, proto není vzorkování a izolace předmětem této metodiky. Metoda je založena na průkazu přítomnosti specifické sekvence kódující jednu ze subjednotek vnějších membránových proteinů (outer membrane protein) dále jen *OmpA*. Proteinová podjednotka *OmpA* je, stejně jako ostatní produkty genů skupiny OMP, zodpovědná za vstup agens do cílové buňky (Escalante-Ochoa *et al.*, 1998).

Pro specifickou detekci přítomnosti DNA *C. psittaci* byly využity specifické primery v kombinaci s Universal ProbeLibrary sondou (dále jen UPL, Roche Diagnostic GmbH, Německo). Současně je v reakční směsi i nespecifické interkalační barvivo druhé generace SYTO 61 (Invitrogen, USA). Vzhledem ke skutečnosti, že je detekce prováděna ve dvou oddělených fluorescenčních spektrech, byl pro analýzu zvolen cykler Rotor-Gene 6000 (CorbettResearch, Qiagen GmbH, Německo). Při reakci je amplifikován fragment o specifické délce 73 bp, který obsahuje hybridizační místo pro UPL sondu. Bezprostředně po PCR reakci následuje analýza teploty tání PCR produktu, která je prováděna prostřednictvím SYTO 61. V reakci je také přítomna interní kontrola (dále jen IC) pro vyloučení možné inhibice PCR reakce, detekce pro IC je prováděna současně a neovlivňuje vlastní reakci.

Materiál a zařízení nutné k provedení reakcí: provedení qPCR reakce bylo ověřeno na real-time PCR cykleru Rotor-Gene 6000, další spotřební materiál je PCR voda, PCR zkumavky popř. mikrozukavky, mraznička, vortex, centrifuga, lednice, chladicí bločky, dvě sady pipet (jedna sada pro izolaci a pipetování izolované DNA a jedna sada pipet pro pipetování reakční směsi). Metodika je zpracována dle požadavků publikace Bustin *et al.*, 2009 *The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments*.

2.3.1 Referenční vzorek bakterie

Referenční vzorek pro vývoj detekce bakterie byl získán z německé sbírky DSMZ (Leibniz Institute DSMZ - German Collection of Microorganisms and Cell Cultures) pod číslem *C. psittaci* 27007. Bakterie byla kultivována na kompetentních buňkách ze stejné sbírky (typ buněčné linie L-929).

Bakterie byla kultivována na výše uvedeném typu buněk při 37 °C po 4 dny.

2.3.2 Izolace DNA ze vzorku

K izolaci celogenomové DNA ze vzorku lze použít komerčně dostupné izolační kity. Metodika byla ověřena s použitím izolačního kitu RTP Bacteria DNA Mini Kit (STRATEC Biomedical AG, Německo) číslo produktu 1033200200 nebo 1033200300. Izolace dle návodu výrobce. Izolovaná DNA je v případě potřeby uchována při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. V závislosti na charakteru vzorku byla výše uvedeným kitem dosahována koncentrace DNA v řádech desítek ng/ μl , poměr absorbance 260/280 nm se pohybuje $2,6 \pm 0,25$.

2.3.3 qPCR

Pro provedení reakce je použit qPCR 2x Master mix (Top-Bio, ČR) číslo produktu: P501, P502, P503 a P503xl. Jedná se o kompletní mix reagensů nutných pro PCR. Mix se dlouhodobě skladuje při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, ale je možné i krátkodobé skladování maximálně však dva týdny při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Sekvence primerů použitých v protokolu:

ChP_ompA F3: 5'-ACCTGTAGCCTGCGTAGGAG-3'

ChP_ompA R3: 5'-CGATCGTGTATTAAGTTGATGTG-3'

Sekvence použité UPL sondy č. 46:

5'-GCAGCCAC-3'

2.3.4 Pracovní postup a opatření pro manipulaci s materiálem a kitem

Při pracovních operacích vždy používat ochranné rukavice. Provádět veškeré operace při přípravě PCR mixu v PCR boxu. Pro každé vyšetření využívat systému pozitivní kontroly (cílová DNA), negativních kontrol tj. jiná než cílová RNA/DNA a NTC (z angl. No Template Control) tj. vzorek bez nukleových kyselin.

- a) Přemístit potřebné roztoky, případně vzorek DNA z mrazicího boxu (cca 10-15 min. před započítím práce) do lednice (pozdvolné rozmražení v temnu), vyhnout se opakovanému rozmrazování, které může vést ke snížené senzitivě.

- b) Připravit pro detekci potřebné množství PCR mixu (násobky objemu) ve složení ze zásobních roztoků dle Tab. I a vložit roztoky do chladicího stojánku. Zásobní roztoky vrátit zpět do mrazicího boxu nebo lednice.

Tab. I: Složky reakční směsi včetně příkladu kalkulace pro jednu reakci.

Složky reakční směsi	Množství (μl)
PCR voda	1,1
qPCR 2x Master Mix	7,5
ChP_ompA F3 (10 μM)	0,5
ChP_ompA R3 (10 μM)	0,5
Universal ProbeLibrary sonda #46 (10 μM)	0,3
SYTO 61 (50 μM)	0,6
UCO Assay HEX	1,5
UCO Standard (1E4)	1
Vzorek nebo + nebo - kontrola a nebo NTC (viz výše)	2
Celkový objem	15

- c) Mix promíchat pipetováním. Následně rozpipetovat po 13 μl do potřebného množství zkumavek.
- d) Do zkumavek s PCR mixem označených „studovaný vzorek“ přidat 2 μl zkoumané DNA.
- e) Do zkumavky s PCR mixem označené „pozitivní kontrola“ přidat 2 μl izolované DNA *C. psittaci* 27007.
- f) Do zkumavky s PCR mixem označené „negativní kontrola“ přidat 2 μl jiného vzorku (jiného agens než je *C. psittaci*).
- g) Do zkumavky s PCR mixem označené „NTC“ přidat 2 μl PCR vody.
- h) Zkumavky uzavřít víčky (pracovat sterilně), vložit do přístroje a spustit program, reakční podmínky zadat pro kanály Green, Yellow a Red viz Tab. II.
- i) Výsledky uložit a zálohovat do příslušného adresáře. Název souboru a cestu k souboru zapsat do protokolu.
- j) Použité laboratorní pomůcky (pipety) ponechat v pracovním boxu pro následnou dekontaminaci, použitý spotřební materiál odložit do plastového boxu a následně likvidovat odpovídajícím způsobem (spalovna).

Tab. II: Popis nastavení cyklu a podmínek PCR reakce.

Program		Teplota	Čas	Počet cyklů	Měření fluorescence
Denaturace		94 °C	1 min.	1	
Amplifikace	Denaturace	94 °C	10 s	40	každý cyklus: G* každý cyklus: Y*
	Annealing	55 °C	10 s		
Stabilizace		72 °C	10 s	1	
Melting		po 0,2 °C	2 s	60-95 °C	kontinuálně: R*
Chlazení		40 °C	1 min.		

* Nastavení fluorescenčního kanálu:

G = Green (např. FAM, SYBR Green I)

Y = Yellow (např. JOE, VIC, HEX)

R = Red (např. Cy5, Alexa Fluor 633)

2.3.5 Vyhodnocení analýzy

Za průkaz přítomnosti DNA druhu *C. psittaci* ve vzorku je považován prokazatelný nárůst fluorescenčního signálu v Green fluorescenčním spektru viz Obr. 1. a specifická teplota tání PCR produktu (tzv. melting teplota) viz Tab. III a Obr. č. 2.

Tab. III: Specifická melting teplota pro amplifikovaný fragment.

Detekovaný gen	Specifická melting teplota PCR produktu
<i>OmpA</i>	79,2 ± 0,2 °C

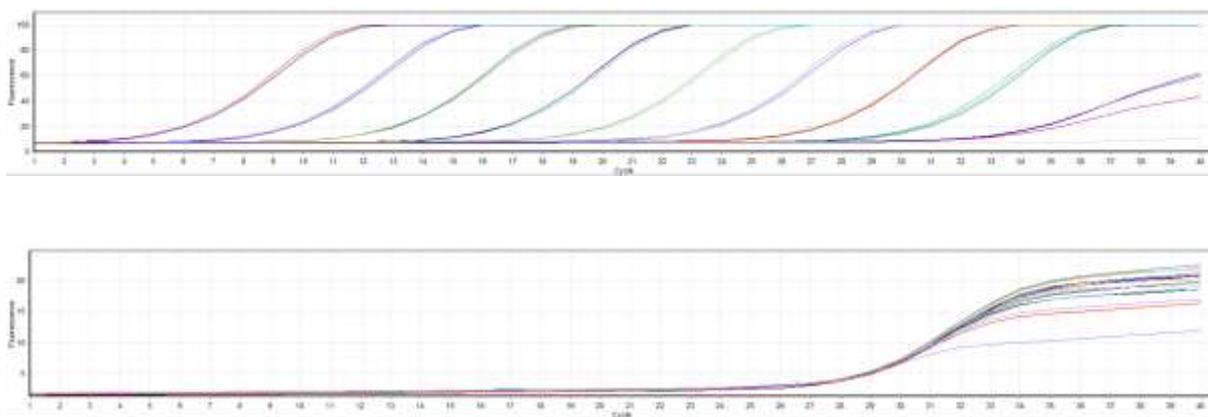
2.4 Validace a limity reakce

Ověření výsledků bylo provedeno na gelové elektroforéze, odečtením délky specifických PCR produktů dle velikostního markeru O'GeneRuler 50 bp DNA Ladder (Fermentas, ThermoFisher Scientific, USA). Pro vyloučení falešně pozitivního výsledku byla provedena kontrola s vybranými mikroorganismy viz Tab IV., kde nebyla potvrzena falešně pozitivní detekce.

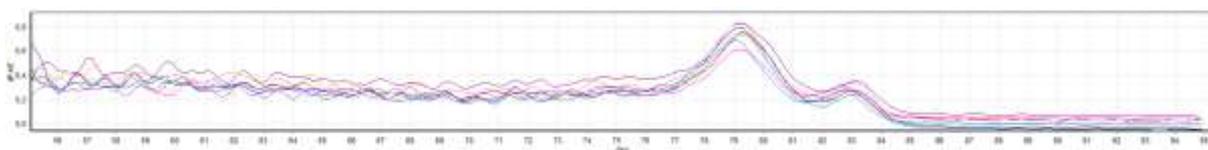
Dále byla specifita a robustnost reakce ověřena na směsných a na simulovaných terénních vzorcích (sušené mléko, pšeničná mouka, prášek do pečiva, moučkový cukr, prach, prací prášek, křída, pyl, motorový olej a nafta). Práškové vzorky byly připraveny v koncentraci 10 mg/ml a před reakcí byly smíchány v poměru 1:1 s kontrolním vzorkem *C. psittaci* v závislosti na použitém objemu reakce. Reakce byla pozitivní u všech simulací s výjimkou směsného vzorku drcené křídly.

Tab. IV: Seznam testovaných patogenů v rámci ověřování specifity metody.

Bakterie	Kmen
<i>Bacillus anthracis</i>	10340T
<i>Bacillus cereus</i>	2010T
<i>Bacillus subtilis</i>	5615T
<i>Bartonella quintana</i>	103739
<i>Brucella melitensis abortus</i>	5660T
<i>Brucella melitensis melitensis</i>	5659T
<i>Brucella melitensis ovis</i>	6741T
<i>Brucella melitensis suis</i>	6073T
<i>Brucella microti</i>	4915
<i>Burkholderia glathei</i>	2741T
<i>Burkholderia mallei</i>	12938T
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	12939T
<i>Clostridium botulinum</i>	5950T
<i>Clostridium botulinum</i>	5944T
<i>Clostridium perfringens</i>	5744T
<i>Clostridium tetani</i>	18/50
<i>Coxiella burnetii</i>	SU032 (1)
<i>Enterobacter cloacae</i>	1903
<i>Escherichia coli</i>	6859T
<i>Francisella novicida</i>	6041
<i>Francisella tularensis</i>	5540T
<i>Chlamydomphila psittaci</i>	27007
<i>Kytococcus sedentarius</i>	314T
<i>Legionella pneumophila</i>	7371T
<i>Mycobacterium bovis</i>	5034
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	7301T
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1960T
<i>Rickettsia rickettsii</i>	SU005
<i>Salmonella enterica subsp. enterica</i>	7933T
<i>Salmonella typhi</i>	7028T
<i>Shigella dysenteriae I.</i>	13/41
<i>Shigella sonnei</i>	4421
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	2737T
<i>Vibrio cholerae</i>	7254T
<i>Xanthomonas campestris</i>	1/79
<i>Yersinia enterocolitica</i>	5671
<i>Yersinia pestis</i>	5923T
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	22/90T



Obr. č. 1: Výsledky ověření skutečné citlivosti metodiky, metoda vykazuje dynamické rozpětí až na úroveň $10 \log - 1 \times 10^{10}$ až 1×10^1 . Pro UPL sondu č. 46 měřenou v kanálu Green je výsledek uveden nahoře, výsledek interní kontroly je uveden dole.



Obr. č. 2: Grafické znázornění PCR produktu specifické teploty tání detekovaného agens $79,2 \text{ }^\circ\text{C}$ a interní kontroly $83,1 \text{ }^\circ\text{C}$. Na ose y je uveden poměr fluorescence pozadí a generovaného signálu, osa x teplota ve stupních Celsia.

Citlivost reakce byla stanovena tzv. LOD (z ang. Limit Of Detection) na úroveň 50 kopií cílové sekvence na reakci. Citlivost reakce byla zjištěna komparací koncentrace vzorku syntetické kontroly genu s izolátem genomové DNA *C. psittaci* o spektrometricky změřené koncentraci. Vzorek izolátu byl ověřen pro koncentrace 1×10^7 až 5×10^1 kopií v reakci. Koeficient korelace u standardní křivky byl větší než 0,99, efektivita reakce dosahovala hodnoty 95 % pro syntetickou kontrolu a 90 % v případě UPL sondy.

Specifita reakce je ověřena kombinací dvou, popř. tří systémů viz výše. Jako pozitivní vzorek je označen ten, který generuje nárůst fluorescenčního signálu jak v kanálu Green, tak v kanálu Yellow a navíc musí být vzorek charakterizován specifickou teplotou tání PCR produktu.

3. INOVAČNÍ ASPEKTY, NOVOST POSTUPŮ

Do doby zavedení této metodiky detekce a identifikace sledovaného biologického agens byla v Laboratoři biologického monitorování a ochrany (dále jen LBMO) Státního ústavu jaderné, chemické a biologické ochrany, v.v.i. (dále jen SÚJCHBO, v.v.i.) využívána jen nested-PCR. Tato metoda je relativně zdlouhavá a navíc hrozí riziko kontaminace vzorků nebo laboratoře při manipulaci s produkty z první reakce. Z principu nested-PCR reakce je vyloučena kvantifikace vzorku. Původní reakce také nebyla optimalizována pro použití v kombinaci s interní kontrolou.

Vzhledem ke skutečnosti, že na pracovišti nebyla dosud zavedena detekce na qPCR technologii, neexistovala zde ani možnost kvantifikace vzorku. Na základě těchto skutečností bylo rozhodnuto o vývoji a zavedení nové metodiky detekce a identifikace agens *C. psittaci* do laboratorní praxe LBMO SÚJCHBO, v.v.i.

Pro detekci byly navrženy, optimalizovány a ověřeny dosud nepublikované sekvence primerů, které byly vybírány se snahou zabránit případným falešně pozitivním a negativním výsledkům. Pro zajištění správnosti výsledků byla pro hodnocení reakce zahrnuta kombinace dvou rozdílných detekčních systémů. První z nich byl založen na využití modifikované TaqMan sondy, kterou lze díky semi-specifické sekvenci využít i pro další metodiky. Sonda obsahuje tzv. uzamčené nukleotidy (Letorra *et al.*, 2003), které umožňují syntézu krátkého oligonukleotidu, který má ovšem stejnou melting teplotu, jako konvenční TaqMan sonda. Druhý systém využíval pro verifikaci výsledků interkalační barvu SYTO 61 patřící do tzv. druhé generace interkalačních barviv, která umožňuje oproti první generaci interkalačních barviv daleko přesnější analýzu teploty tání PCR produktu (Bustin *et al.*, 2004). Využití semi-specifické sondy v kombinaci s ověřením amplikonu teplotou tání PCR produktu je zajištěna kvalitní verifikace výsledků. Navíc je reakce optimalizována pro použití interní kontroly, tím je zajištěna mj. kontrola možné inhibice PCR reakce. Výhodou výše popsaného systému detekce je, že lze jak semi-specifickou sondu, tak i interkalační barvu použít v kombinaci s jiným párem primerů pro detekci jiných agens nebo další PCR analýzy.

Reakční podmínky pro diagnostický proces jsou navrženy tak, aby bylo možné provádět detekci většího počtu biologických agens uvedených na seznamech příloh vyhlášky č. 474/2002 Sb.² současně a tím výrazně zkrátit čas potřebný pro detekci těchto agens.

² Vyhláška, kterou se provádí zákon č. 281/2002 Sb., o některých opatřeních souvisejících se zákazem bakteriologických (biologických) a toxinových zbraní a o změně živnostenského zákona.

V porovnání s komerčními soupravami lze u této metody detekce a identifikace *C. psittaci* provést dodatečnou kontrolu výsledků amplifikace sekvenací amplifikovaných produktů a tím dodatečně ověřit jejich správnost.

4. POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY

Metodika byla vyvinuta jako hlavní analytický postup metodicko-odborné podpory laboratoře LBMO SÚJCHBO, v.v.i při plnění úkolů státního dozoru SÚJB v oblasti zákazu biologických zbraní pro zmíněné agens.

Metodika bude využívána pro potřeby dozoru nad dodržováním zákona č. 281/2002 Sb.³, konkrétně bude sloužit k průkazu přítomnosti genetického materiálu *C. psittaci* ve vzorcích získaných při dozorové činnosti pracovníků SÚJB. Lze předpokládat, že by metodika mohla být rovněž využita k detekci a identifikaci agens *C. psittaci* pro potřeby integrovaného záchranného systému v případech, kdy existuje podezření na přítomnost uvedeného agens v neznámých vzorcích (biologické tkáně, stěry, tzv. bílé prášky neznámého původu apod.).

³ Zákon o některých opatřeních souvisejících se zákazem bakteriologických (biologických) a toxinových zbraní a o změně živnostenského zákona.

5. POUŽITÁ LITERATURA

Bustin S.A., Nolan T. (2004). Pitfalls of Quantitative Real-Time Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction. *J Biomol Tech.*, 2004, 15, 155-166 p.

Bustin S.A., Benes V., Garson J.A., Hellems J., Huggett J., Kubista M., Mueller R., Nolan T., Pfaffl M.W., Shipley G.L., Vandesompele J., Wittwer C.T. (2009). The MIQE Guidelines: Minimum Information for publication of quantitative Real-Time PCR experiments. *Clinical Chemistry* 55:4

Escalante-Ochoa C., Ducatelle R., Haesebrouck F. (1998): The intracellular life of *Chlamydia psittaci*: how do the bacteria interact with the host cell? *FEMS Microbiol Rev.* 1998 Jun;22(2):65-78.

Latorra D., Arar K., Hurley J.M. (2003). Design considerations and effects of LNA in PCR primers. *Mol Cell Probes.* 2003 Oct;17(5):253-9.

Okuda H., Ohya K., Shiota Y., Kato H., Fukushi H. (2010): Detection of *Chlamydia psittaci* by using SYBR green real-time PCR. *J Vet Med Sci.* 2011 Feb;73(2):249-54.

Riedel S. (2004). Biological warfare and bioterrorism: a historical review. *Proc (Bayl Univ Med Cent)* 2004 October; 17(4): 400–406 p.

Voigt A., Schöfl G., Saluz H. P. (2012). The *Chlamydia psittaci* genome: a comparative analysis of intracellular pathogens. *PLoS One.* 2012; 7 (4): e35097.

Zocevic A., Vorimore F., Marhold C., Horvatek D., Wang D., Slavec B., Prentza Z., Stavianis G., Prukner-Radovic E., Dovic A., Siarkou V.I., Laroucau K. (2012): Molecular characterization of atypical *Chlamydia* and evidence of their dissemination in different European and Asian chicken flocks by specific real-time PCR. *Environ Microbiol.* 2012 Aug;14(8):2212-22.