

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Damjana ŠUMAH

**PRIMERJAVA DVEH SEROLOŠKIH METOD ZA DOKAZ
PROTITELES IgM, IgG IN IgA PROTI BAKTERIJI *Chlamydia
pneumoniae***

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

**COMPARISON OF TWO SEROLOGIC METHODS FOR
DETECTION OF IgM, IgG AND IgA ANTIBODIES TO *Chlamydia
pneumoniae***

GRADUATION THESIS

University studies

Ljubljana, 2006

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega medoddelčnega študija mikrobiologije. Opravljeno je bilo v Laboratoriju za diagnostiko znotrajceličnih okužb Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani.

Študijska komisija študija mikrobiologije je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Jožico Marin, za somentorico asist. dr. Darjo Keše, za recenzentko doc. dr. Eva Ružič-Sabljić.

Mentorica: prof. dr. Jožica Marin

Somentorica: asist. dr. Darja Keše

Recenzentka: doc. dr. Eva Ružič-Sabljić

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Darja Žgur-Bertok
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Mentorica: prof. dr. Jožica Marin
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Somentorica: asist. dr. Darja Keše
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Recenzentka: doc. dr. Eva Ružič-Sabljić
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Damjana Šumah

Ključna dokumentacijska informacija

- ŠD Dn
- DK UDK 579.61: 616.2 – 07 (043) = 863
- KG serološki testi/mikroimunofluorescenca/*Chlamydia pneumoniae*/protitelesa IgM/
protitelesa IgG/protitelesa IgA/imunski odziv/MIF/test Focus/test LabSystem
- AV ŠUMAH, Damjana
- SA MARIN, Jožica (mentorica)/KEŠE, Darja (somentorica)/RUŽIČ-SABLJIČ, Eva
(recenzentka)
- KZ SI-1001 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija
mikrobiologije
- LI 2006
- IN PRIMERJAVA DVEH SEROLOŠKIH METOD ZA DOKAZ PROTITELES IgM,
IgG IN IgA PROTI BAKTERIJI *Chlamydia pneumoniae*
- TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
- OP XII, 76 str., 12 pregl., 9 sl., 2 pril., 144 vir.
- IJ sl
- Jl sl/en
- AI *Chlamydia pneumoniae* je pomemben povzročitelj bolezni dihal, ki lahko prizadene zgornji ali spodnji respiratorni trakt. "Zlati standard" v laboratorijski diagnostiki okužb s *C. pneumoniae* je serološki test mikroimunofluorescence (MIF), s katerim dokazujemo vrstno specifična protitelesa IgG, IgA in IgM. Za merilo akutne okužbe s *C. pneumoniae* velja 4-kratni porast titra protiteles IgG ali titer protiteles IgM $\geq 1:16$ v parnih serumih, odvzetih v razmiku 4 do 8 tednov. Protitelesni imunski odziv pri primarni infekciji je zakasnen. Protitelesa IgM in IgA nastanejo 2 do 3 tedne po nastopu bolezni, IgG šele 6 do 8 tednov po nastopu bolezni. Pri reinfekciji protiteles IgM navadno ni, IgG pa nastanejo že po 1 do 2 tednih. V diplomski nalogi smo naredili primerjavo rezultatov dveh testov MIF dveh različnih proizvajalcev in sicer Focus, ZDA in LabSystem, Finska. Pri dokazovanju protiteles IgG smo dobili ujemanje rezultatov obeh testov v 91 %. Skoraj enak odstotek ujemanja rezultatov obeh testov smo dokazali tudi pri protitelesih IgA (90 %), pri protitelesih IgM je bil odstotek ujemanja rezultatov obeh testov nekoliko nižji (84 %). Pri dokazovanju protiteles IgM s testom LabSystem je 15 % serumov navzkrižno reagiralo. Pri obeh testih smo opazili navzkrižno reaktivnost s *C. trachomatis* in *C. psittaci*. Tako pri dokazovanju protiteles IgG kot pri IgM je višji delež navzkrižne reaktivnosti dosegel test LabSystem, pri protitelesih IgA je odstotek navzkrižne reaktivnosti s *C. trachomatis* in *C. psittaci* zanemarljiv. Dokazali smo visoko ujemanje rezultatov obeh testov, Focus in LabSystem. Oba testa MIF sta primerna za dokazovanje protiteles IgG, IgA in IgM proti bakteriji *C. pneumoniae*.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Dn

DC UDK 579.61: 616.2 – 07 (043) = 863

CX serologic tests/microimmunofluorescence/*Chlamydia pneumoniae*/antibody IgM/
antibody IgG/antibody IgA/immune response/MIF/test Focus/test LabSystem

AU ŠUMAH, Damjana

AA MARIN, Jožica (supervisor)/ KEŠE, Darja (co-advisor)/RUŽIČ-SABLJIČ, Eva
(reviewer)

PP SI- 1001 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in
Microbiology

PY 2006

TI COMPARISON OF TWO SEROLOGIC METHODS FOR DETECTION OF IgM,
IgG AND IgA ANTIBODIES TO *Chlamydia pneumoniae*

DT Graduation thesis (University studies)

NO XII, 76 p., 12 tab., 9 fig., 2 ann., 144 ref.

LA sl

AL sl/en

AB *Chlamydia pneumoniae* is recognized as an important pathogen of respiratory disease, causing upper and lower respiratory tract infections. The "gold standard" for the laboratory diagnosis of *C. pneumoniae* is a serologic method, microimmunofluorescence (MIF), which detects species-specific antibodies IgG, IgA and IgM. A fourfold rise of IgG antibodies titers or IgM antibodies titers of $\geq 1:16$ in paired sera, retrieved within 4 to 8 weeks, are indicative of acute *C. pneumoniae* infection. In primary infections the antibody immune response is delayed. IgM and IgA antibodies appear 2 to 3 weeks after the onset of illness, IgG antibodies may not reach high titer until 6 to 8 weeks after onset of illness. At reinfections IgM antibodies are usually absent, on the other hand IgG antibodies appear after only 1 to 2 weeks. In our study a comparison of two MIF assays were performed. Assays were produced by two manufacturers: Focus, USA and LabSystem, Finland. The detection agreement between the two assays was 91 % for IgG antibodies. Almost the same percentage of agreement was observed for IgA antibodies (90 %) but for IgM antibodies the agreement was a little lower (84 %). In IgM detection, 15 % of cross-reactivity was established in samples tested with the LabSystem assay. For both IgG and IgM antibodies detection a higher percentage of cross-reactivity was exhibited by LabSystem assay, for IgA antibodies detection the percentage of cross-reactivity with *C. trachomatis* and *C. psittaci* is negligible. In our study we confirm a high agreement between assays from Focus and LabSystem. Both MIF tests are suitable for detection of IgG, IgA and IgM antibodies to *C. pneumoniae*.

KAZALO VSEBINE

Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key words documentation (KWD)	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VIII
Kazalo slik	X
Kazalo prilog	XI
Seznam okrajšav	XII
<u>1 UVOD</u>	<u>1</u>
<u>2 PREGLED OBJAV</u>	<u>3</u>
<u>2.1 BAKTERIJA <i>Chlamydia pneumoniae</i></u>	<u>3</u>
<u>2.1.1 Taksonomija</u>	<u>3</u>
<u>2.1.2 Oblika in zgradba</u>	<u>5</u>
<u>2.1.2.1 Celična stena bakterije <i>C. pneumoniae</i></u>	<u>6</u>
<u>2.1.2.2 Genom bakterije <i>C. pneumoniae</i></u>	<u>9</u>
<u>2.2 ŽIVLJENJSKI KROG BAKTERIJE <i>Chlamydia pneumoniae</i></u>	<u>10</u>
<u>2.2.1 Perzistenca</u>	<u>12</u>
<u>2.3 BOLEZNI, KI JIH POVZROČA BAKTERIJA <i>Chlamydia pneumoniae</i></u>	<u>14</u>
<u>2.3.1 Okužbe dihal</u>	<u>14</u>
<u>2.3.2 Astma in bakterija <i>Chlamydia pneumoniae</i></u>	<u>14</u>
<u>2.3.3 Ateroskleroza in bakterija <i>Chlamydia pneumoniae</i></u>	<u>15</u>
<u>2.3.4 <i>Chlamydia pneumoniae</i> in druge bolezni</u>	<u>15</u>
<u>2.4 EPIDEMIOLOGIJA</u>	<u>16</u>

2.4.1	Bakterija <i>Chlamydia pneumoniae</i> v Sloveniji	16
2.5	IMUNSKI ODZIV IN BAKTERIJA <i>Chlamydia pneumoniae</i>	17
2.5.1	Prirojen imunski odziv	18
2.5.2	Pridobljen imunski odziv	19
2.5.2.1	Celično posredovan imunski odziv (Th1 odziv)	22
2.5.2.2	Humoralni imunski odziv (Th2 odziv)	24
2.6	LABORATORIJSKO DOKAZOVANJE OKUŽB Z BAKTERIJO <i>Chlamydia pneumoniae</i>	26
2.6.1	Kužnina in transport kužnine	26
2.6.2	Diagnostični postopki	27
2.6.2.1	Kultiviranje kužnine, osamitev in identifikacija	27
2.6.2.2	Serološke metode	27
2.6.2.3	Imunohistokemija (IHC)	29
2.6.2.3	Verižna reakcija s polimerazo (PCR)	29
2.7	ZDRAVLJENJE OKUŽB Z BAKTERIJO <i>Chlamydia pneumoniae</i>	29
2.8	NAMEN NALOGE	30
3	MATERIALI IN METODE	31
3.1	PRINCIP TESTA MIKROIMUNOFLUORESCENCE (MIF)	31
3.2	TEST MIKROIMUNOFLUORESCENCE, proizvajalca Labssystem (Finska)	31
3.2.1	Komplet reagentov	31
3.2.2	Pribor za izvedbo testa	32

3.2.3 Priprava serumskih razredčin				33
3.2.4 Postopek testiranja				33
3.2.4.1	Dokaz	protiteles		IgG 33
3.2.4.2	Dokaz	protiteles		IgM 34
3.2.4.3	Dokaz	protiteles		IgA 34
3.3	TEST MIKROIMUNOFLUORESCENCE,	proizvajalca Focus	(ZDA)	
34				
3.3.1 Komplet reagentov				34
3.3.2 Pribor za izvedbo testa				35
3.3.3 Priprava serumskih razredčin				36
3.3.4 Postopek testiranja				36
3.3.4.1	Dokaz	protiteles		IgG 36
3.3.4.2	Dokaz	protiteles		IgM 37
3.3.4.3	Dokaz	protiteles		IgA 37
3.4 VREDNOTENJE REZULTATOV				39
3.4.1 Dokaz protiteles IgG				39
3.4.2 Dokaz protiteles IgM				39
3.4.3 Dokaz protiteles IgA				39
3.4.4 Navzkrižna reaktivnost				39
4 REZULTATI				40
4.1	PROTITELESA IgG	PROTI BAKTERIJI	<i>Chlamydia pneumoniae</i>	41
4.2	PROTITELESA IgA	PROTI BAKTERIJI	<i>Chlamydia pneumoniae</i>	43

4.3 PROTITELESA IgM PROTI BAKTERIJI *Chlamydia pneumoniae*
45

4.4 ANALIZA NAVZKRIŽNE REAKTIVNOSTI MED BAKTERIJO *C. pneumoniae*, *C. trachomatis* IN *C. psittaci*
48

4.4.1 Titer protiteles IgG proti bakteriji *C. trachomatis* in *C. psittaci* 48

4.4.2 Titer protiteles IgA proti bakteriji *C. trachomatis* in *C. psittaci* 49

4.4.3 Titer protiteles IgM proti bakteriji *C. trachomatis* in *C. psittaci* 49

5 DISKUSIJA IN SKLEPI 51

6 POVZETEK 57

7 VIRI 59

ZAHVALA

PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Biološke lastnosti in značilnosti bakterij iz vrst <i>Chlamydia</i> spp (Keše, 2002)	4
Preglednica 2: Število in delež pozitivnih in negativnih serumov MIF	40
Preglednica 3: Rezultati dokazovanja protiteles IgG proti bakteriji <i>C. pneumoniae</i>	42
Preglednica 4: Ujemanje rezultatov dveh testov MIF za dokazovanje protiteles IgG proti bakteriji <i>C. pneumoniae</i>	43
Preglednica 5: Rezultati dokazovanja protiteles IgA proti bakteriji <i>C. pneumoniae</i>	44
Preglednica 6: Ujemanje rezultatov dveh testov MIF za dokazovanje protiteles IgA proti bakteriji <i>C. pneumoniae</i>	45
Preglednica 7: Rezultati dokazovanja protiteles IgM proti bakteriji <i>C. pneumoniae</i>	46
Preglednica 8: Ujemanje rezultatov dveh testov MIF za dokazovanje protiteles IgM proti bakteriji <i>C. pneumoniae</i>	46
Preglednica 9: Število serumov in delež ujemanja testov Focus in Labssystem glede na posamezne titre protiteles in če dopustimo odstopanje v 1 razredčini	47
Preglednica 10: Število in delež pozitivnih serumov s titri protiteles IgG ≥ 16 proti bakteriji <i>C. trachomatis</i> in <i>C. psittaci</i>	48
Preglednica 11: Število in delež pozitivnih serumov s titri protiteles IgA ≥ 32 proti bakteriji <i>C. trachomatis</i> in <i>C. psittaci</i>	49

Preglednica 12: Število in delež pozitivnih serumov s titri protiteles $\text{IgM} \geq 8$ proti bakteriji <i>C. trachomatis</i> in <i>C. psittaci</i>	50
--	----

KAZALO SLIK

Slika 1: Primerjava stare in nove klasifikacije klamidij (Everett in sod., 1999)	5
Slika 2: Elektronsko-mikroskopski posnetek <i>C. pneumoniae</i> (Grayston in sod., 1989)	6
Slika 3: Model zgradbe celične stene bakterije <i>C. pneumoniae</i> (Hatch, 1999; Christiansen in sod., 1999)	8
Slika 4: Razvojni krog bakterije <i>C. pneumoniae</i>	12
Slika 5: Povzetek imunskega odziva (Madigan in sod., 2000)	20
Slika 6: Vrste T celic (Madigan in sod., 2000)	21
Slika 7: Shema stekelca s klamidijskimi antigeni	38
Slika 8: Izgled enega polja na objektnem stekelcu	38
Slika 9: Test mikroimunofluorescence za dokaz specifičnih protiteles proti <i>C. pneumoniae</i>	39

PRILOGE

Priloga A: Rezultati testa MIF, proizvajalca Focus, ZDA 78

Priloga B: Rezultati testa MIF, proizvajalca Labsystem, Finska 81

SEZNAM OKRAJŠAV

ATP	
CD4+	RNK
CD8+	RT
<i>C. pneumoniae</i>	TNF- α
<i>C. psittaci</i>	adenozintrifosfat
<i>C. trachomatis</i>	celice T pomagalk
DNK	citotoksični limfociti T
ET	<i>Chlamydia pneumoniae</i>
FITC	<i>Chlamydia psittaci</i>
GTP	<i>Chlamydia trachomatis</i>
IFN- γ	deoksiribonukleinska kislina
IgG	elementarno telesce
IgM	fluorescein izotiocianat
IgA	gvanozintrifosfat
IHC	interferon γ
IL	protitelesa razreda G
LPS	protitelesa razreda M
MIF	protitelesa razreda A
MOMP	imunohistokemija (angl. immunohistochemistry)
	interlevkin
Omp	lipopolisaharid
	mikroimunofluorescenca
PBS	glavna beljakovina zunanje membrane (angl. major outer
PCR	membrane protein)
	beljakovina zunanje membrane (angl. outer membrane
POMP	protein)

fosfatni pufer (angl.

phosphate buffer

saline)

verižna reakcija s

polimerazo (angl.

polymerase chain

reaction)

polimorfne

beljakovine zunanje

membrane (angl.

polymorphic outer

membrane proteins)

ribonukleinska

kislina

retikularno telesce

tumor nekrotizirajoč

faktor α

1 UVOD

Klamidije so med najbolj razširjenimi bakterijami na svetu in povzročajo širok spekter bolezni tako pri ljudeh kot pri živalih (Wyrick, 2000).

Chlamydia pneumoniae (*C. pneumoniae*) je po Gramu negativna, obvezna znotrajcelična bakterija, ki so jo leta 1989 kot tretjo vrsto uvrstili v rod *Chlamydia* (Grayston in sod., 1989), leta 1999 (Everett in sod.) pa so jo glede na nove taksonomske analize uvrstili v rod *Chlamydophila*.

Klamidije imajo edinstven življenjski krog, kjer se izmenjujeta dve različni obliki bakterije. Elementarno telesce je infektivna oblika, ki je metabolno neaktivna, retikularno telesce pa je metabolno aktivna oblika, katerega vloga je razmnoževanje (Kuo in sod., 1995).

Poleg edinstvenega življenjskega kroga, poznamo pri klamidijah še eno posebnost, ki ni značilna za po Gramu negativne bakterije. V svoji celični steni ne vsebujejo peptidoglikana, čeprav ima *C. pneumoniae* gene, ki izražajo proteine za skoraj popolno sintezo peptidoglikana, vključno s penicilin vezavnimi proteini (Kalman in sod., 1999; Rockey in sod., 2000).

C. pneumoniae je pomemben povzročitelj respiratornih obolenj, kot so pljučnica, faringitis in sinusitis (Kuo in sod., 1995), poleg tega pa okužbe z bakterijo *C. pneumoniae* povezujejo tudi s kardiovaskularnimi obolenji (Kuo in sod., 1993), Alzheimerjevo boleznijo (Balin in sod., 1998), astmo (Hahn in sod., 1991) in kronično obstruktivno boleznijo pljuč (Blasi in sod., 1993).

Za zdravljenje okužb so najučinkovitejši antibiotiki tetraciklini in makrolidi. Zaradi nevarnosti perzistentnih okužb je potrebno dolgotrajno zdravljenje (Kuo in sod., 1995).

Za diagnostiko okužb s *C. pneumoniae* je najboljša metoda verižna reakcija s polimerazo. Kuo in sod. (1995) pa so kot "zlati standard" v diagnostiki klamidij ocenili test mikroimunofluorescence, ki je najbolj specifičen in najobčutljivejši za dokaz vrstno-specifičnih protiteles.

V eksperimentalnem delu diplomske naloge smo naredili primerjavo dveh seroloških testov mikroimunofluorescence dveh različnih proizvajalcev in sicer Focus (ZDA) in Labssystem (Finska), s katerima smo dokazali prisotnost vrstno-specifičnih protiteles. Primerjali smo rezultate testov, ki smo jih dobili z določanjem posameznih titrov protiteles IgG, IgM in IgA proti bakteriji *Chlamydia pneumoniae*.

Pred izvedbo dela smo postavili delovno hipotezo:

- oba testa sta primerna za dokazovanje protiteles IgM, IgG in IgA proti *C. pneumoniae*
- možen je pojav navzkrižne reaktivnosti pri obeh testih.

2 PREGLED OBJAV

2.1 BAKTERIJA *Chlamydia pneumoniae*

2.1.1 Taksonomija

O klamidijah sta prva pisala Halberstadter in von Prowazek, ki sta jih leta 1907 najprej uvrstila med protozoje (Halberstadter in von Prowazek, 1907a; Halberstadter in von Prowazek, 1907b).

Po nekaj letih raziskovanj so menili, da klamidije spadajo med viruse zaradi njihove obvezne znotrajcelične narave. Z izolacijo in kultivacijo *C. psittaci* leta 1930 so ugotovili, da so to bakterije. V nasprotju z virusi imajo klamidije obe vrsti nukleinskih kislin (DNK in RNK), celično steno, ki je podobna celičnim stenam po Gramu negativnim bakterijam, občutljive so na penicilin in razmnožujejo se s celično delitvijo na dvoje (Stanier in Van Niel, 1962).

Zaradi skupnih lastnosti z bakterijami *Rickettsia* (oboje rastejo in se razmnožujejo le v živih gostiteljevih celicah) so klamidije uvrstili v red *Rickettsiales*. Na podlagi odkritij, da imajo klamidije poseben razvojni krog in da klamidije ne morejo sintetizirati visoko energijskih molekul adenzintrifosfata (ATP) in gvanozintrifosfata (GTP) ter, da nimajo citokromov in ostalih komponent dihalne verige (Ward, 1983), so jih ločili od rikacij.

Page in Storz sta predlagala, da se ustvari nov red *Chlamydiales*, le-ta naj vsebuje eno družino *Chlamydiaceae* in en rod *Chlamydia*, ki vsebuje dve vrsti in sicer *C. trachomatis* in *C. psittaci* (Page, 1966; Page, 1968; Storz in Page, 1971).

Bakterija *Chlamydia pneumoniae* je bila prvič izolirana leta 1965 iz celic očesne veznice pri otroku s Tajske, ki je bil vključen v raziskavo o trahomu. Izolat so poimenovali *C. psittaci* TW-183 (Kuo in sod., 1986).

Vloga te bakterije, kot človeškega patogena, ni bila definirana vse do leta 1983, ko so jo izolirali iz brisa žrela pri študentu, ki je imel akutni faringitis. Izolirano bakterijo so imenovali *C. psittaci* AR-39 (Grayston in sod., 1986). Iz obeh sevov so dobili ime za nov sev in ga poimenovali *C. psittaci* TWAR.

Naslednje študije so temeljile na imunoloških raziskavah, elektronski mikroskopiji in analizi DNK. Pokazale so, da se organizem razlikuje od obeh poznanih vrstah klamidij, zato so jo označili kot novo, tretjo vrsto v rodu *Chlamydia* in jo imenovali *Chlamydia pneumoniae* (Grayston in sod., 1989).

Od pomembnejših vrst klamidij so *C. pecorum* odkrili najkasneje in sicer leta 1992 (Fukushi in Hirai, 1992). Patogena je za živali, predvsem za drobnico in govedo; okužbe pri ljudeh niso znane (Fukushi in Hirai, 1993). Biološke lastnosti in značilnosti bakterij iz vrst *Chlamydia* prikazuje preglednica 1.

Preglednica 1: Biološke lastnosti in značilnosti bakterij iz vrst *Chlamydia* spp. (Keše, 2002, str. 322)

ZNAČILNOSTI	<i>C. trachomatis</i>	<i>C. pneumoniae</i>	<i>C. psittaci</i>	<i>C. pecorum</i>
-------------	-----------------------	----------------------	--------------------	-------------------

naravni gostitelj	človek	človek	ptice in številni sesalci	govedo, ovce
število serotipov	15	1	1	3
morfologija ET	okrogla	hruškasta	okrogla	okrogla
morfologija inkluzije	ovalna, vakuolarna	ovalna, gosta	velika, gosta, variabilna	ovalna, gosta
glikogen v inkluzijah	da	ne	ne	ne
občutljivost za sulfonamide	da	ne	ne	?

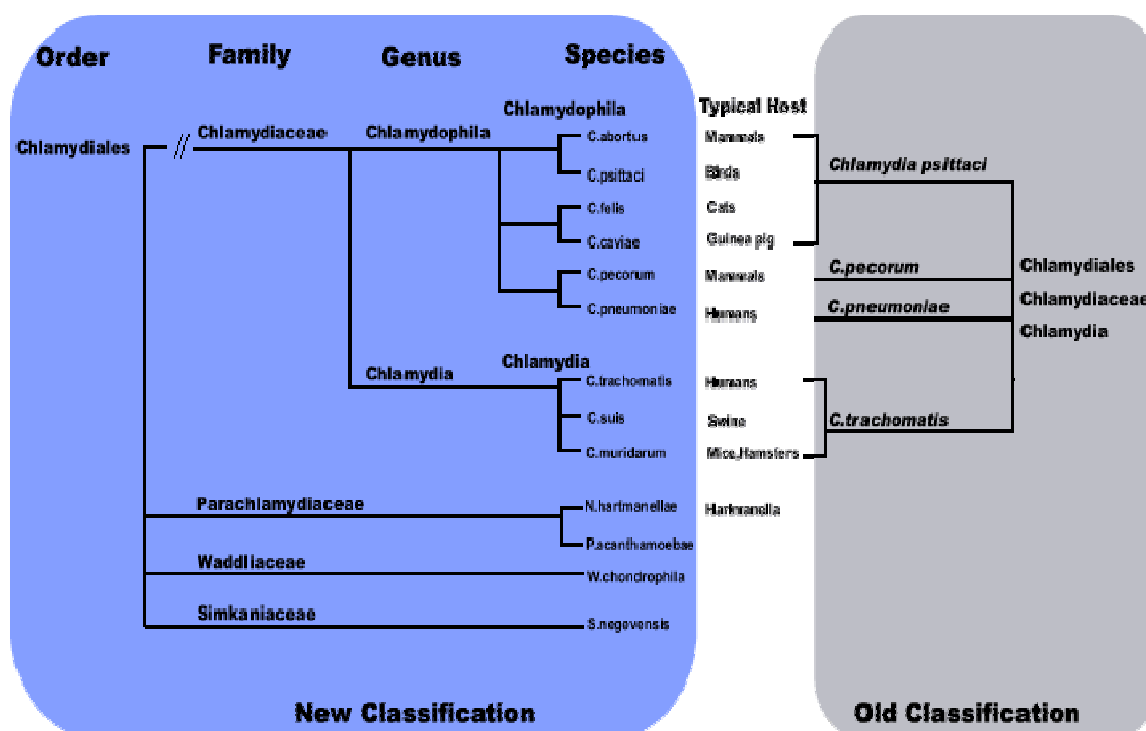
(ET = elementarno telesce)

Najprej je red *Chlamydiales* vseboval en rod *Chlamydia* s štirimi poznanimi vrstami: *C. trachomatis*, *C. psittaci*, *C. pneumoniae* in *C. pecorum*. Nedavne taksonomske analize 16S in 23S rRNA pa so osnova za novo taksonomijo klamidij. In sicer red *Chlamydiales* ima po novem štiri ločene skupine na nivoju družine, v družini *Chlamydiaceae* pa dva rodova, *Chlamydia* in *Chlamydophila*.

Rod *Chlamydophila* vsebuje *C. pecorum*, *C. pneumoniae*, *C. psittaci* in tri nove vrste *C. abortus*, *C. caviae* ter *C. felis*.

Rod *Chlamydia* pa vsebuje *C. trachomatis*, *C. muridarum* in *C. suis* (Everett in sod., 1999).

Novo klasifikacijo klamidij niso sprejeli vsi znanstveniki in razprava se še nadaljuje (Schachter in sod., 2001). Primerjavo stare in nove klasifikacije klamidij prikazuje slika 1.

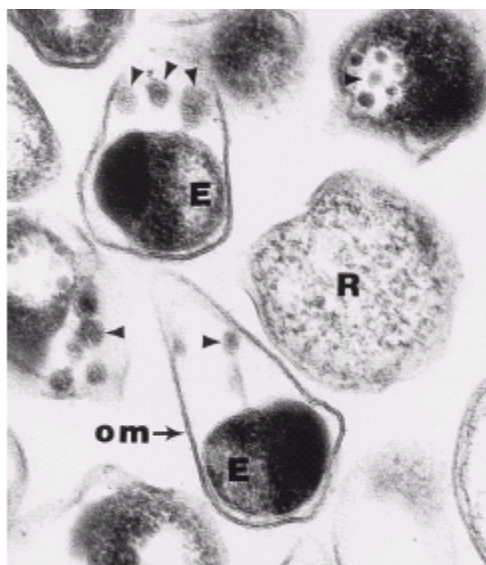


Slika 1: Primerjava stare in nove klasifikacije klamidij (Everett in sod., 1999)

2.1.2 Oblika in zgradba

Bakterija *Chlamydia pneumoniae* je po Gramu negativna, negibljiva bakterija, velika komaj 300 nm. Je obvezen znotrajcelični parazit, ki od svojega gostitelja dobi ATP, nukleotide in aminokislino (Peeling in Brunham, 1996).

Klamidije imajo edinstveni razvojni krog, kjer se pojavljata dve funkcionalno in morfološko popolnoma različni obliki. Zunajcelična oblika, imenovana elementarno telesce (ET), veliko od 0,3 do 0,4 μm , je infektivna oblika in je metabolno inaktivna. Odgovorna je za vezavo na tarčno gostiteljevo celico. Retikularno telesce (RT) je znotrajcelična oblika organizma in je večje od ET. Veliko je od 0,8 do 1 μm . Je metabolno aktivna, ni pa infektivna oblika (Moulder, 1991). Elementarno in retikularno telesce bakterije *C. pneumoniae* prikazuje slika 2.



Slika 2: Elektronsko-mikroskopski posnetek *C. pneumoniae*. E - elementarno telesce, R - retikularno telesce, om - zunanja membrana (Grayston in sod., 1989).

Tako retikularno kot elementarno telesce imata nukleoid, citoplazemsko membrano in celično steno, vendar se molekularna sestava in velikost obeh struktur razlikuje.

2.1.2.1 Celična stena bakterije *C. pneumoniae*

Celična stena klamidij je podobna celični steni po Gramu negativnih bakterij. Sestavljena je iz fosfolipidov, lipidov, lipopolisaharidov, glikolipidov in beljakovin (Turković in Brudnjak, 1989). Celice klamidij v vseh fazah razvoja obkroža dvojna membrana.

Vendar pa se znanstvenikom pojavljajo vprašanja glede t.i. "chlamydial peptidoglycan paradox". Prisotnost peptidoglikana pri klamidijah ni dokazana, pa vendar je dokazan inhibitorni učinek penicilina na celično rast klamidij (Moulder, 1993).

Nedavne genomske analize so odkrile, da tako *C. trachomatis* kot *C. pneumoniae* imata gene, ki izražajo proteine za skoraj popolno sintezo peptidoglikana, vključno s penicilin vezavnimi proteini (Kalman in sod., 1999; Rockey in sod., 2000).

Brown in Rockey (2000) predpostavljata, da *C. pneumoniae* rabi peptidoglikan med celično delitvijo retikularnega telesca.

Vsekakor pa v celični steni klamidij najdemo strukturo, ki spominja na peptidoglikan. Ta struktura je iz mreže heksagonalnih podenot, ki v premeru merijo 18 nm (Ward, 1983). V tej mreži so z disulfidnimi vezmi povezani proteini zunanje membrane MOMP (MOMP- angl. Major outer membrane protein) in proteini periplazemskega prostora. To mrežo najdemo le pri ET, medtem, ko je pri RT ne zasledimo (Hatch, 1999).

Glavni proteini v zunanji membrani celične stene *C. pneumoniae* so polimorfne beljakovine zunanje membrane POMP (imenovane tudi Pmp) (POMP – angl. Polymorphic outer membrane protein), glavna beljakovina zunanje membrane MOMP in beljakovina zunanje membrane 2 Omp2 (Omp2- angl. Outer membrane protein 2) (Vandahl in sod., 2002). Model zgradbe celične stene *C. pneumoniae* prikazuje slika 3.

C. pneumoniae ima družino *pmp* genov, ki vsebuje 21 članov (Grimwood in Stephens, 1999). Njihova velikost se giblje okoli 100 kDa, locirani so na zunanji membrani bakterije (Kalman in sod., 1999). Pmp proteini imajo dve domeni in so podobni avtotransportnim proteinom (Henderson in Lam, 2001; Birkelund in sod., 2002). C-terminalni del proteina naj bi naredil poro, skozi katero bi potoval N-terminalni del (Henderson in Lam, 2001; Veiga in sod., 2002). Vloga teh proteinov še ni popolnoma jasna. Predvideva se, da imajo vlogo pri adheziji, pri molekularnem transportu, pri signalizaciji in pri drugih funkcijah, povezanih s celično steno (Rockey in sod., 2000).

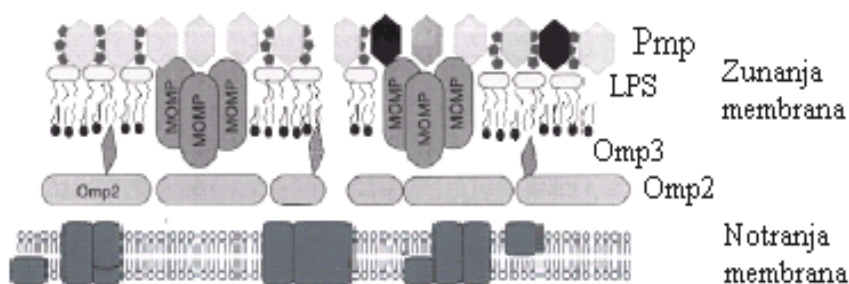
Glede na lipopolisaharid (LPS), beljakovine zunanje membrane Omp (Omp- angl. Outer membrane protein) prispevajo največji delež in sicer je v največji količini prisoten MOMP, ki predstavlja približno 60 % Omp (Caldwell in sod., 1981). Nahaja se na površini zunanje membrane pri vseh klamidijah (Wolf in sod., 2001) in je porin (Wyllie in sod., 1998). Gen, ki kodira MOMP pri *C. pneumoniae* imenujemo *ompA* in je analogen genu *ompI* pri *C. trachomatis* in *C. psittaci* (Melgosa in sod., 1991). Gen *ompA* je pri različnih izolatih *C. pneumoniae* zelo ohranjen in je identičen v 100 % (Wagels in sod., 1994).

MOMP najdemo pri obeh oblikah klamidij, vendar pa se struktura beljakovine pri obeh razlikuje. V ET so MOMP z disulfidnimi vezmi močno povezane med seboj, medtem ko v

RT teh vezi ne zasledimo, kar omogoča prisotnost por in vnos hranil ter ATP v bakterijo. MOMP naj bi delovala kot porin le, ko je bakterija znotraj gostiteljeve celice, kar hkrati pomeni, da so ET izolirana od majhnih molekul v okolju, kar jih ščiti pred potencialnimi obrambnimi mehanizmi gostitelja (Hatch, 1999).

MOMP vsebuje štiri variabilna področja (V1-V4) (Melgosa in sod., 1991).

Sprva so mislili, da MOMP pri *C. pneumoniae* ni imunodominantna beljakovina (Freidank in sod., 1993; Iijima in sod., 1994), vendar pa so Wolf in sod. (2001) dokazali, da je MOMP pri *C. pneumoniae* imunogen in, da je primarni odziv protiteles usmerjen prav proti konformacijskim epitopom MOMP.



Slika 3: Model zgradbe celične stene bakterije *C. pneumoniae* (Hatch, 1999; Christiansen in sod., 1999). Pmp = polimorfne beljakovine zunanje membrane, LPS = lipopolisaharid, Omp2 in Omp3 = proteina bogata s cisteinom

Pomembna proteina v zunanji membrani sta tudi Omp2, imenovan tudi OmcB (OmcB- angl. Outer membrane complex B) in Omp3 (Omp3- angl. Outer membrane protein 3), imenovan tudi OmcA (OmcA- angl. Outer membrane complex A). Proteina, bogata s cisteinom, sta velika 60 in 9 kDa. Omp2 se nahaja na površju celice, kamor se lahko pritrjujejo heparinu podobne molekule (Stephens in sod., 2001). Omp3 je lipoprotein, katerega glavna vloga je sodelovanje pri diferenciaciji znotrajcelične oblike RT v zunajcelično obliko ET ter pri ohranjanju strukturne integritete zunanje ovojnice ET. Najdemo ga v notranjem lipidnem sloju zunanje membrane (Hatch, 1999).

V zunanji membrani celične stene klamidij je poleg MOMP prisoten še en porin in sicer protein PorB (PorB - Porin B) (Stephens in sod., 1998). Protein sestavlja 16 transmembranskih anti-paralelnih " β -sheets" z imunoreaktivnimi antigenskiimi determinantami, ki se razprostirajo v ekstracelularni matriks (Kawa in Stephens, 2002).

Protein deluje kot porin, vendar drugače kot MOMP. PorB je prisoten v zelo majhni količini in vloga PorB je pomembna pri transportu dikarboksilne kisline kot je 2-oksoglutarat, ki jo klamidije rabijo, saj imajo nepopoln cikel trikarboksilnih kislin (Kubo in Stephens, 2001).

Pomembna lastnost tega proteina je, da ima med različnimi vrstami klamidij visoko ohranjena zaporedja, kar nakazuje na možnost izdelave cepiva (Kubo in Stephens, 2000).

Klamidije v svoji celični steni vsebujejo lipopolisaharid, ki je prisoten pri obeh oblikah organizma, v RT in ET (Birkelund in sod., 1989). LPS je pri klamidijah glavna površinska antigenska determinanta, proti kateri so usmerjena protitelesa. Sestavljen je iz lipidne molekule, imenovane lipid A, na katero je vezan središčni polisaharid. Središčni polisaharid je iz treh molekul 3-deoksi-d-mano-2-oktulonske kisline (KDO), ki se povezujejo z (2-8) in (2-4) vezmi. Vez (2-8) je specifična za klamidije in je pri ostalih, po Gramu negativnih bakterijah ne zasledimo (Brade in sod., 1999).

LPS klamidij kaže veliko nižjo endotoksičnost kot LPS enterobakterij (Brade in sod., 1987).

V zunanjem membranskem kompleksu tako pri RT kot pri ET, najdemo proteine vročinskega šoka (Brunham in Peeling, 1994). Prisotni so Hsp10, Hsp60 in Hsp70 (Hsp – angl. Heat shock protein). Vsi trije se izražajo skozi celoten razvojni cikel.

2.1.2.2 Genom bakterije *C. pneumoniae*

Klamidije imajo v primerjavi z ostalimi bakterijami zelo majhen genom, le nekaj večji od genoma bakterij iz rodu *Mycoplasma* (ima najmanjši genom od vseh bakterij). Genom bakterije *C. pneumoniae* je velik 1 230 230 baznih parov.

Do danes so ugotovili nukleotidno zaporedje in objavili genome treh različnih izolatov bakterije *C. pneumoniae* in sicer so to izolati CWL029 (Kalman in sod., 1999), AR39 (Read in sod., 2000) in J138 (Shirai in sod., 2000).

Shirai (2000) je naredil primerjavo zaporedij japonskega seva JI38 in seva iz ZDA CWL029. Dokazal je identičnost nukleotidnih zaporedij za proteine zunanje membrane v 89,6 do 100 %. Celotna genomska organizacija in lokacija genov je bila pri obeh sevih identična. Iz tega lahko predvidevamo, da je za specifične razlike med sevi dovolj že nekaj edinstvenih sekvenc, ki kodirajo omp.

2.2 ŽIVLJENJSKI KROG BAKTERIJE *Chlamydia pneumoniae*

Bakterija *C. pneumoniae* ima edinstven življenjski cikel. Dolžina življenjskega kroga je od 48 do 72 ur in je odvisna od gostiteljske celice in razmer v okolju (Beatty in sod., 1994).

Interakcija med gostiteljevo celico in klamidijo poteka v več stopnjah: pritrjanje, vstopanje v celico, razvojni krog klamidij znotraj celice, energetski parazitizem, razpad celice, sprostitvev novih infektivnih delcev v okolico in perzistenca klamidijske infekcije v celici (Keše, 2002).

Tekom razvojnega kroga bakterije *C. pneumoniae* pride do izražanja večih genov, ki jih lahko delimo v tri skupine. Zgodnji prepisi, kjer pride do izražanja genov, ki kodirajo proteine, vpletene v sintezo DNK in RNK ter sintezo nekaterih proteinov. Srednji prepisi, kjer pride do izražanja genov, ki kodirajo encime za metabolizem in pozni prepisi, ko se izražajo geni, ki kodirajo proteine, vpletene v ločevanje kromosomov in citokinezo (Shaw in sod., 2000).

Dokazano je, da se kot zgodnji geni izražajo omp2, adt1 in ompA, kot srednji geni se izražajo polA, Cpn0095, Cpn0148 in Cpn0703 ter kot pozni geni se izražajo hctA, ftsK, omc2, pyk in parB. Skozi celoten cikel pa se izražata gena za 16S rRNK in hsp60 (Mahony in sod., 2002; Mahony, 2002; Haranaga in sod., 2002).

Pritrditev *C. pneumoniae* na membrano gostiteljeve celice sproži prisotnost mikrovilov, ki so na njej (Coombes in Mahoney, 2002). Nekatere raziskave dokazujejo, da klamidije uporabljajo molekularno mimikrijo heparan sulfata, da se infektivno ET pritrdi na receptor

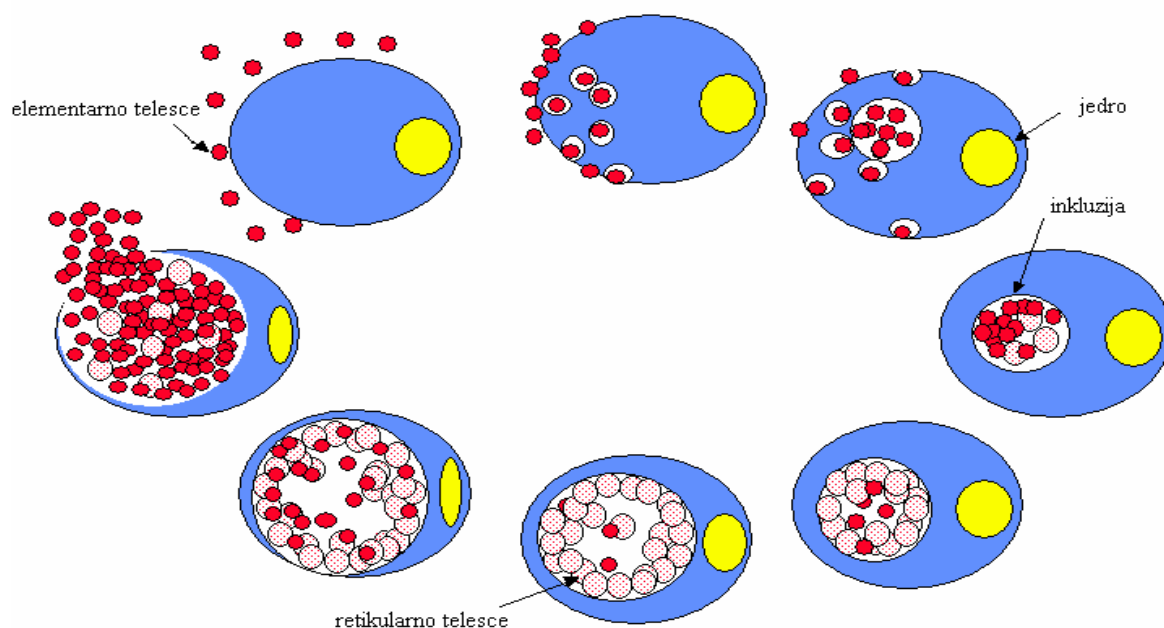
za glikozaminoglikan (GAG) na evkariontski celici (Stephens, 1994; Wuppermann in sod., 2001).

Infektivna ET vstopijo v gostiteljevo celico z endocitozo (Ward in Murray, 1984) in ostanejo v intracelularni vakuoli, imenovani inkluzija, skozi celoten razvojni krog. Fagosom prepreči zlitje z lizosomom in tako se klamidije izognejo razgradnji (Keše, 2002). Takoj po vstopu, ET v inkluziji obdržijo svojo velikost in zgoščen nukleoid. Po osmih urah infekcije pride do disociacije nukleoida in velikost telesc se poveča, kar kaže na diferenciacijo ET v RT. V tem času so lahko prisotna tudi še ET.

Dvanajst ur po infekciji se vsa ET diferencirajo v RT in čez sedem ur se prične razmnoževanje. Približno 24 do 36 ur po infekciji se RT še vedno razmnožujejo z delitvijo na dvoje in se kopičijo znotraj inkluzije.

Kondenzacija kromatina in oblikovanje nukleoida se začne 48 ur po infekciji. Nekaj RT že diferencira v ET in približno 60 do 72 ur po infekciji prevladujejo ET, ki se po 84 urah sprostijo iz gostiteljeve celice s tem, da gostiteljeva celica lizira (Wolf in sod., 2000). Proteolitični encimi so inducirani in producirani s strani klamidij (Valkonen in Saikku, 1996).

Razvojni krog bakterije *C. pneumoniae* prikazuje slika 4.



Slika 4: Razvojni krog bakterije *C. pneumoniae*

2.2.1 Perzistenca

Pojem "perzistenca" opisuje dolgoročno povezavo med klamidijo in njenim gostiteljem. Pojem "perzistentna okužba" pa pomeni odsotnost klamidijske rasti in razmnoževanja. Klamidija se v gostitelju nahaja, vendar je s kultiviranjem v tkivni kulturi ne moremo zaznati (Beatty in sod., 1994).

Odsotnost klamidijske rasti naj bi bila povezana z zmanjšanjem metabolne aktivnosti bakterije, kar vpliva na rast, delitev in spremembo RT v ET. Do spremembe RT v ET pride kasneje, kot je običajno pri normalnem razvojnem krogu klamidije. Prav zaradi tega klamidij z metodo tkivne kulture ne zaznamo. Zmanjšana metabolna aktivnost pa naj bi vplivala tudi na biokemijske in antigenske lastnosti klamidije, posledično klamidij ne zaznamo niti z drugimi diagnostičnimi testi (Beatty in sod., 1994).

Perzistenco lahko povzroči več dejavnikov. Eden od njih je izpostavitve antibiotikom. V splošnem lahko antibiotik, katerega tarča je bakterijski protein ali sinteza RNK, inhibira diferenciacijo ET v RT ali obratno, RT v ET, odvisno v kateri fazi razvoja izpostavimo klamidije antibiotiku in kateremu antibiotiku jih izpostavimo (Moulder, 1991).

Wolf in sod. (2000) so bakterijo *C. pneumoniae* izpostavili antibiotiku ampicilinu, kar je vodilo do nastanka nenormalnih, ogromnih RT. Do celične delitve je prišlo le pri redkih RT. V inkluzijah so se okoli ogromnih RT pojavili vezikli, neznanega izvora in sestave.

Naslednji dejavnik, ki vodi do pojava perzistence je pomanjkanje hranil. Izčrpanje esencialnih hranil iz gojišča začasno ustavi rast tako klamidijskih kot gostiteljevih celic, dokler ne dodamo novih hranil (Moulder, 1991).

Zelo pomembni dejavniki kot povročitelji pojava perzistence so tudi citokini, še posebej interferon γ (IFN- γ). IFN- γ je citokin, ki ga izločajo celice T-pomagalk. Pri

izpostavljenosti *C. pneumoniae* IFN- γ , pride do nastanka majhnih inkluzij, ki vsebujejo le nekaj klamidij, večinoma redko naseljena in povečana RT (Pantoja in sod., 2001).

V nasprotju z vsemi zgoraj opisanimi pojavi perzistence, kontinuirane kulture spontano postanejo perzistentne, ko se celice klamidij in gostiteljske celice svobodno razmnožujejo brez prisotnosti stresa. Kutlin in sod. (2001) so v svoji raziskavi gojili bakterije *C. pneumoniae* v kontinuirani kulturi in dokazali nastanek treh tipov inkluzijskih teles. Prvi tip inkluzij so bile tipične klamidijske inkluzije, ki so vsebovala klamidijska telesca in ekstracelularni material. Drugi tip inkluzij so spremenjene inkluzije, ki v zelo majhnem številu vsebujejo normalna RT in ET, prav tako pa tudi nenormalna pleomorfna telesca, ki so opazno večja od RT. Tretji tip inkluzij, ki so jih odkrili, so majhne nenavadne inkluzije, ki vsebujejo telesca podobna RT. Elementarnih telesc ni prisotnih.

Perzistentna infekcija z bakterijo *C. pneumoniae* je povezana s kontinuiranim izražanjem genov, ki sodelujejo pri replikaciji DNK, ne pa s tistimi geni, ki so povezani s celično delitvijo (Mathews in sod., 2001; Byrne in sod., 2001).

2.3 BOLEZNI, KI JIH POVZROČA BAKTERIJA *Chlamydia pneumoniae*

Bakterija *C. pneumoniae* ima sposobnost, da inficira in se razmnožuje v endotelnih celicah, gladkih mišičnih celicah, monocitih /makrofagih in limfocitih (Kaukoranta –Tolvanen in sod., 1994, Gaydos in sod., 1996, Fryer in sod., 1997, Haranaga in sod., 2001). Zaradi tega jo povezujejo tako z akutnimi kot kroničnimi boleznimi.

2.3.1 Okužbe dihal

Bakterija *C. pneumoniae* je pomemben povzročitelj bolezni dihal, ki lahko prizadene zgornja ali spodnja dihala.

Z bakterijo *C. pneumoniae* najpogosteje povezujemo pojav pljučnice in bronhitisa. Pljučnica navadno poteka v 2 stopnjah. Začne se s faringitisom in hripavostjo, nato nadaljuje v milejšo obliko pljučnice s suhim kašljem, ki lahko traja več tednov ali mesecev brez ustreznega zdravljenja. Temperatura je normalna. Bolniki se v večini primerov

zdravijo doma, do resnejše oblike bolezni in hospitalizacije lahko pride pri starejših osebah (Kuo in sod., 1995).

C. pneumoniae je povezana tudi z drugimi akutnimi obolenji dihal. Bakterijo so izolirali iz pacientov z gnojnim sinusitisom (Hashigucci in sod., 1992) in vnetjem ušesa (Ogawa in sod., 1992).

2.3.2 Astma in bakterija *Chlamydia pneumoniae*

Glavni simptom astme je sopihajoče dihanje, kar pa je tudi značilnost infekcije z bakterijo *C. pneumoniae*.

Prvo raziskavo o povezavi astme in bakterije *C. pneumoniae*, je naredil Hahn s sod. (1991). Ugotovil je, da pri pacientih, okuženih z bakterijo *C. pneumoniae* bolj pogosto pride do razvoja astmatičnega bronhitisa. Čeprav glede na nekatere raziskave, ki niso dokazale povezave med astmo in bakterijo *C. pneumoniae* (Larsen in sod., 1998; Hahn in sod., 1996; Cook in sod., 1998; Routes in sod., 2000), lahko verjamemo, da bakterija *C. pneumoniae* pospeši astmatične napade, kar je dokazano s povečanim titrom protiteles proti bakteriji (Allegra in sod., 1994; Cunningham in sod., 1998; Freymuth in sod., 1999).

2.3.3 Ateroskleroza in bakterija *Chlamydia pneumoniae*

Ateroskleroza na splošno pomeni nepravilnost v steni arterije kot posledica vnetja (Ross, 1999). Eden od možnih povzročiteljev vnetja je infekcija. Nekatere študije so nakazale možnost, da je kronična infekcija s *C. pneumoniae* dejavnik tveganja pri razvoju kardiovaskularnih bolezni (Saikku in sod., 1992; Thom in sod., 1992).

Po večletnih številnih raziskavah Saikku (2000) trdi, da ne vemo kaj je resnična vloga bakterije *C. pneumoniae* pri razvoju ateroskleroze. Lahko je samo neškodljiv faktor, ki ga pogoltne makrofag in ga prenese na mesta vnetja ter ne sodeluje pri samem procesu, lahko

je iniciator lokalnega vnetja ali pa je dejavnik, ki pospeši razvoj ateroskleroze (Quinn, 1998).

2.3.4 *Chlamydia pneumoniae* in druge bolezni

Bakterijo *C. pneumoniae* povezujejo tudi z drugimi boleznimi. Težava pri povezovanju bakterije s kroničnimi oblikami bolezni je v visoki stopnji prekuženosti prebivalstva in v uporabi pomanjkljivih metod preiskave.

Bakterijo *C. pneumoniae* povezujejo tudi s sarkoidozo (Grohagen-Riska in sod., 1988), eritemo nodosum (Erntell in sod., 1989), reaktivnim artritidom (Braun in sod., 1994), Alzheimerjevo boleznijo (Balin in sod., 1998), kronično obstruktivno boleznijo pljuč (Blasi in sod., 1993) in multiplo sklerozo (Sriram in sod., 1998).

2.4 EPIDEMIOLOGIJA

C. pneumoniae je pogost respiratoren patogen, razširjen po vsem svetu. Človek je edini poznan rezervoar in bakterija se prenaša od človeka do človeka preko respiratornih izločkov. Prenos infekcije od ljudi do ljudi je počasen (Kuo in sod., 1995).

Inkubacijska doba je več tednov, kar je daljše od mnogih drugih respiratornih patogenov (Kuo in sod., 1995).

Infekcije so zelo pogoste med šoloobveznimi otroki. Prevalenca zelo hitro narašča po petem letu starosti, in pri dvajsetih letih ima približno 50 % ljudi prisotna protitelesa proti bakteriji *C. pneumoniae*. Seroprevalenca se zvišuje zopet pri starejših osebah, vendar počasneje in prevalenca znaša do 75 %. Visoka stopnja prevalence nakazuje na pogoste infekcije in reinfekcije v življenjskem obdobju, saj je protitelesni odziv omejen na 3 do 5 let (Kuo in sod., 1995).

Infekcije s *C. pneumoniae* se pojavljajo skozi celo leto, pa vendar so zaznali obdobja epidemij in endemij. Obdobju dveh do treh let z visoko stopnjo incidence sledi obdobje štirih do petih let z nizko stopnjo incidence (Schachter in Grayston, 1998).

2.4.1 Bakterija *Chlamydia pneumoniae* v Sloveniji

Na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo je bila narejena raziskava o stopnji prevalence protiteles pri zdravi populaciji in pri bolnikih z doma pridobljeno pljučnico v Sloveniji. Raziskava je bila narejena za dve obdobji in sicer za leta 1991 - 1993 in za leti 1997 - 1998. Prav tako so preiskali parne serume bolnikov z doma pridobljeno pljučnico, zbrane v obdobju 1993 - 1999 (Keše in sod., 1994; Keše in sod., 2001; Keše in sod., 2002).

Stopnja prevalence protiteles proti bakteriji *C. pneumoniae* za obdobje 1991 - 1993 je 43,1 % (od skupno 829 vzorcev). Preiskovanci so bili stari od 1 do 89 let. Statistično značilni porast prekuženosti s *C. pneumoniae* je viden v starosti od 5 do 10 let (26 %) in v obdobju od 16 do 20 let, ko prevalenca protiteles IgG znaša 30 %. Pri odraslih zdravih preiskovancih je število okuženih oseb s *C. pneumoniae* stalno naraščalo, tako da so dokazali protitelesa proti *C. pneumoniae* že pri 64 % oseb, starejših od 51 let. Zanimivo je tudi, da je odstotek pregledanih moških, prekuženih s *C. pneumoniae*, precej večji od odstotka prekuženih žensk.

V letih 1997 - 1998 so preiskali serume 207 zdravih ljudi, starih od 18 do 62 let. Tudi v tem obdobju je prevalenca naraščala z leti preiskovancev. Dokazano je bilo povečanje prevalence protiteles glede na obdobje 1991 - 1993 pri odraslih osebah in sicer je prevalenca za leta 1991 - 1993 znašala 50,2 %, prevalenca za leta 1997 - 1998 pa 64,7 %. Povečana prekuženost populacije je lahko posledica epidemije okužb s *C. pneumoniae* v vmesnem obdobju, ko niso testirali zdravih oseb.

Preiskani so bili tudi serumski vzorci 2118 bolnikov z doma pridobljeno pljučnico, starih od enega do 83 let. *C. pneumoniae* je povzročila 15,9 % akutnih okužb. Akutno okužbo s *C. pneumoniae* so dokazali pogosteje pri moških (19,8 %) kot pri ženskah (13,1 %). Največ

akutnih okužb, povzročenih s *C. pneumoniae*, so dokazali pri bolnikih s pljučnico, starejših od 51 let.

V raziskavi so ugotovili statistično značilno povečano število okužb s *C. pneumoniae* v letih 1995 in 1996, kar nakazuje epidemijo v tem obdobju (Keše in sod., 2001).

2.5 IMUNSKI ODZIV IN BAKTERIJA *Chlamydia pneumoniae*

Imunski odziv, ki ga sproži infekcijski agens, delimo v prirojen in pridobljen imunski odziv.

Okužba s *C. pneumoniae* sproži delovanje tako prirojenega kot pridobljenega, specifičnega humoralnega in celično-posredovanega imunskega odziva (Byrne, 1998).

2.5.1 Prirojen imunski odziv

Prirojena imunost je nespecifični odgovor na tujke, ki vsebuje delovanje nevtrofilcev in makrofagov. Njihova naloga je, da bakterije požirajo, nato pa znotrajcelično razgradijo in uničijo (Ihan in Kotnik, 2002).

Odpornost proti mikrobom v organizmu omogočajo različne fizikalne in kemične pregrade. Te preprečujejo, da bi mikrobi vdrali v notranjost tkiv in organov, ki normalno niso naseljeni z njimi. Telesne pregrade so koža in sluznice.

Vsaka telesna pregrada ščiti na svoj način. Kožne lojnice izločajo maščobne kisline, ki zavirajo bakterijsko rast. Poleg tega se keratinska plast kože neprestano lušči in preprečuje trajnejšo naselitev mikrobom. Sluznice (dihal, prebavil, sečil, spolovil, oči, ušes) so glede obrambe proti mikrobom posebej občutljivi predeli. Zlasti sluznice v prebavilih in dihalih omogočajo živahno izmenjavo snovi med organizmom in okoljem. Zato so sluznice pogosto vstopna mesta za vdor mikrobom v telo. Za preprečevanje okužb je pomembna normalna bakterijska flora na sluznicah, ki onemogoča rast patogenih mikrobom. Usmerjen tok sluzi, ki ga poganja peristaltika in ciliarno delovanje, odplavlja mikroorganizme in

zmanjšuje možnost kolonizacije, solna kislina v želodcu ali žolčne soli v črevesju preprečujejo rast patogenih mikrobov, protimikrobno pa delujejo še številni drugi izločki sluznic (laktoferin, laktoperoksidaza, lizocim) (Ihan in Kotnik, 2002).

Mehanizmi prirojene odpornosti (fagocitoza, aktivacija komplemента) se proti tujkom odzovejo takoj in popolnoma ne glede na to, ali je organizem že kdaj prišel v stik z enakimi tujki ali ne. Vdor mikrobov skozi kožo ali sluznice v telo povzroči v okuženem tkivu reakcijo, ki jo imenujemo vnetje. Vsak vnetni odziv poteka v medsebojnem sodelovanju raznovrstnih in številnih celic (nevtrofilcev, makrofagov, celic T pomagalk, citotoksičnih limfocitov T, limfocitov B in celic NK). Na mestu vdora mikrobov v telo se morajo ustrezne celice zbrati in z medsebojnim signaliziranjem uskladiti svoje aktivnosti v primerno organiziran imunski odziv. Za medsebojno signaliziranje uporabljajo imunske celice neposredne stike, ki jih omogočajo receptorske povezave. Zato je pomembno tudi medcelično signaliziranje prek topnih proteinskih signalnih molekul – citokinov. Z izločanjem citokinov posamezna imunska celica vpliva na delovanje vseh preostalih, ki so običajno v njeni soseščini (Ihan in Kotnik, 2002).

Celice, ki omogočajo prirojeno imunost so fagociti, bazofilci in mastociti ter eozinofilci. Fagociti so obrambne celice, ki tujke požrejo, znotrajcelično ubijejo in razgradijo. Fagociti razlikujejo med "svojim" in "tujim" na osnovi nekaterih fizikalnih lastnosti površin delcev, s katerimi pridejo v stik. Fagociti imajo tudi receptorje, ki prepoznavajo sladkorje na površinah mikrobov (npr. LPS pri po Gramu negativnih bakterij). Pomembni receptorji, ki sprožijo fagocitozo, so Fc receptorji, s katerimi fagociti prepoznajo imunske komplekse in jih uničijo. Med fagocitnimi celicami, pomembnimi za odstranjevanje tujkov so najpomembnejši nevtrofilci in mononuklearni fagociti (monociti in makrofagi) (Ihan in Kotnik, 2002).

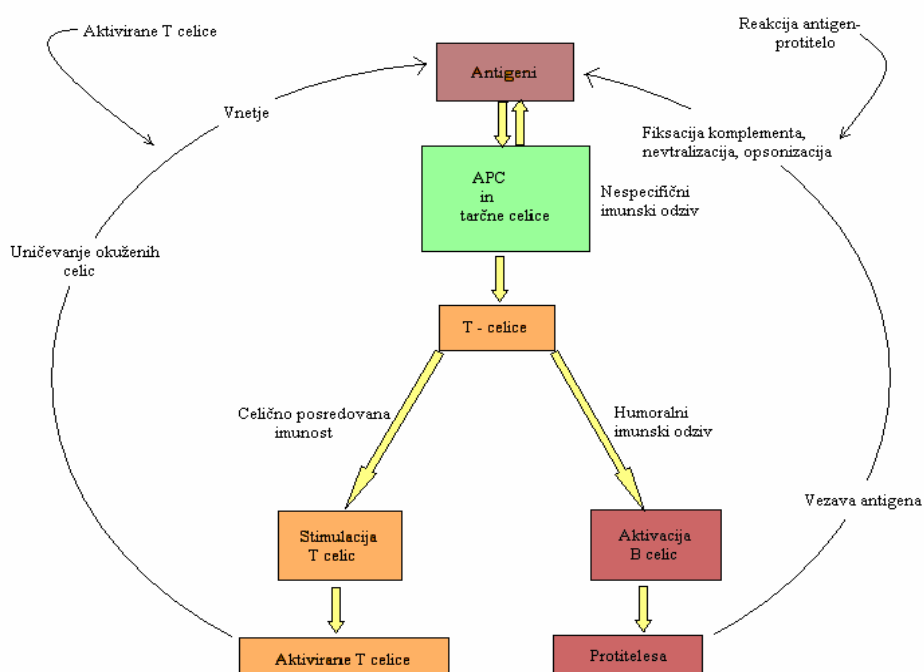
Epitelne celice dihalne poti so prva tarča napada bakterije *C. pneumoniae*. Epitelne celice izločajo citokine in kemoatraktante kot odziv na mikrobovno infekcijo. Bakterija *C. pneumoniae* inducira izražanje citokina IL-8, ki je učinkovit aktivator nevtrofilcev in monocitov (Yang in sod., 2003).

V začetni stopnji infekcije s *C. pneumoniae* ima pomemben zaščitni učinek pri prirojeni imunosti tudi izločanje IFN- γ na mestu infekcije. IFN- γ sodeluje pri kontroli števila bakterij (Rottenberg in sod., 2000).

Drugi del prirojene imunosti predstavljajo dendritične celice, ki se nahajajo v bezgavkah. So učinkoviti nespecifični fagociti in predstavljajo antigen limfocitom T (Ihan in Kotnik, 2002).

2.5.2 Pridobljen imunski odziv

Pridobljen imunski odziv je specifičen imunski odziv. Le-ta temelji na zmožnosti, da imunske celice s specifičnimi receptorji razlikujejo med svojim in tujim. Imunske celice – limfociti – imajo na svojih površinah receptorje, ki specifično prepoznavajo tuje molekule, antigene. Prepoznavi sledi imunski odziv, katerega cilj je odstraniti antigene iz telesa (Ihan, 2002). Slika 5 nam prikazuje povzetek pridobljenega imunskega odziva.



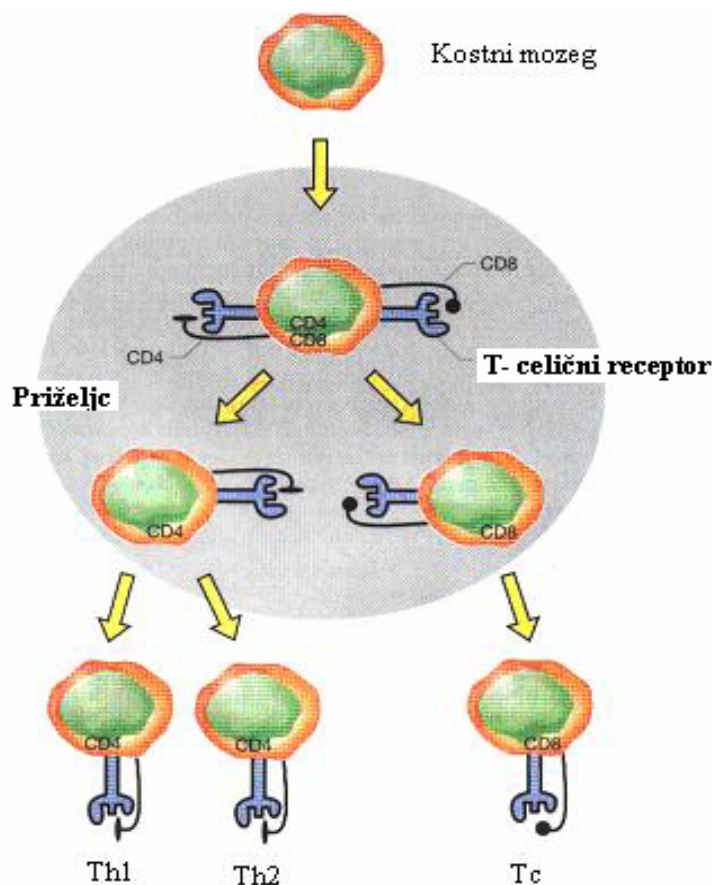
Slika 5: Povzetek imunskega odziva (Madigan in sod., 2000). APC = antigen predstavljajoče celice

Limfociti so celice, ki omogočajo specifičen imunski odziv. V organizmu je prisotnih več milijonov limfocitov, ki se razlikujejo glede na antigensko specifičnost. V pridobljenem

imunskem odzivu sodelujejo limfociti B in limfociti T. Limfociti B nastanejo in funkcionalno dozori v kostnem mozgu. Njihovi antigenski receptorji so imunoglobulinske (protitelesne) molekule, ki jih limfociti B izražajo na svoji površini. Po vezavi antigena na receptor se limfocit B aktivira in razmnožuje. Del nastalih limfocitov B se diferencira v kratkoživeče celice plazmatke, ki izločajo protitelesa, del nastalih limfocitov B pa so dolgoživeče spominske celice.

Limfociti T nastanejo iz prekurzorskih limfopoetičnih celic v kostnem mozgu. Od tam prehajajo v kri kot nezreli predhodniki limfocitov T in potujejo v timus, kjer funkcijsko dozori bodisi v celice T pomagalk (CD4+) ali v citotoksične limfocite T (CD8+). Vrste T celic prikazuje slika 6. CD4+ celice se delijo še na dve podskupini. Eno skupino predstavljajo Th1 celice, drugo skupino predstavljajo Th2 celice. Th1 celice sodelujejo v celično posredovani imunosti, Th2 celice pa stimulirajo limfocite B za produkcijo protiteles. Celice CD4+ po aktivaciji z antigenom izločajo citokine in tako uravnavajo imunski odziv. Celice tipa Th1 izločajo citokine IL-2, IFN- γ in TNF- α , celice tipa Th2 pa izločajo citokine IL-4, IL-5, IL-6, IL-13. CD8+ po aktivaciji z antigenom izločajo citotoksične snovi in na ta način ubijajo predvsem celice lastnega organizma, ki so okužene z znotrajceličnimi mikrobi.

Posledica delovanja celic Th1 je aktivacija celic CD8+. Celice Th2 pa z izločanjem prej omenjenih citokinov zavirajo delovanje celic CD8+, pospešujejo pa tvorbo protiteles. Najpomembnejši dejavniki pri usmerjanju diferenciacije celic T pomagalk v celice Th1 ali Th2 so lokalne tkivne razmere v času antigenske aktivacije (Ihan, 2002).



Slika 6: Vrste T celic. T celice nastanejo v kostnem mozgu (Madigan in sod., 2000). CD4 = celice T pomagalk, CD8 = Tc = citotoksični limfociti T, Th1 odziv = celično posredovana imunost, Th2 odziv = humoralni imunski odziv.

2.5.2.1 Celično posredovan imunski odziv (Th1 odziv)

Odziv Th1 je tipičen za zaščito pred intracelularnimi mikrobi. Posledica delovanja celic Th1 je aktivacija citotoksičnih limfocitov CD 8+, ki so sposobni uničiti celice, okužene z intracelularnimi patogeni.

Molekule MHC (MHC - major histocompatibility complex) I imajo na površini vse zdrave telesne celice, ki imajo jedro. MHC I molekule so prenašalni proteini, ki se nahajajo v endoplazmatskem retikulumu. Tuji proteini, antigeni, so v citoplazmi gostiteljeve celice encimsko razsekani na peptidne fragmente, ki preidejo v cisterne endoplazemskega

retikuluma in se vežejo na molekulo MHC I. Le-ta prenese antigen na površino celice, kjer se nato nanj veže T-celični receptor citotoksičnega limfocita. Vezava sproži izločanje citokinov ter citotoksina perforin (Ihan, 2002).

Celično posredovani imunski odziv se aktivira v zgodnji fazi akutne okužbe z bakterijo *C. pneumoniae* in sicer takoj po nastopu simptomov bolezni ter hkrati simultano s humoralnim imunskim odzivom (Halme in sod., 2000).

Raziskave, delane na miškah so pokazale, da je primarni odziv na okužbo s klamidijami, T-celični odziv, ki vključuje delovanje T-celic pomagalk in citotoksičnih limfocitov T (Byrne, 1998), najpomembnejšo vlogo v imunskem odzivu na bakterijo *C. pneumoniae* pa igrata CD8+ in IFN- γ (Penttila in sod., 1999; Rottenberg in sod., 1999; Rottenberg in sod., 2000).

Celice CD8+ so pomembne predvsem na sluznicah, kjer predstavljajo prvi obrambni mehanizem. Kot sem že omenila so celice CD8+ ubijalci, ki uničijo okužene celice s citolizo ali pa delujejo na okužene celice z izločanjem citokinov TNF- α in IFN- γ . Zaščitna vloga celic CD8+ pri okužbi z bakterijo *C. pneumoniae* ni toliko povezana s citotoksinom perforin kot z izločanjem citokinov. Rottenberg in sod. (2000) so v raziskavi delani na miškah dokazali, da miške brez gena za perforin kažejo podoben potek infekcije v primerjavi z miškam divjega tipa. To pomeni, da celice CD8+ z zmožnostjo izločanja citokinov uravnavajo potek bolezni, kot je predpostavljeno tudi pri okužbah s *C. trachomatis* (Magee in sod., 1995).

Rottenberg in sod. (2000) so v svoji raziskavi delani na miškah opazili dvojno vlogo celic CD4+ pri okužbi z bakterijo *C. pneumoniae*. Takoj po okužbi celice T pomagalk v miškah brez citotoksičnih limfocitov T, stimulirajo bakterijsko rast in pospešijo razvoj bolezni. V kasnejši fazi infekcije pa sodelujejo pri nadzoru bakterijske rasti kot tudi pri zaščitni vlogi pri reinfekciji. Celice CD8+ torej po začetni stopnji infekcije inhibirajo delovanje celic CD4+ in s tem onemogočijo njihovo škodljivo delovanje.

Najpomembnejši citokin pri nadzoru infekcije z bakterijo *C. pneumoniae* je IFN- γ , o katerem je napisanih precej člankov. Rottenberg in sod. (2000) so v svojem poskusu miškam intranazalno nanесли plazmide, ki so kodirali IFN- γ in IL-12. Dokazali so visoko odpornost mišk na okužbe z bakterijo *C. pneumoniae*.

Ugotovljeno je bilo, da pri celično posredovanem imunskem odzivu IFN- γ sodeluje pri odstranitvi klamidij, medtem ko pri humoralnem imunskem odzivu IL-4 in IL-10 nista sposobna odstranitve klamidij iz mesta okužbe, kar lahko vodi do perzistentne okužbe (Brunham, 1999; Debattista in sod., 2003). Da je imunski odziv Th1 pomembnejši pri odstranitvi bakterije *C. pneumoniae* kot odziv Th2, so dokazali tudi s poskusom na miški C57BL/6J. IFN- γ so nevtralizirali s protitelesi, zaradi česar je prišlo do povečanega števila bakterij v pljučih in hitrejšega napredovanja pljučnice (Vuola in sod., 2000).

Ključno vlogo pri celično posredovanem imunskem odzivu in s tem pri eradikaciji klamidij igra torej IFN- γ (Rottenberg in sod., 1999; Rank, 1999). Kakorkoli, ne smemo pozabiti, da odziv Th1 ni samo koristen za gostitelja. Premočan Th1 odziv lahko rezultira v vnetnih poškodbah z aktivacijo citotoksičnih T-celic, kar vodi do poškodb tkiva (Debattista in sod., 2003). Zatorej je pomembno tudi izločanje protivnetnega citokina IL-10, ki zavira delovanje imunskega odziva. Citokin IL-10 se pri okužbi s *C. pneumoniae* izloča samo ob hkratnem izločanju IFN- γ , nikoli pa ob odsotnosti IFN- γ (Halme in sod., 2000).

2.5.2.2 Humoralni imunski odziv (Th2 odziv)

Humoralni imunski odziv vključuje nastanek protiteles.

Limfociti B prepoznajo antigene v zunajcelični tekočini z antigenskimi receptorji. Antigeni, ki se vežejo na antigenske receptorje, izzovejo endocitozo. To je signal, da limfocit B sproži sintezo receptorjev za IL-2. Če je v okolici dovolj velika koncentracija IL-2, ki ga izločajo aktivirane celice T pomagalko v neposredni bližini, se ta veže na

receptorje na limfocitih B in povzroči njihovo razmnoževanje ter diferenciacijo v plazmatke ali spominske celice ali oboje. Brez IL-2 aktivacija limfocita B ni uspešna in taka celica navadno propade (Ihan, 2002).

Po aktivaciji z antigenom se limfocit začne naglo razmnoževati (klonska ekspanzija). Del limfocitov se takoj diferencira v plazmatke, ki izločajo protitelesa IgM. Preostali limfociti B se razmnožujejo naprej, ob tem pa tudi spreminjajo razred težkih verig imunoglobulinskih molekul. Običajno se sinteza od IgM preklopi na sintezo IgG, IgA ali IgE, kar je odvisno od informacije citokinov, ki oblivajo celico. Proces imenujemo izotipski prekop. Izotipski prekop se kaže tako, da v začetku okužbe prevladuje sinteza specifičnih protiteles IgM, kasneje pa specifičnih protiteles IgG (v serumu) ali IgA (na sluznicah) (Ihan, 2002).

Protitelesa IgG in IgM se razporedijo v zunajceličnih tekočinah. S svojimi specifičnimi vezišči se povežejo z antigeni. Nastanek kompleksa antigen – protitelo ima različne fiziološke učinke, ki prispevajo k odstranitvi tujka iz telesa in izničenju njegovega patološkega učinkovanja na organizem. Fiziološki učinki vezave protiteles na antigene so:

- nevtralizacija: včasih protitelo že samo z vezavo na antigen izniči njegove patološke učinke.
- opsonizacija: protitelo ob vezavi na tujek spremeni konformacijo tako, da se na njegov del Fc vežejo fagocitne celice s svojimi receptorji Fc. Fagocitne celice po tej vezavi fagocitirajo celoten imunski kompleks in tako odstranijo tujek.
- aktivacija komplementa: protitelo ob vezavi na antigen spremeni konformacijo tako, da z delom Fc sproži kaskadno aktivacijo proteinov komplementnega sistema (klasična pot). Posledica je nastanek litičnega kompleksa, ki poškoduje bakterijsko steno. Aktivirani proteini komplementa in njihovi odlomki tudi ojačijo vnetno reakcijo in pospešijo prihod celic vnetnic v vnetišče (kemotaksa) (Ihan, 2002).

Protitelesa IgA delimo na dva podrazreda. Protitelesa IgA1 se nahajajo pretežno v serumu, protitelesa IgA2 pa se nahajajo v izločkih, verjetno zato, ker so odporna proti proteazam mikrobov, ki naseljujejo dihalno in prebavno sluznico. IgA2 se v izločkih nahaja v posebni, sekretorni obliki sIgA. Poglavitna funkcijska razlika med IgA in ostalimi protitelesi, ki prevladujejo v krvi (IgG, IgM) je, da IgG in IgM aktivirata vnetne dejavnike (proteine komplementa, fagocitne celice), IgA pa veže tuje molekule na površini sluznic in oteži njihov vdor v sluznice (Ihan, 2002).

Verjetno ima humoralni imunski odziv pri okužbah s klamidijami nekoliko manj pomembno vlogo kot celično posredovani imunski odziv. Elementarno telesce klamidij zelo hitro vstopi v gostiteljevo celico (Byrne in Moulder, 1978) in s tem se zmanjša možnost delovanja nevtralizirajočih protiteles proti bakteriji. Znotraj gostiteljeve celice se klamidije izognejo obrambnemu mehanizmu gostiteljevih protiteles.

Eden od načinov kako lahko protitelesa delujejo proti klamidijam je opsonizacija. Opsonizirane klamidije fagocitirajo makrofagi ali polimorfonuklearne celice ter jih uničijo. Z opsonizacijo se poveča efektorski učinek dendritičnih celic, ki povečajo delovanje Th1 odziva (Moore in sod., 2002).

Kljub temu, da klamidije po vstopu v gostiteljevo celico ostanejo v inkluziji, izločajo proteine preko vezikla v gostiteljevo citoplazmo, kjer so razgrajeni in posledično predstavljeni na MHC molekulah. Vendar pa lahko klamidije v gostiteljevi celici inhibirajo predstavitev antigena. V celicah, okuženih s *C. trachomatis* in *C. pneumoniae* so identificirali CPAF (CPAF – angl. Chlamydial proteosom-like activity factor) (Fan in sod., 2002; Zhong in sod., 2001). CPAF razgradi gostiteljev transkripcijski faktor RFX5, ki je potreben za izražanje genov MHC I in MHC II molekul. To je eden od načinov kako se bakterija *C. pneumoniae* izogne prepoznavanju s strani imunskega odziva in mogoče je to ključni mehanizem za celično perzistentno okužbo (Fan in sod., 2002; Zhong in sod., 2001).

Kakorkoli, in vitro študije so dokazale, da sekretorna in sistemska protitelesa proti klamidijam igrajo pomožno vlogo pri zaščitni imunosti s tem, da pospešijo delovanje spominskega odziva in povečajo delovanje primarnega T celičnega odziva pri reinfekciji (Morrison in sod., 2000; Morrison in Morrison, 2001).

V serumih ljudi, okuženih z bakterijo *C. pneumoniae* so našli več proteinov *C. pneumoniae* (Campbell in sod., 1990). In vitro študije so dokazale, da MOMP pri *C. pneumoniae* sproži delovanje protiteles, vendar ne v taki meri kot pri *C. trachomatis* (Puolakkainen in sod., 1995; Wolf in sod., 2001). Veliko večji imunski odziv pri *C. pneumoniae* sproži protein Omp2, ki ga smatrajo kot glavno tarčo imunskega sistema. Imunski odziv na Omp2 je specifičen za rod (Essig in sod., 1999; Mygind in sod., 1998). Genom bakterije *C. pneumoniae* kodira 21 proteinov Pmp. Glede na to, da so to polimorfni proteini na površini

bakterije, nekateri znanstveniki prepostavljajo, da tvorijo klamidijsko S-plast proteinov in na ta način igrajo esencialno vlogo pri virulenci *C. pneumoniae* (Grimwood in sod., 2001; Knudsen in sod., 1999).

Pri humoralnem imunskem odzivu je najhitrejša produkcija sekretornih protiteles IgA (sIgA) na mestu infekcije in sicer že nekaj dni po infekciji s *C. pneumoniae*. Protitelesa sIgA nimajo dolge življenjske dobe (Mims, 1990).

Nato sledi produkcija humoralnih protiteles proti LPS-u. Anti-LPS specifična IgM, IgG in IgA protitelesa nastanejo 5 do 20 dni kasneje, odvisno ali gre za primarno infekcijo ali reinfekcijo. Pri primarni infekciji najprej nastanejo protitelesa IgM in sicer 2 do 3 tedne po izbruhu bolezni, približno isti čas nastanejo tudi protitelesa IgA, IgG protitelesa pa nastanejo šele 6 do 8 tednov po nastopu bolezni.

Pri reinfekcijah je imunski odziv hitrejši. Protitelesa IgG in IgA nastanejo že po 1 do 2 tednih, protiteles IgM navadno ni (Dowell in sod., 2001).

2.6 LABORATORIJSKO DOKAZOVANJE OKUŽB Z BAKTERIJO *Chlamydia pneumoniae*

2.6.1 Kužnina in transport kužnine

Za dokaz bakterije *C. pneumoniae* v bolnikovi kužnini najpogosteje jemljemo bris nosnožrelne sluznice in žrela, izmeček, izpirek žrela ter naredimo biopsijo tkiva (Dowell in sod., 2001).

Klamidija je znotrajcelična bakterija in zato izredno občutljiva na okoljske vplive. Kužnino takoj po odvzemu damo v transportno gojišče in jo za največ 24 ur hranimo pri temperaturi 4 °C (Dowell in sod., 2001).

Transportno gojišče za brise je 2SP gojišče (sukroza, 68,4 g; dvobazičen kalijev fostat, 2,01 g; monobazičen kalijev fosfat, 1,01 g; gentamicin, 10 µg/mL; amfotericin B 100 µg/mL; vankomicin, 25 µg/mL; 10 – 20 % fetalni telečji serum, končni volumen 1000 mL,

pH 7,2). Izmeček in izpirek žrela damo v transportno gojišče v razmerju 1 (vzorec):2 (gojišče) (Dowell in sod., 2001).

2.6.2 Diagnostični postopki

2.6.2.1 Kultiviranje kužnine, osamitev in identifikacija

Včasih so bakterije *C. pneumoniae* gojili v rumenjakovih vrečkah oplojenih jajc (Kuo in sod., 1986), danes pa uporabljamo celične linije HL (Cles in Stamm, 1990) in HEp-2 (Wong in sod., 1992).

Kužnino najprej vorteksiramo 15 – 20 sekund v transportnem gojišču in odstranimo tekočino. Približno 100 do 200 μ L te tekočine uporabimo kot inokulum. Vzorec inokuliramo v celično kulturo s centrifugiranjem, nato sledi inkubacija, kasneje pa še obarvanje z vrstno specifičnimi monoklonskimi protitelesi proti *C. pneumoniae* (Dowell in sod., 2001). Bakterija *C. pneumoniae* v celičnih kulturah dela inkluzije, ki so manjše od inkluzij ostalih klamidij in ne vsebujejo glikogena. Identificiramo jo z vrstno specifičnimi monoklonskimi protitelesi, označenimi s fluoresceinom (Kuo in sod., 1995).

2.6.2.2 Serološke metode

Danes večina znanstvenikov meni, da je serološki test mikroimunofluorescence (MIF) "zlati standard" v mikrobiološki diagnostiki infekcij s *C. pneumoniae*. Prav z MIF testom so dokazali, da je *C. pneumoniae* nova vrsta klamidij (Saikku in sod., 1985). Kuo in sod. (1995) pa so ga ocenili kot najbolj specifičen in najbolj občutljivejši test za dokazovanje okužb s *C. pneumoniae*.

Pri testu MIF uporabljamo prečiščena elementarna telesca vseh treh vrst klamidij, *C. pneumoniae*, *C. trachomatis* in *C. psittaci*, ki so ločeno nanešena in vezana na objektna stekelca. Zato s tem testom določamo vrstno specifična protitelesa, ki so usmerjena proti beljakovinam zunanje membrane. Dokazujemo torej prisotnost protiteles IgA, IgG in IgM. Za merilo akutne okužbe s *C. pneumoniae* velja 4-kratni porast titra protiteles IgG ali titer

protiteles IgM $\geq 1:16$ v parnih serumih, odvzetih v razmiku 4 do 8 tednov. Za možno akutno infekcijo velja tudi titer protiteles IgG $\geq 1:512$ (Dowell in sod., 2001).

Protitelesni imunski odziv se razlikuje pri primarni infekciji in pri reinfekciji. Pri primarni okužbi je imunski odziv zakasnen. Protitelesa IgM in IgA nastanejo 2 do 3 tedne po nastopu bolezni, IgG pa šele 6 do 8 tednov po nastopu bolezni.

Reinfekcije so pogoste pri odraslih in starejših osebah. Protitelesni imunski odziv je hitrejši. Protitelesa IgG nastanejo že po 1 do 2 tednih in v serumu jih dokažemo v titru 1:512. Protiteles IgM navadno ni (Dowell in sod., 2001).

Problem s serološkim testom pa predstavlja dokazovanje kroničnih in perzistentnih infekcij s *C. pneumoniae*. Serološki kriteriji za dokaz kroničnih infekcij so bili narejeni na osnovi perzistiranja protiteles IgG in IgA (Saikku in sod., 1992). Predlagano je bilo, da je visok titer protiteles IgA boljši pokazatelj kronične okužbe kot pa titer protiteles IgG in sicer zato, ker je razpolovna doba IgA 5 do 7 dni, medtem, ko je razpolovna doba protiteles IgG več tednov do mesecev.

Kakorkoli, danes ne poznamo nobenega preverjenega serološkega markerja za dokaz perzistentne ali kronične okužbe s *C. pneumoniae* (Dowell in sod., 2001).

Pri testu MIF lahko pride do navzkrižnih reakcij. Kot antigen vezan na stekelce, se uporabljajo prečiščena elementarna telesca *C. pneumoniae*, *C. trachomatis* in *C. psittaci*. Vse tri vrste klamidij imajo na površini celic izpostavljene antigenske determinante, ki so lahko vrstno-specifične ali pa so specifične za rod. Glavni antigen, specifičen za rod je LPS.

Do navzkrižne reaktivnosti večinoma prihaja zaradi protiteles proti antigenu specifičnemu za rod, LPS-u. Zato torej protitelesa proti *C. pneumoniae* reagirajo z antigeni *C. trachomatis* in *C. psittaci*. Če so elementarna telesca dobro obdelana in prečiščena, se možnost pojava navzkrižne reakcije zmanjša.

Obstaja pa tudi možnost, da ima bolnik dejansko protitelesa proti *C. psittaci* oz. *C. trachomatis*, kar se pokaže kot navzkrižna reakcija.

2.6.2.3 Imunohistokemija (IHC - immunohistochemistry)

Bakterijo *C. pneumoniae* so odkrili v različnih tkivih. Prednost IHC metode je, da lahko natančno določimo kje in v katerih celicah se patogen nahaja. Celice, ki so dovzetne za infekcijo s *C. pneumoniae* so makrofagi, endotelij in gladke mišične celice (Kuo in Campbell, 2000).

Najpogosteje se uporablja avidin-biotin imunski kompleks (Hsu in sod., 1981).

2.6.2.3 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Verižna reakcija s polimerazo je zelo občutljiva metoda in zazna zelo nizke koncentracije DNK ali RNK (že 10-100 ET) bakterije *C. pneumoniae*. S pomočjo te metode, so bakterijo dokazali v različnih vzorcih. To so vzorci kužnine respiratornega trakta (Tong in Sillis, 1993; Boman in sod., 1997), vaskularnega tkiva (Kuo in sod., 1993; Grayston in sod., 1995), seruma (Naidu in sod., 1997) in perifernih krvnih mononulearnih celic (Boman in sod., 1998).

Za dokaz DNK bakterije *C. pneumoniae* obstajajo različne tarčne regije: geni za 16S rRNA (Gaydos in sod., 1992), MOMP (Tong in Sillis, 1993) in *Pst* fragment (Campbell in sod., 1992) ter različne tehnike PCR-ja.

2.7 ZDRAVLJENJE OKUŽB Z BAKTERIJO *Chlamydia pneumoniae*

Najučinkovitejši antibiotiki proti okužbi s *C. pneumoniae* so tetraciklini in makrolidi. Priporočena je dolgotrajna terapija zaradi možnega pojava perzistentne okužbe. Standardna terapija z doksicilinom traja od 10 do 14 dni (Kuo in sod., 1995).

Okužb s *C. pneumoniae* ne moremo pozdraviti s penicilinom, ampicilinom ali sulfonamidi (Kuo in sod., 1995).

2.8 NAMEN NALOGE

V eksperimentalnem delu diplomske naloge smo naredili primerjavo rezultatov dveh komercialnih testov mikroimunofluorescence dveh različnih proizvajalcev in sicer Focus, ZDA in Labsystem, Finska. Želeli smo dokazati protitelesa IgM, IgG in IgA proti *C.*

pneumoniae z obema testoma in nato primerjati rezultate teh 2 seroloških testov. Zanimalo nas je, ali sta oba testa primerna za dokazovanje protiteles proti *C. pneumoniae* in če pri katerem od teh dveh testov prihaja do navzkrižnih reakcij.

Pred izvedbo dela smo postavili delovno hipotezo:

- oba testa sta primerna za dokazovanje protiteles IgM, IgG in IgA proti *C. pneumoniae*
- možen je pojav navzkrižne reaktivnosti pri obeh testih.

3 MATERIALI IN METODE

V raziskavo smo vključili 77 serumov bolnikov z napotno diagnozo pljučnica z neznanim povzročiteljem. Serume smo preiskali s serološkim testom mikroimunofluorescence glede navzočnosti protiteles IgG, IgM in IgA proti *C. pneumoniae*. V ta namen smo uporabili komplet reagentov proizvajalca Focus (ZDA) in Labssystem (Finska). Rezultate titrov

protiteles IgG, IgM in IgA testa Focus smo nato primerjali z rezultati titrov protiteles IgG, IgM in IgA testa Labsystem.

3.1 PRINCIP TESTA MIKROIMUNOFLUORESCENCE (MIF)

Test mikroimunofluorescence (MIF) je dvostopenjska "sendvič" metoda. V prvi stopnji redčimo bolnikov serum s fosfatnim pufrom. Razredčenega nakapljamo na stekelca, na katerih je že vezan antigen. Antigen so prečiščena elementarna telesca treh vrst klamidij, *C. pneumoniae*, *C. trachomatis* in *C. psittaci*. Sledi inkubacija v vlažni komori, nato pa spiranje s pufrom, da odstranimo nevezana protitelesa.

V drugi stopnji na stekelca dodamo protitelesa proti človeškim imunoglobulinom, konjugirana s FITC in sicer za dokaz protiteles IgM, IgG in IgA. Med inkubacijo v vlažni komori se protitelesa proti človeškim imunoglobulinom, konjugirana s FITC vežejo na kompleks antigen-protitelo, ki je nastal v prvi stopnji. Po inkubaciji stekelca zopet speremo, posušimo in pokrijemo s krovnim stekelcem. Sledi še mikroskopiranje s fluorescentnim mikroskopom. Pri pozitivni reakciji vidimo posamezna okrogla elementarna telesca *C. pneumoniae*, ki oddajajo specifično zeleno fluorescentno svetlobo. Pozitivno reakcijo prikazuje slika 9A. Pri negativni reakciji ne vidimo posameznih elementarnih telesc, ki fluorescirajo (slika 9B).

3.2 TEST MIKROIMUNOFLUORESCENCE, proizvajalca Labsystem (Finska)

3.2.1 Komplet reagentov

Za izvedbo MIF smo uporabili komplet reagentov proizvajalca Labsystem. Komplet reagentov za dokaz IgG, IgA in IgM vsebuje:

- objektna stekelca s po 21 polji. Na vsako polje so ločeno nanešena in vezana prečiščena elementarna telesca *C. pneumoniae*, *C. trachomatis* in *C. psittaci*, ki predstavljajo antigen,
- steklenička s kozjimi anti-humanimi IgG, označenimi s FITC (2,5 ml),
- steklenička s kozjimi anti-humanimi IgA, označenimi s FITC (3 ml),
- steklenička s kunčjimi anti-humanimi IgM, označenimi s FITC (1,5 ml),

- steklenička z IgG pozitivno kontrolo (0,3 ml),
- steklenička z IgA pozitivno kontrolo (0,3 ml),
- steklenička z IgM pozitivno kontrolo (0,3 ml),
- steklenička z negativno kontrolo (0,3 ml),
- steklenička glicerola (7 ml),
- steklenička fosfatne soli, pH $7,4 \pm 0,2$ (50 ml),
- krovna stekelca.

Pred in po uporabi hranimo reagente v hladilniku pri temperaturi med $+2\text{ }^{\circ}\text{C}$ in $+8\text{ }^{\circ}\text{C}$ ter pazimo, da FITC-konjugatov ne izpostavljam o prekomerni svetlobi.

3.2.2 Pribor za izvedbo testa

- destilirana voda,
- 0,01M fosfatni pufer (PBS – angl. phosphate buffer saline), pH 7,4,
- mikrotitrna ploščica,
- vlažna komora,
- staničevina,
- merilec časa,
- inkubator s temperaturo $+37\text{ }^{\circ}\text{C}$,
- kadičke za spiranje,
- stojalo za stekelca,
- kalibrirane pipete,
- imerzijsko olje,
- fluorescentni mikroskop (Nikon E 400, Tokio, Japonska),
- hladilnik s temperaturo $+2\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $+8\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.3 Priprava serumskih razredčin

- najprej smo pripravili protokolni list, katerega smo označili s številkami serumov, razredčinami serumov, številkami ploščic in kontrolnimi številkami testa

- mikrotitrsko ploščico smo označili z ustreznimi razredčinami serumov in številkami bolnikovih serumov
- serumske razredčine smo pripravili tako, da smo v luknjice v prvi vrstici označene mikrotitrsko ploščice nanесли 70 μl PBS, v druge vrstice pa po 50 μl . Nato smo v prvo vrstico odpipetirali po 10 μl bolnikovega seruma in dobili razredčino 1:8. Mikrotitrsko ploščico smo po navodilih proizvajalca inkubirali 10 minut pri sobni temperaturi
- po inkubaciji smo naredili dvojne razredčine bolnikovega seruma, tako, da smo z multikanalno pipeto prenašali po 50 μl razredčine iz prve vrstice v naslednje vrstice do razredčine 1:512.

3.2.4 Postopek testiranja

3.2.4.1 Dokaz protiteles IgG

- stekelca s klamidijскими antigeni za dokaz protiteles IgG smo najprej označili
- nato smo na stekelca s klamidijскими antigeni nanašali po 10 μl razredčine seruma in sicer 1:32, 1:128 in 1:512. Nanašali smo jih v smeri od največje razredčine proti najmanjši. Prav tako smo odpipetirali in na stekelca nanесли pozitivno in negativno kontrolo, ki ju nismo redčili
- stekelca smo inkubirali v vlažni komori 30 minut pri temperaturi +37 °C
- po inkubaciji smo stekelca nežno spirali s PBS, nato smo jih vstavili v stojalo, ki smo ga dali v posodico s PBS in stekelca tako spirali dvakrat po 5 minut
- stekelca smo potem prenesli še v posodico z destilirano vodo in jih sprali z dviganjem in spuščanjem stojalca
- po končanem postopku smo stekelca pustili, da so se posušila pri temperaturi +37 °C
- na stekelca smo nato po kapljicah (10 μl) dodali protitelesa proti človeškim IgG, konjugirana s FITC in inkubirali v vlažni komori 30 minut pri temperaturi +37 °C
- stekelca smo po inkubaciji sprali in posušili po enakem postopku, kot je opisan zgoraj

- na posušena stekelca smo potem nakapljali glicerol in pokrili s krovnim stekelcem ter pazili, da ni bilo mehurčkov
- mikroskopirali smo še isti dan s fluorescentnim mikroskopom z objektivom 400-kratne povečave z imerzijskim oljem.

3.2.4.2 Dokaz protiteles IgM

Postopek dokazovanja protiteles IgM je podoben postopku dokazovanja protiteles IgG, le da smo na stekelca s klamidijскими antigeni nanegli 10 µl razredčine seruma 1:16 in inkubirali v vlažni komori 3 ure pri temperaturi +37 °C. Pri dokazovanju protiteles IgM smo uporabili protitelesa proti človeškim IgM, konjugirana s FITC.

3.2.4.3 Dokaz protiteles IgA

Na ustrezno označena stekelca smo nanegli 10 µl razredčine seruma 1:64 in 1:256. Stekelca smo inkubirali v vlažni komori 30 minut pri temperaturi +37 °C. Preostali postopek smo delali enako kot je opisan za dokaz protiteles IgG, le da smo v tem primeru dodali protitelesa proti človeškim IgA, konjugirana s FITC.

3.3 TEST MIKROIMUNOFLUORESCENCE, proizvajalca Focus (ZDA)

3.3.1 Komplet reagentov

Za izvedbo testa mikroimunofluorescence smo uporabili komplet reagentov proizvajalca Focus, ZDA. Komplet reagentov za dokaz protiteles IgG, IgA in IgM vsebuje:

- objektna stekelca z dvanajstimi polji. Vsako polje vsebuje 4 točke: ena točka je negativna kontrola s celicami rumenjakeve vrečke, preostale 3 točke pa imajo vezana prečiščena elementarna telesca *C. pneumoniae*, *C. trachomatis* in *C. psittaci*, ki predstavljajo antigen (sliki 7 in 8),
- steklenička s kozjimi anti-humanimi IgG, označenimi s FITC (3,5 ml),
- steklenička s kozjimi anti-humanimi IgA, označenimi s FITC (3,5 ml),
- steklenička s kozjimi anti-humanimi IgM, označenimi s FITC (3,5 ml),
- steklenička z IgG pozitivno kontrolo (0,3 ml),

- steklenička z IgA pozitivno kontrolo (0,3 ml),
- steklenička z IgM pozitivno kontrolo (0,3 ml),
- steklenička PBS s kozjim antiserumom proti človeškim IgG (12 ml),
- steklenička z negativno kontrolo (0,25 ml),
- steklenička glicerola (2,5 ml),
- steklenička fosfatne soli, pH $7,2 \pm 0,1$.

Pred in po uporabi reagentne hranimo v hladilniku pri temperaturi med $+2\text{ °C}$ in $+8\text{ °C}$.

3.3.2 Pribor za izvedbo testa

- destilirana voda,
- 0,01M fosfatni pufer (PBS), pH 7,4,
- mikrotitrna ploščica,
- vlažna komora,
- staničevina,
- merilec časa,
- inkubator s temperaturo $+37\text{ °C}$,
- kadičke za spiranje,
- stojalo za stekelca,
- kalibrirane pipete,
- imerzijsko olje,
- fluorescentni mikroskop (Nikon E 400, Tokio, Japonska),
- hladilnik s temperaturo $+2\text{ °C}$ do $+8\text{ °C}$,
- krovna stekelca.

3.3.3 Priprava serumskih razredčin

- najprej smo pripravili protokolni list, katerega smo označili s številkami serumov, razredčinami serumov, številkami ploščic in kontrolnimi številkami testa

- mikrotitrsko ploščico smo označili z ustreznimi razredčinami serumov in številkami bolnikovih serumov
- serumske razredčine smo pripravili tako, da smo v luknjice v prvi vrstici označene mikrotitrsko ploščice odpipetirali po 150 μ l PBS, v druge vrstice pa po 100 μ l. V prvo vrstico smo dodali še po 50 μ l bolnikovega seruma (razredčina 1:4)
- nato smo naredili dvojne razredčine bolnikovega seruma, tako, da smo z multikanalno pipeto prenašali po 100 μ l razredčine iz prve vrstice v naslednje vrstice do razredčine 1:512.

3.3.4 Postopek testiranja

3.3.4.1 Dokaz protiteles IgG

- na ustrezno označena stekelca s klamidijскими antigeni smo nanegli po 25 μ l razredčine seruma in sicer 1:32, 1:128 in 1:512. Nanašali smo jih v smeri od največje razredčine proti najmanjši. Prav tako smo odpipetirali in na stekelca nanegli pozitivno in negativno kontrolo, ki ju nismo redčili
- stekelca smo inkubirali v vlažni komori 30 minut pri temperaturi +37 °C
- po inkubaciji smo stekelca nežno spirali s PBS, nato smo jih vstavili v stojalo, ki smo ga dali v posodico s PBS in stekelca tako spirali dvakrat po 5 minut
- stekelca smo potem prenesli še v posodico z destilirano vodo in jih sprali z dviganjem in spuščanjem stojalca
- po končanem postopku smo stekelca pustili, da so se posušila na zraku
- na stekelca smo nato dodali 25 μ l protiteles proti človeškim IgG, konjugirana s FITC in inkubirali v vlažni komori 30 minut pri temperaturi +37 °C
- stekelca smo po inkubaciji sprali in posušili po enakem postopku, kot je opisan zgoraj
- na posušena stekelca smo potem nakapljali glicerol in pokrili s krovnim stekelcem ter pazili, da ni bilo mehurčkov
- mikroskopirali smo še isti dan s fluorescentnim mikroskopom z objektivom 400-kratne povečave z imerzijskim oljem.

3.3.4.2 Dokaz protiteles IgM

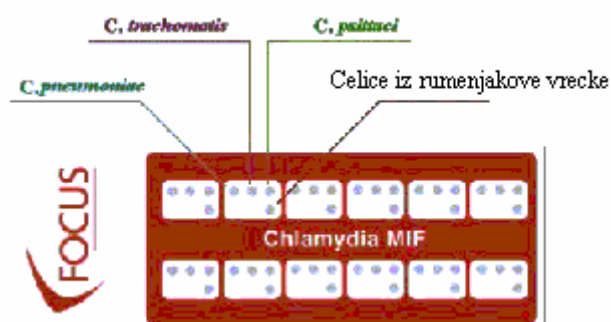
Pri dokazovanju protiteles IgM lahko zaradi prisotnosti revmatoidnega faktorja v serumu dobimo lažno pozitiven rezultat. Zato serum predhodno obdelamo, da odstranimo revmatoiden faktor.

- najprej pripravimo razredčine seruma tako, da na mikrotitrsko ploščico odpipetiramo 10 μ l seruma in 90 μ l PBS s kozjim antiserumom proti človeškemu IgG,
- pustimo na sobni temperaturi vsaj 5 minut, da poteče reakcija imunoprecipitacije,
- serumska razredčina je tako pripravljena na nadaljni postopek. Precipitat ne moti poteka testa.

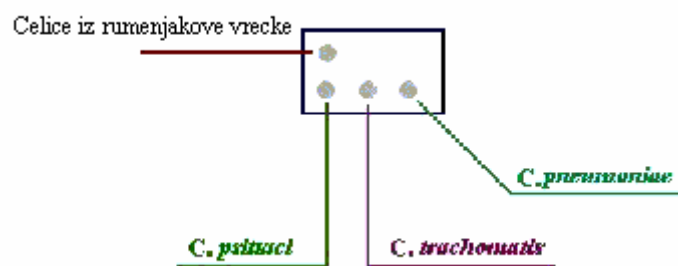
Nadaljni postopek dokazovanja protiteles IgM je podoben postopku dokazovanja protiteles IgG, le da smo na stekelca s klamidijскими antigeni nanesli 25 μ l razredčine seruma 1:16 in inkubirali v vlažni komori 3 ure pri temperaturi +37 °C ter, da so bile v času spiranja kadičke na stresalniku. Pri dokazovanju protiteles IgM smo uporabili protitelesa proti človeškemu IgM, konjugirana s FITC.

3.3.4.3 Dokaz protiteles IgA

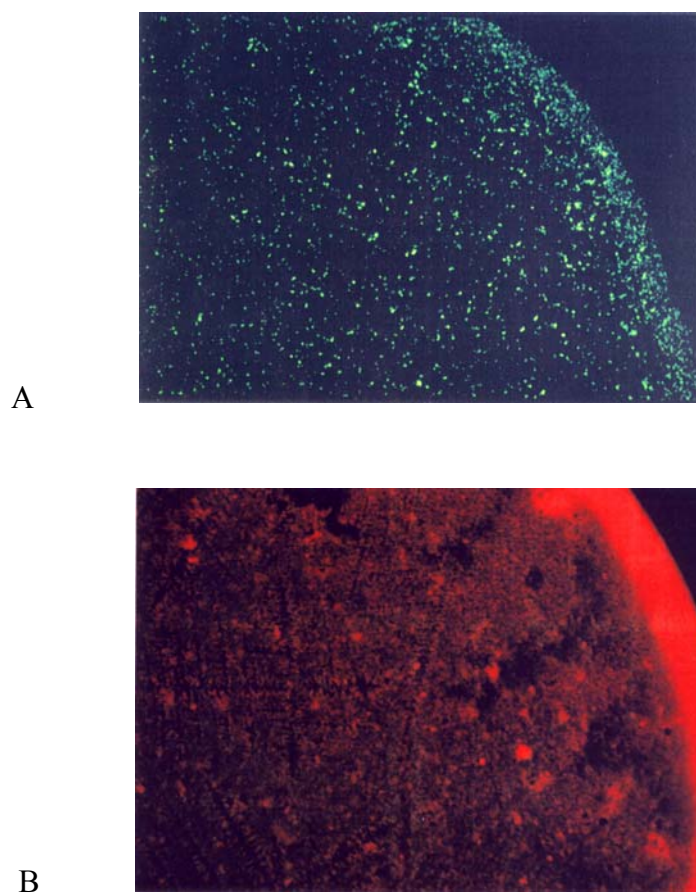
Na ustrezno označena stekelca smo nanesli 25 μ l razredčine seruma 1:64 in 1:256. Preostali postopek smo delali enako kot je opisan za dokaz protiteles IgG, le da smo v tem primeru dodali protitelesa proti človeškemu IgA, konjugirana s FITC.



Slika 7: Shema stekelca s klamidijскими antigeni



Slika 8: Izgled enega polja na objektnem stekelcu



Slika 9: Test mikroimunofluorescence za dokaz specifičnih protiteles proti *C. pneumoniae*. A = pozitivna reakcija, B = negativna reakcija.

3.4 VREDNOTENJE REZULTATOV

Pri pozitivni reakciji pod mikroskopom vidimo posamezna okrogla elementarna telesca *C. pneumoniae*, ki oddajajo specifično zeleno fluorescentno svetlobo. Pozitivno reakcijo prikazuje slika 9A. Kot končni titer smo določili razredčino seruma, kjer elementarna telesca še oddajajo specifično fluorescentno svetlobo. Pri negativni reakciji posameznih elementarnih telesc ne vidimo. Negativno reakcijo prikazuje slika 9B.

3.4.1 Dokaz protiteles IgG

Kot pozitiven rezultat smo upoštevali titre protiteles IgG, ki so bili večji ali enaki 1:16.

3.4.2 Dokaz protiteles IgM

Kot pozitiven rezultat smo upoštevali titre protiteles IgM, ki so bili večji ali enaki 1:8.

3.4.3 Dokaz protiteles IgA

Kot pozitiven rezultat smo upoštevali titre protiteles IgA, ki so bili večji ali enaki 1:32.

3.4.4 Navzkrižna reaktivnost

Serume, ki so pozitivno reagirali z vsemi tremi antigeni, *C. pneumoniae*, *C. trachomatis* in *C. psittaci* smo ovrednotili kot navzkrižno reaktivnost in jih obravnavali posebej.

4 REZULTATI

V raziskavo smo vključili 77 serumov bolnikov z napotno diagnozo pljučnica, ki smo jih preiskali s testom mikroimunofluorescence (MIF) glede navzočnosti protiteles IgG, IgA in IgM proti *C. pneumoniae*.

Naredili smo test MIF proizvajalca Focus in rezultate primerjali z rezultati testa MIF proizvajalca Labssystem. Za dokaz protiteles IgG smo primerjali 77 serumov, medtem, ko smo za dokaz IgA primerjali 75 serumov, za dokaz protiteles IgM pa 74 serumov. Za dokaz protiteles IgA in IgM namreč niso bili preiskani vsi serumi.

Najprej smo pregledali, kateri serumi so pozitivni in negativni ter jih zbrali v preglednici 2. Za pozitivne vrednosti protiteles IgG smo upoštevali titer, ki je bil večji ali enak 1:16, pri protitelesih IgA je predstavljal pozitiven titer 1:32 ali več, pri protitelesih IgM pa titer 1:8 ali več.

Preglednica 2: Število in delež pozitivnih in negativnih serumov MIF (dokaz protiteles proti *C. pneumoniae*, dobljenih z reagenti dveh proizvajalcev)

Protitelesa	Število / delež poz. in neg. serumov (%)					
	Test Labsystem			Test Focus		
	Poz. serumi	Neg. serumi	Skupaj	Poz. serumi	Neg. serumi	Skupaj
IgG	57 / 74	20 / 26	77 / 100	59 / 77	18 / 23	77 / 100
IgA	36 / 48	39 / 52	75 / 100	44 / 59	31 / 41	75 / 100
IgM	24 / 32	50 / 68	74 / 100	9 / 12	65 / 88	74 / 100

V preglednici 2 imamo primerjavo števila in deležev pozitivnih in negativnih serumov posameznih protiteles obeh testov. Do najmanjšega odstopanja pride pri rezultatih protiteles IgG. S testom Labsystem smo dobili delež pozitivnih serumov 74 %, s testom Focus pa 77 %. Odstopanje rezultatov je samo za 3 %.

Pri dokazovanju protiteles IgA smo s testom Labsystem dobili 48 % pozitivnih serumov, s testom Focus pa smo dokazali 59 % pozitivnih serumov. Razlika je bila pri 11 % serumov.

S testom Labsystem smo pri dokazovanju protiteles IgM dobili 32 % pozitivnih serumov, s testom Focus pa 12 %. Razlika je precejšnja. Pri dokazovanju protiteles IgM s testom Labsystem smo kar pri 15 % serumov dobili možno navzkrižno reaktivnost. Pri protitelesih IgM smo dokazali višji delež pozitivnih serumov pri testu Labsystem, medtem, ko smo pri protitelesih IgG in IgA višji delež pozitivnih serumov dokazali s testom Focus.

4.1 PROTITELESA IgG PROTI BAKTERIJI *Chlamydia pneumoniae*

Serume smo glede na titre protiteles IgG razdelili v 4 skupine, kar prikazuje preglednica 3. V prvo skupino smo uvrstili serume, ki so bili negativni proti *C. pneumoniae*, v drugo skupino smo uvrstili serume, ki so imeli titre protiteles IgG proti bakteriji *C. pneumoniae* večje ali enake 1:16 in manjše ali enake 1:32, v tretjo skupino smo uvrstili serume, ki so imeli titre protiteles IgG večje od 1:32 in manjše ali enake 1:128, v četrto skupino pa smo uvrstili serume, ki so imeli titre protiteles, ki so bili večji od 1:128.

Ujemanje rezultatov obeh testov v prvi skupini, kamor smo uvrstili negativne serume proti *C. pneumoniae*, je bilo 90 %. V drugi skupini, kamor smo uvrstili serume, ki so imeli titre večje ali enake 1:16 in manjše ali enake 1:32, je ujemanje rezultatov 61 %. Že v preglednici 2 smo ugotovili, da sta dva seruma pri testu Focus pozitivna, medtem, ko smo pri testu Labssystem dobili negativen rezultat. Pri titrih protiteles IgG smo v vseh primerih odstopanja rezultatov dobili nižje titre protiteles pri testu Labssystem. Razlike pri treh serumih so bile v 1 razredčini, v petih vzorcih pa v 2 razredčinah (preglednica 4).

Preglednica 3: Rezultati dokazovanja protiteles IgG proti bakteriji *C. pneumoniae* (2 proizvajalcev MIF).

Titer IgG	Test Labssystem	Test Focus	Delež ujemanja rezultatov
Neg. serumi	20	18	90 %
$\geq 16 \leq 32$	18	11	61 %
$> 32 \leq 128$	23	29	79 %
> 128	16	19	84 %
Skupno št. serumov	77	77	

(Neg. = negativni)

V tretjo skupino smo uvrstili serume, ki so imeli titre protiteles IgG proti bakteriji *C. pneumoniae* večje od 1:32 in manjše ali enake 1:128. Ujemanje rezultatov obeh testov v tej skupini je bilo 79 %. Tudi v tem primeru smo dobili nižje titre protiteles pri testu Labsystem kot v primerjavi s testom Focus. Izjemi sta bila 2 seruma, ko smo pri dokazovanju protiteles IgG s testom Labsystem dobili višje titre kot s testom Focus (preglednica 4).

V četrto skupino smo dali serume, ki so imeli titre protiteles IgG večje od 1:128. Ujemanje rezultatov je bilo v tem primeru 84 %. Zopet smo zaznali višje titre protiteles pri testu Focus.

V preglednici 4 smo primerjali rezultate posameznih titrov protiteles IgG proti bakteriji *C. pneumoniae*. Ujemanje posameznih titrov protiteles IgG je bilo 55 %. Glede na vseh 77 serumov, smo samo pri dveh dobili višje titre protiteles pri testu Labsystem. Pri drugih serumih, ki se niso ujemali pri obeh testih, pa smo višje titre protiteles ugotovili s testom Focus.

Pomembno je tudi poudariti, da smo pri testu Labsystem delali razredčine samo do 1:512, pri testu Focus pa do 1:1024. S tem dopuščamo možnost, da bi lahko bil odstotek ujemanja pri posameznih titrih nekoliko višji.

Preglednica 4: Ujemanje rezultatov dveh testov MIF za dokazovanje protiteles IgG proti bakteriji *C. pneumoniae*.

Titer protiteles IgG (Labsystem)	Titer protiteles IgG (Focus)								Skupno št. serumov
	Neg.	16	32	64	128	256	512	1024	
Neg.	18	2							20
16			4						4
32			5	4	5				14
64				1	5				6
128				2	12	1	2		17
256						2	3		5
512							4	7	11
Skupno št. serumov	18	2	9	7	22	3	9	7	77

(Z zeleno barvo so označeni serumi, ki se razlikujejo za 1 razredčino, z rumeno barvo so označeni serumi, ki se razlikujejo za 2 razredčini, vzorci, ki se ujemajo v posameznih titrih, so napisani krepko. Neg. = negativni serumi).

Od 77 serumov, ki smo jih preiskovali za dokaz protiteles IgG, jih je imelo enak titer z obema testoma 42, pri 28 serumih je prišlo do odstopanja v 1 razredčini, pri 7 vzorcih pa v 2 razredčinah. Ker je test MIF subjektivna metoda, lahko dopustimo možnost odstopanja titrov v 1 razredčini. V tem primeru smo dobili ujemanje testov v 91 %, kar je razmeroma dobra korelacija testov.

4.2 PROTITELESA IgA PROTI BAKTERIJI *Chlamydia pneumoniae*

Titre protiteles IgA proti bakteriji *C. pneumoniae* smo razdelili v 3 skupine, kar prikazuje preglednica 5. V prvo skupino smo uvrstili serume, ki so bili negativni proti *C. pneumoniae*, v drugo skupino smo uvrstili serume, ki so imeli titer protiteles IgA večji ali enak 32 in manjši ali enak 1:64 in v tretjo skupino smo dali serume, ki so imeli titer protiteles večji od 1:64.

Preglednica 5: Rezultati dokazovanja protiteles IgA proti bakteriji *C. pneumoniae* (2 proizvajalcev MIF).

Titer IgA	Test Labsystem	Test Focus	Delež ujemanja
Neg.	39	31	79 %
$\geq 32 \leq 64$	23	26	88 %
> 64	13	18	72 %
Skupno št. serumov	75	75	

(Neg. = negativni serumi)

V prvi skupini, kamor smo uvrstili serume, ki so bili negativni proti *C. pneumoniae*, je ujemanje rezultatov obeh testov 79 %. S testom Labssystem smo dobili več negativnih rezultatov pri dokazovanju protiteles IgA kot s testom Focus. V drugi skupini, kamor smo uvrstili serume s titri protiteles IgA, ki so bili večji ali enaki 1:32 in manjši ali enaki 1:64, je bilo ujemanje rezultatov 88 %.

V tretji skupini, kamor smo dali serume s titri protiteles IgA proti bakteriji *C. pneumoniae* višjimi od 1:64, je odstotek ujemanja rezultatov 72 %. Višji titer protiteles IgA smo dobili pri dokazovanju protiteles IgA s testom Focus (preglednica 6).

Primerjava rezultatov posameznih titrov protiteles IgA je prikazana v preglednici 6. Skupno število preiskanih serumov je 75.

Ujemanje rezultatov obeh testov glede na posamezne titre protiteles IgA proti bakteriji *C. pneumoniae* je 76 %. Višje titre protiteles smo kot sem že omenila dobili s testom Focus.

Preglednica 6: Ujemanje rezultatov dveh testov MIF za dokazovanje protiteles IgA proti bakteriji *C. pneumoniae*.

Titer protiteles IgA (Labssystem)	Titer protiteles IgA (Focus)						Skupno št. serumov
	Neg.	32	64	128	256	512	
Neg.	32	2	5				39
32			1				1
64			17	3	2		21
128					1		1
256					7	4	11
512						1	1
Skupno št. serumov	32	2	23	3	10	5	75

(Z zeleno barvo so označeni serumi, ki se razlikujejo za 1 razredčino, z rumeno barvo so označeni serumi, ki se razlikujejo za 2 razredčini, vzorci, ki se ujemajo v posameznih titrih, so napisani **krepko**. Neg. = negativni serumi; NR = navzkrižna reaktivnost).

Pri dokazovanju protiteles IgA s testom MIF dveh različnih proizvajalcev, je enak titer imelo 57 serumov, pri 11 serumih je prišlo do odstopanja v eni razredčini, pri 7 serumih pa je prišlo do odstopanja v dveh razredčinah. Ujemanje rezultatov obeh testov, če zaradi subjektivnosti testa dopustimo odstopanje titrov v eni razredčini, je 90 %.

4.3 PROTITELESA IgM PROTI BAKTERIJI *Chlamydia pneumoniae*

Rezultate titrov protiteles IgM proti bakteriji *C. pneumoniae* prikazuje preglednica 7. Serume smo razdelili na negativne in pozitivne. Pozitivni serumi so bili serumi, ki so imeli titre večje ali enake 1:8.

Pri negativnih titrih je imel večji delež test Focus in ujemanje rezultatov obeh testov je bilo 77 %. Pri pozitivnih titrih je imel precej večji delež serumov test Labsystem. Test Labsystem je samo pri protitelesih IgM dosegel višji titer protiteles v primerjavi s testom Focus (preglednica 7 in 8). Ujemanje rezultatov pri pozitivnih titrih je bilo 38 %. Omeniti moramo, da smo pri testu Labsystem od 24 pozitivnih serumov, imeli 11 serumov, ki so navzkrižno reagirali z vsemi tremi antigeni in sicer *C. pneumoniae*, *C. trachomatis* in *C. psittaci*.

Preglednica 7: Rezultati dokazovanja protiteles IgM proti bakteriji *C. pneumoniae* (2 proizvajalcev MIF).

Titer IgM	Test Labsystem	Test Focus	Delež ujemanja
Neg.	50	65	77 %
≥ 8	24	9	38 %
Skupno št. serumov	74	74	

(Neg. = negativni serumi)

Primerjava posameznih titrov protiteles IgM proti bakteriji *C. pneumoniae*, je prikazana v preglednici 8. Ujemanje rezultatov obeh testov MIF, Labssystem in Focus, glede na posamezne titre protiteles IgM je bilo 70 %.

Preglednica 8: Ujemanje rezultatov dveh testov MIF za dokazovanje protiteles IgM proti bakteriji *C. pneumoniae*.

Titer protiteles IgM (Labsystem)	Titer protiteles IgM(Focus)			Skupno št. serumov
	Neg.	8	16	
Neg.	47	3		50
8	1			1
16	6		5	12
NR	11			11
Skupno št. serumov	65	8	1	74

(Z zeleno barvo so označeni serumi, ki se razlikujejo za 1 razredčino, z rumeno barvo so označeni serumi, ki se razlikujejo za 5 razredčin, vzorci, ki se ujemajo v posameznih titrih, so napisani krepko. Neg. = negativni serumi; NR = navzkrižna reaktivnost).

Pri dokazovanju protiteles IgM smo dobili višje titre protiteles pri testu Labssystem v primerjavi s testom Focus. Višje titre protiteles smo doslej dokazali samo pri dveh serumih pri protitelesih IgG (preglednica 4), pri protitelesih IgM pa kar pri sedmih serumih.

Pri protitelesih IgM so se rezultati glede na posamezne titre protiteles ujemali pri 52 serumih. Pri 10 serumih je prišlo do odstopanja v 1 razredčini; 1 serum je močno izstopal in sicer je bila razlika v 5 razredčinah. Kakorkoli, pri protitelesih IgM dejansko ni pomemben sam titer protiteles, saj dokazujemo samo navzočnost protiteles IgM, višina titra ne igra nobene vloge.

Zaradi subjektivnosti testa MIF smo dopustili možnost odstopanja 1 razredčine in v tem primeru je bilo ujemanje rezultatov obeh testov 84 %.

V preglednici 9 je povzetek ujemanja dveh testov MIF dveh različnih proizvajalcev glede na posamezne titre protiteles in če dopustimo možnost odstopanja v eni razredčini.

Preglednica 9: Število serumov in delež ujemanja testov Focus in Labssystem glede na posamezne titre protiteles in če dopustimo odstopanje v 1 razredčini.

Protitelesa	Število serumov / delež ujemanja rezultatov obeh testov	
	Št. serumov z enakim titrom protiteles / delež ujemanja	Št. enakih serumov, če dopustimo odstopanje v 1 razredčini / delež ujemanja
IgG	42 / 55 %	70 / 91 %
IgA	57 / 76 %	68 / 90 %
IgM	52 / 70 %	62 / 84 %

(Št. = število)

4.4 ANALIZA NAVZKRIŽNE REAKTIVNOSTI MED *C. pneumoniae*, *C. trachomatis* in *C. psittaci*

Oba testa MIF, Labssystem in Focus, kot antigen vezan na stekelcih, uporabljata prečiščena elementarna telesca treh vrst klamidij. Pri testu Focus je LPS odstranjen pri vseh treh vrstah klamidij, medtem ko pri testu Labssystem LPS ni odstranjen pri *C. psittaci*, kar služi kot kontrola za pozitiven serum proti *C. psittaci* in LPS-u.

Do navzkrižne reaktivnosti večinoma prihaja zaradi protiteles proti antigenu specifičnemu za rod, LPS-u. Zato torej protitelesa proti *C. pneumoniae* reagirajo z antigeni *C. trachomatis* in *C. psittaci*. Če so elementarna telesca dobro obdelana in prečiščena, se možnost pojava navzkrižne reakcije zmanjša.

4.4.1 Titer protiteles IgG proti bakteriji *C. trachomatis* in *C. psittaci*

Pri obeh testih MIF je prišlo do možne navzkrižne reaktivnosti protiteles IgG proti *C. pneumoniae* z antigenoma *C. trachomatis* in *C. psittaci*. Število in delež serumov, pri katerih je prišlo do možne navzkrižne reaktivnosti, prikazuje preglednica 10. Manj navzkrižne reaktivnosti smo opazili pri testu Focus, verjetno zaradi bolj prečiščenih klamidijskih elementarnih telesc, vezanih na stekelcu.

Preglednica 10: Število in delež pozitivnih serumov s titri protiteles IgG ≥ 16 proti bakteriji *C. trachomatis* in *C. psittaci*

Test	Število / delež serumov		
	<i>C. trachomatis</i> IgG ≥ 16	<i>C. psittaci</i> IgG ≥ 16	<i>C. trachomatis</i> in <i>C. psittaci</i> IgG ≥ 16
Labsystem	15 / 19 %	10 / 13 %	10 / 13 %
Focus	10 / 13 %	5 / 6 %	5 / 6 %

Pri testu Labsystem smo dobili večji delež pozitivnih serumov tako proti *C. trachomatis* kot proti *C. psittaci*.

4.4.2 Titer protiteles IgA proti bakteriji *C. trachomatis* in *C. psittaci*

Pri dokazovanju protiteles IgA proti bakteriji *C. pneumoniae*, smo dobili enak delež možne navzkrižne reaktivnosti s testom Focus in testom Labsystem, kar nam prikazuje preglednica 11.

Preglednica 11: Število in delež pozitivnih serumov s titri protiteles IgA ≥ 32 proti bakteriji *C. trachomatis* in *C. psittaci*

Test	Število / delež serumov		
	<i>C. trachomatis</i> IgA \geq 32	<i>C. psittaci</i> IgA \geq 32	<i>C. trachomatis</i> in <i>C. psittaci</i> IgA \geq 32
Labsystem	1 / 1 %	1 / 1 %	1 / 1 %
Focus	2 / 3 %	1 / 1 %	1 / 1 %

Deleža možne navzkrižne reaktivnosti pri dokazovanju protiteles IgA sta bila pri obeh testih MIF zelo nizka.

4.4.3 Titer protiteles IgM proti bakteriji *C. trachomatis* in *C. psittaci*

Rezultate možne navzkrižne reaktivnosti protiteles proti *C. pneumoniae* z bakterijo *C. trachomatis* in *C. psittaci*, prikazuje preglednica 12. Pri dokazovanju protiteles IgM smo dobili 15 % možne navzkrižne reaktivnosti s testom Labsystem, medtem ko s testom Focus ni bilo primera možne navzkrižne reaktivnosti.

Preglednica 12: Število in delež pozitivnih serumov s titri protiteles IgM \geq 8 proti bakteriji *C. trachomatis* in *C. psittaci*

Test	Število / delež serumov		
	<i>C. trachomatis</i> IgM \geq 8	<i>C. psittaci</i> IgM \geq 8	<i>C. trachomatis</i> in <i>C. psittaci</i> IgM \geq 8
Labsystem	11 / 15 %	11 / 15 %	11 / 15 %
Focus	1 / 1 %	0	0

5 DISKUSIJA IN SKLEPI

Bakterija *C. pneumoniae* je pomemben povzročitelj obolenj dihal, kot so pljučnica, faringitis in sinusitis. Laboratorijsko dokazovanje okužb z bakterijo *C. pneumoniae* ni popolnoma dorečeno, saj zaenkrat na razpolago nimamo standardiziranih seroloških diagnostičnih testov za dokaz okužb s to bakterijo.

Test mikroimunofluorescence (MIF) so razvili v 70-letih za dokazovanje okužb s *C. trachomatis* (Wang in Grayston, 1970; Wang in sod., 1975). Prav s tem testom pa so kasneje odkrili *C. pneumoniae* kot novo vrsto klamidij (Saikku in sod., 1985).

S testom MIF merimo titre vrstno-specifičnih protiteles IgG, IgA in IgM proti *C. pneumoniae*, ki so pomembni pokazatelji poteka okužbe.

Serološki test MIF je test, ki nam omogoča identifikacijo bakterije *C. pneumoniae* kot povzročitelja bolezni in test, ki igra glavno vlogo v seroepidemioloških študijah. Test MIF je bil ocenjen kot "zlati standard" v diagnostiki okužb z bakterijo *C. pneumoniae*, pa vendar obstaja nekaj znanstvenikov, ki so podvomili o njegovi občutljivosti in specifičnosti (Kern in sod., 1993; Freidank in sod., 1997; Wong in sod., 1999).

Čeprav test mikroimunofluorescence velja za "zlati standard" v diagnostiki okužb s *C. pneumoniae*, moramo poudariti, da ne poznamo standardiziranega MIF testa. Dowell in sodelavci (2001) so objavili priporočilo, kako naj test izvajamo. Namreč, avtorji različnih študij uporabljajo različno pripravljene teste, zaradi česar nastanejo razlike pri občutljivosti in specifičnosti testa.

Peeling in sod. (2000) so naredili raziskavo, v katero so vključili 13 laboratorijev, kateri so s testom mikroimunofluorescence pregledali 22 serumov 10 pacientov. Ujemanje rezultatov, ki jih je podalo 13 laboratorijev, narejenih z 11 različnimi metodami in rezultati, ki so predstavljali referenčno vrednost, je bilo za protitelesa IgM med 50 in 95 %. Štirje laboratoriji niso uspeli določiti lažno pozitivnih titrov IgM verjetno zaradi revmatoidnega faktorja. Skladnost rezultatov pri protitelesih IgG je bila od 68 do 87 %. Rezultati raziskave nakazujejo na velike razlike pri izvajanju testa MIF med laboratoriji.

V diplomski nalogi smo naredili primerjavo dveh seroloških testov MIF dveh različnih proizvajalcev in sicer Focus, ZDA in LabSystem, Finska.

V Laboratoriju za diagnostiko znotrajceličnih okužb Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani se za določitev okužb s *C. pneumoniae* od leta 1998 uporablja test MIF proizvajalca Focus. Elementarna telesca tega proizvajalca so prečiščena in ne vsebujejo antigena LPS, kar zmanjšuje možnost navzkrižnih reakcij. Ta antigen zaradi njegove čistosti uporabljajo tudi v referenčnem laboratoriju za klamidije v Seattlu. V diplomski nalogi smo ta test vzeli kot referenčen test.

Tudi pri testu LabSystem se kot antigen uporabljajo prečiščena elementarna telesca *C. pneumoniae* in *C. trachomatis*, pri *C. psittaci* pa LPS ni odstranjen.

V eksperimentalnem delu diplomske naloge smo naredili primerjavo rezultatov teh dveh testov, da bi ugotovili, kakšno je bilo ujemanje oz. neujemanje rezultatov obeh testov v določanju okužb s *C. pneumoniae*.

Protitelesa IgG smo glede na titre najprej razdelili v štiri skupine, nato pa smo naredili še primerjavo posameznih titrov protiteles. Ujemanje rezultatov obeh testov po skupinah je bilo od 61 do 90 % (preglednica 3). Najvišji delež ujemanja (90 %) je bil v skupini, kamor smo uvrstili negativne serume proti *C. pneumoniae*. Razmeroma dober delež ujemanja (84 %) smo dobili tudi v skupini, kamor smo uvrstili titre protiteles IgG, ki so bili večji od 1:128, najmanjši delež ujemanja (61 %) pa je bil v skupini, kamor smo dali najnižje pozitivne titre protiteles IgG, ki so bili večji ali enaki 1:16 in manjši ali enaki 1:32. V skupini, kjer smo imeli titre protiteles večje od 1:32 in manjše ali enake 1:128, je bil delež ujemanja 79 %. Najnižji delež ujemanja je bil pri nizkih titrih protiteles IgG. Pri nizkih titrih je lahko bila interpretacija pozitivnega rezultata navzkrižna reaktivnost ali pa je bil rezultat šibko pozitiven in zaradi subjektivne ocene rezultata prihaja do neujemanj.

Ujemanje rezultatov glede na posamezne titre protiteles IgG je bilo 55 % (preglednica 4). Pri vseh serumih, razen pri dveh, kjer je prišlo do neujemanja, smo opazili višji titer protiteles pri testu Focus. V sedmih primerih so bili to titri, ki so bili večji za 2 razredčini, vsi drugi (28) so se razlikovali samo za 1 razredčino. Tudi v dveh primerih, kjer smo višje titre dobili s testom Labssystem, je bila razlika v 1 razredčini. Pomembno je tudi omeniti, da smo serume, ki smo jih testirali s testom Labssystem, redčili samo do razredčine 1:512, v rezultatih pa smo dobili kar 7 serumov, testiranih s testom Focus, ki so imeli titer 1:1024. Nato smo pri titrih protiteles IgG dopustili še možnost odstopanja v 1 razredčini. To pomeni, da smo kot neujemanje vzeli samo tiste vzorce, pri katerih je bila razlika v 2 razredčinah. Možnost odstopanja titrov v 1 razredčini smo si dopustili zaradi subjektivnosti testa MIF. Do razlike v 1 razredčini je lahko prišlo npr. zaradi pipetiranja ali subjektivne ocene pozitivnega rezultata pod mikroskopom. V tem primeru smo dobili ujemanje rezultatov obeh testov v 91 %, kar je predstavljalo razmeroma dobro korelacijo testov.

Naši rezultati so primerljivi z rezultati, ki so jih dobili Messmer in sod. (2001). Naredili so primerjavo testov mikroimunofluorescence proizvajalcev Focus in Labssystem za dokaz protiteles IgG. Glede na posamezne titre protiteles so dobili ujemanje rezultatov obeh

testov v 40 %, serume pa so redčili od 1:2 do 1:4096. Titre protiteles IgG so razdelili tudi v dve skupini in sicer na titre, enake ali manjše od 1:32 in titre, večje od 1:32. Ujemanje rezultatov je bilo 94 %. Zanimivo pa je, da so v nasprotju z našimi rezultati, dobili v povprečju višje titre protiteles IgG s testom Labssystem kakor s testom Focus.

Protitelesa IgA smo razdelili v tri skupine. V prvi skupini, kamor smo uvrstili serume, ki so bili negativni proti *C. pneumoniae*, je ujemanje rezultatov obeh testov 79 % (preglednica 5), v drugi skupini, kamor smo uvrstili titre, ki so bili večji ali enaki 1:32 in manjši ali enaki 1:64, je bilo ujemanje rezultatov 88 %. Nekoliko nižji delež ujemanja rezultatov smo dobili v skupini, kamor smo uvrstili titre protiteles IgA, večje od 1:64 (72 %).

Pri primerjavi posameznih titrov protiteles IgA je bilo ujemanje rezultatov obeh testov 76 % (preglednica 6). Višje titre protiteles smo dokazali s testom Focus. Pri primerjavi rezultatov, ko smo dopustili možnost odstopanja v 1 razredčini, smo dobili ujemanje rezultatov obeh testov 90 %. Od 75 serumov jih je 7 odstopalo v 2 razredčinah, 11 serumov v 1 razredčini, 57 serumov pa je imelo enake titre protiteles IgA. Tako kot pri protitelesih IgG, tudi pri določanju protiteles IgA lahko zaključimo, da smo dobili razmeroma dobro korelacijo testov.

Bennedsen in sod. (2002) so v svoji raziskavi primerjali 3 teste mikroimunofluorescence, proizvajalcev Washington Research Foundation (WRF), Focus in Labssystem. Kot referenčni test so vzeli WRF in ga primerjali posebej s testom Focus in testom Labssystem. Ujemanje rezultatov testov MIF WRF in Focus pri primerjavi protiteles IgA pri bolnikih z akutno okužbo s *C. pneumoniae* je bilo 88 %, ujemanje glede na posamezne titre protiteles IgA pa 75 %. Enak delež ujemanja smo dobili tudi mi. Protiteles IgA s testom Labssystem niso dokazovali. Po njihovem mnenju je ujemanje testov WRF in Focus sprejemljivo.

Protitelesa IgM smo razdelili na pozitivne in negativne titre (preglednica 7). Pozitivne titre so predstavljali titri večji ali enaki 1:8. Ujemanje rezultatov pri negativnih serumih je bilo 77 %, pri pozitivnih pa 38 %. Pri primerjavi posameznih titrov protiteles IgM (preglednica 8) smo dobili ujemanje rezultatov v 70 %. Pri dokazovanju protiteles IgM smo višje titre dobili s testom Labssystem in sicer pri 7 serumih, medtem ko smo pri vseh, razen pri dveh serumih, pri katerih smo dokazovali protitelesa IgG (preglednica 4), višji titer dobili s testom Focus. V primeru, ko smo dopustili odstopanje titrov v 1 razredčini, je bilo

ujemanje rezultatov obeh testov 84 %. Pri protitelesih IgM pravzaprav nivo titrov ni pomemben, ker je pomembna sama navzočnost protiteles IgM. Pri dokazovanju protiteles IgM s testom Labssystem je bil prisoten precejšen delež serumov z možno navzkrižno reaktivnostjo (15 %) v primerjavi s testom Focus (0 %).

Višje titre protiteles IgM s testom Labssystem v primerjavi s testom WRF in Focus, so dokazali tudi Bennedsen in sod. (2002). Po navodilih proizvajalca Labssystem je inkubacijska doba seruma, nanešenega na stekelca s klamidijskimi antigeni, 3 ure. To je 6-krat daljši čas kot ga je priporočil Wang (1971; 2000). Predpostavlja se, da podaljšan čas inkubacije lahko verjetno povzroči višji titer protiteles IgM.

Ujemanje rezultatov za dokaz protiteles IgM kot so jih predstavili Bennedsen in sod. (2002), je bilo med 87 in 100 % in sicer WRF v primerjavi s testom Labssystem in WRF v primerjavi s testom Focus. Delež ujemanja rezultatov je bil nekoliko višji kot naš (84 %). Pri nas smo nižji delež ujemanja rezultatov pripisali navzkrižni reaktivnosti. Tudi Bennedsen in sod. (2002) so v raziskavi dokazali pri protitelesih IgM več navzkrižne reaktivnosti pri testu Labssystem kot pri testu Focus.

Pri dokazovanju protiteles IgG proti *C. pneumoniae* je pri obeh testih, Focus in Labssystem, prišlo do možne navzkrižne reaktivnosti z antigenoma *C. trachomatis* in *C. psittaci*. Pri testu Labssystem je bil delež navzkrižne reaktivnosti višji kot pri testu Focus. Z antigenoma *C. trachomatis* in *C. psittaci* je reagiralo 13 % serumov pri dokazovanju protiteles IgG s testom Labssystem (preglednica 10), medtem ko je pri dokazovanju protiteles IgG s testom Focus navzkrižno reagiralo 6 % vzorcev. Messmer in sod. (2001) so v raziskavi dobili še višji delež navzkrižne reaktivnosti s *C. trachomatis* in *C. psittaci* pri dokazovanju protiteles IgG. In sicer pri testu Focus 9 %, pri testu Labssystem pa kar 28 %.

Delež serumov, ki so imeli pozitivne titre protiteles samo proti *C. pneumoniae* in *C. trachomatis* je bil pri testu Labssystem 19 %, pri testu Focus pa 13 %. Delež serumov, ki so imeli pozitivne titre protiteles samo proti *C. pneumoniae* in *C. psittaci* je bil pri testu Labssystem 13 %, pri testu Focus pa 6 %. Messmer in sod. (2001) so zopet dobili višje deleže. Približno 38.7 % serumov je imelo pozitivne titre protiteles proti *C. pneumoniae* in *C. trachomatis* s testom Focus in 48.4 % s testom Labssystem. Delež serumov, ki so imeli pozitivne titre protiteles proti *C. pneumoniae* in *C. psittaci* je bil pri testu Labssystem 61.3 %, pri testu Focus pa 14.5 %. Razlika v odstotkih je velika verjetno zaradi tega, ker pri

testu Labssystem pri bakteriji *C. psittaci* LPS ni odstranjen. Pri naših rezultatih razlika v deležih ni tako velika. Mogoče nismo imeli toliko serumov bolnikov, ki bi dejansko imeli protitelesa proti *C. psittaci*.

Pri dokazovanju protiteles IgA je bil delež serumov, ki so navzkrižno reagirali z antigenoma *C. trachomatis* in *C. psittaci* dejansko zanemarljiv pri obeh testih. Delež je bil enak pri obeh testih in sicer samo 1 %.

Pri dokazovanju protiteles IgM s testom Labssystem, je do možne navzkrižne reaktivnosti z antigenoma *C. trachomatis* in *C. psittaci* prišlo pri 15 % serumov, s testom Focus pa navzkrižne reaktivnosti sploh nismo dobili.

Bennedsen in sod. (2002) so pri dokazovanju protiteles IgM možno navzkrižno reaktivnost s testom Labssystem dobili pri 36 % serumov, s testom Focus pa pri 28 % vzorcev. V primerjavi z našimi rezultati so dobili precej višji delež navzkrižne reaktivnosti. Predpostavljamo lahko, da so mogoče lahko imeli več pacientov, ki so dejansko imeli protitelesa proti *C. trachomatis* in *C. psittaci*, lahko pa je razlika tudi zaradi subjektivnosti testa.

Razlika v testih MIF je med drugim tudi v prečiščenosti elementarnih telesc, ki so vezana na stekelca kot antigen. Bolje obdelana in prečiščena elementarna telesa zmanjšajo možnost pojava navzkrižnih reakcij. V večini primerov pride do navzkrižne reakcije zaradi protiteles proti LPS-u kot glavnemu za rod specifičnemu antigenu. Mi smo večji delež navzkrižnih reakcij dobili s testom Labssystem, kar je nakazovalo na to, da je imel test Focus boljše obdelana in prečiščena elementarna telesa kot antigen vseh treh vrst klamidij.

V diplomski nalogi smo dokazali zelo dobro ujemanje testov MIF proizvajalcev Focus in Labssystem. Pri protitelesih IgG in IgA je bilo ujemanje rezultatov obeh testov skoraj enako (91 % in 90 %), pri protitelesih IgM nekoliko manj (84 %). V primerjavi z ostalimi raziskavami, ki so primerjali teste MIF, so naši rezultati primerljivi. Manjše razlike v rezultatih med laboratoriji se pojavljajo tudi zaradi samega osebja, ki mikroskopira preparate. Test MIF je vsekakor subjektivna metoda.

Do razlik v rezultatih pri testu MIF prihaja, ker test ni standardiziran. Različni laboratoriji uporabljajo različne teste z različnimi reagenti, različnimi sevi *C. pneumoniae* kot antigen, različni čas inkubacije seruma z antigenom in različna proti človeška protitelesa, označena s FITC različnih proizvajalcev. Izvajanje testa zahteva izkušeno laboratorijsko osebje, saj je interpretacija rezultatov zelo subjektivna. Zaradi vseh teh razlik so Dowell in sod. (2001) objavili priporočilo, kako naj test MIF izvajamo. Zelo pomembno je vzeti parna seruma, da lahko spremljamo odziv protiteles in postavimo pravilno diagnozo o morebitni okužbi s *C. pneumoniae*. Če test izvajamo pravilno, sta njegovi občutljivost in specifičnost zelo visoki in ostaja "zlati standard" v diagnostiki okužb z bakterijo *C. pneumoniae* navkljub molekularnim metodam.

Sklepi:

- ➔ Oba testa MIF, proizvajalcev Focus in Labssystem, sta primerna za dokazovanje protiteles IgG, IgA in IgM proti bakteriji *Chlamydia pneumoniae*.
- ➔ Dokazali smo visoko ujemanje rezultatov, dobljenih z reagenti obeh proizvajalcev (za protitelesa IgG 91 %, za protitelesa IgA 90 %, za protitelesa IgM 84 %).
- ➔ Delež serumov, ki so navzkrižno reagirali, je bil višji pri testu Labssystem.
- ➔ Naši rezultati so primerljivi z rezultati drugih raziskav o primerjavi testov mikroimunofluorescence.

6 POVZETEK

Bakterija *Chlamydia pneumoniae* je po Gramu negativna, obvezna znotrajcelična bakterija, ki je pomemben povzročitelj respiratornih obolenj, kot so pljučnica, faringitis in sinusitis. Infekcije s *C. pneumoniae* se pojavljajo vse leto, pa vendar so raziskovalci zaznali obdobja epidemij in endemij. Obdobju dveh do treh let z visoko stopnjo incidence sledi obdobje štirih do petih let z nizko stopnjo incidence. Bakterija *C. pneumoniae* povzroča približno 10 – 15 % doma pridobljenih pljučnic. Zdravljenje z antibiotiki je dolgotrajno zaradi možnega pojava perzistentne okužbe. Humoralni imunski odziv, ki ga sproži okužba s *C. pneumoniae*, se razlikuje pri primarni infekciji in pri reinfekciji. Pri primarni okužbi je imunski odziv zakasnen. Protitelesa IgM in IgA nastanejo 2 do 3 tedne po nastopu bolezni, protitelesa IgG pa šele 6 do 8 tednov po nastopu bolezni. Pri reinfekcijah je

protitelesni imunski odziv hitrejši. Protitelesa IgG nastanejo že po 1 do 2 tednih in v serumu jih dokažemo v titru 1:512. Protiteles IgM navadno ni.

"Zlati standard" v laboratorijski diagnostiki okužb s *C. pneumoniae* je serološki test mikroimunofluorescenca. S tem testom določamo vrstno-specifična protitelesa, ki so usmerjena proti beljakovinom zunanje membrane. Dokazujemo torej protitelesa IgG, IgA in IgM. Za merilo akutne okužbe s *C. pneumoniae* velja 4-kratni porast titra protiteles IgG ali titer protiteles IgM, večji ali enak 1:16. Zaradi značilnega poteka okužbe s *C. pneumoniae* je zelo pomembno, da pacientu odvzamemo parna seruma, odvzeta v razmiku 4 do 8 tednov.

V diplomski nalogi smo naredili primerjavo dveh seroloških testov MIF dveh različnih proizvajalcev in sicer Focus, ZDA in LabSystem, Finska. Primerjali smo rezultate obeh testov po titrih protiteles IgG, IgA in IgM. Oba testa kot antigen uporabljata prečiščena elementarna telesca *C. pneumoniae*, *C. trachomatis* in *C. psittaci*. Pri testu LabSystem je LPS odstranjen pri *C. pneumoniae* in *C. trachomatis*, pri *C. psittaci* pa ni odstranjen.

Ujemanje rezultatov obeh testov glede na posamezne skupine titrov protiteles IgG je od 76 do 90 %. Ujemanje rezultatov obeh testov raste s titri protiteles. Pri manjših titrih je manjše ujemanje, pri večjih titrih je večje ujemanje. Visoko ujemanje je tudi pri negativnih serumih. Ujemanje glede na posamezne titre protiteles IgG je 55 %, če pa dopustimo odstopanje titrov v 1 razredčini, je ujemanje rezultatov obeh testov MIF 91 %.

Pri protitelesih IgA je ujemanje rezultatov obeh testov po skupinah titrov od 72 do 88 %. Glede na posamezne titre protiteles je ujemanje rezultatov 76 %. Ujemanje rezultatov testov, če dopustimo možnost odstopanja titrov v 1 razredčini, je 90 %.

Ujemanje rezultatov testov glede na posamezne titre protiteles IgM je 70 %. Pri protitelesih IgM smo opazili višje titre protiteles dokazane s testom LabSystem, medtem, ko smo višje titre protiteles IgG in IgA dokazali s testom Focus. Z dopustitvijo odstopanja 1 razredčine, je ujemanje rezultatov za dokaz protiteles IgM 84 %.

Pri dokazovanju protiteles IgG, IgA in IgM proti *C. pneumoniae* smo pri obeh testih opazili navzkrižno reaktivnost z antigenoma *C. trachomatis* in *C. psittaci*. Višji odstotek navzkrižne reaktivnosti smo dokazali pri dokazovanju protiteles IgG in IgM s testom LabSystem, pri dokazovanju protiteles IgA pa je odstotek navzkrižne reaktivnosti praktično zanemarljiv.

V diplomski nalogi smo dokazali zelo dobro ujemanje rezultatov obeh testov mikroimunofluorescence, proizvajalcev Focus in Labssystem. Pri protitelesih IgG in IgA je ujemanje rezultatov obeh testov skoraj enako (91% in 90 %), pri protitelesih IgM pa je delež ujemanja 84 %. Za dokazovanje protiteles IgG, IgA in IgM sta primerna oba testa. Več navzkrižne reaktivnosti smo verjetno zaradi slabše prečiščenih elementarnih telesc klamidij dobili pri dokazovanju protiteles s testom Labssystem.

7 VIRI

Allegra L., Blasi F., Centanni S., Cosentini, R., Denti F., Raccanelli R., Tarsia P., Valenti V. 1994. Acute exacerbations of asthma in adults: role of *Chlamydia pneumoniae* infection. *European Respiratory Journal*, 7: 2165 - 2168.

Balin B. J., Gerard H. C., Arking E. J., Appelt D. M., Branigan P. J., Abrams J. T., Whittum-Hudson J. A., Hudson A. P. 1998. Identification and localization of *Chlamydia pneumoniae* in the Alzheimer's brain. *Medical Microbiology and Immunology*, 187: 23–42.

Beatty W.L., Morrison R.P., Bryne G.I. 1994. Persistent *Chlamydiae*: from cell culture to a paradigm for *Chlamydial* pathogenesis. *Microbiological Reviews*, 58, 4: 686-699.

Bennedsen M., Berthelsen L., Lind I. 2002. Performance of three microimmunofluorescence assays for detection of *Chlamydia pneumoniae* immunoglobulin M, G and A antibodies. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 9: 833-839.

Birkelund S., Christiansen G., Vandahl B., Pedersen A.S.H. 2002. Are the Pmp proteins parallel beta-helices? V: Proceedings of the Tenth International Symposium on Human Chlamydial Infection. Schachter J., Christiansen G., Clarke I. N., Hammerschlag M. R., Kaltenboeck B., Kuo C.C., Rank R. G., Ridgway G. L., Saikku P., Stamm W. E., Stephens R. S., Summersgill J. T., Timms P., Wyrick P. B. (eds.). Antalya, June 21-23. 2002. Basim Yeri: 551-554.

Birkelund S., Lundemose A.G., Christiansen G. 1989. Immunoelectron microscopy of lipopolysaccharide in *Chlamydia trachomatis*. *Infection and Immunity*, 57, 10: 3250-3253.

Blasi F., Legnani D., Lombardo V. M., Negretto G. G., Magliano E., Pozzoli R., Chiodo F., Fasoli A., Allegra L. 1993. *Chlamydia pneumoniae* infection in acute exacerbations of COPD. *European Respiratory Journal*, 6: 19-22.

Boman J., Allard A., Persson K., Lundborg M, Juto P., Wadell G. 1997. Rapid diagnosis of respiratory *Chlamydia pneumoniae* infection by nested touchdown polymerase chain reaction compared with culture and antigen detection by EIA. *Journal of Infectious Diseases*, 175: 1523-1526.

Boman J., Soderberg S., Forsberg J., Birgander L.S., Allard A., Persson K., Jidell E., Kumlin U., Juto P., Waldenstrom A., Wadell G. 1998. High prevalence of *Chlamydia pneumoniae* DNA in peripheral blood mononuclear cells in patients with cardiovascular disease and in middle-age blood donors. *Journal of Infectious Diseases*, 178: 274-277.

Brade H. 1999. *Chlamydial* lipopolysaccharide. V: Endotoxin in health and disease. Brade H., Opal S. M., Vogel S. N., Morrison D. C. (eds.). Basel, Marcel Dekker: 229–242.

Brade H., Brade L., Nano F.E. 1987. Chemical and serological investigations on the genus-specific lipopolysaccharide epitope of *Chlamydia*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 84: 2508- 2512.

Braun J., Laitko S., Treharne J., Eggens U., Wu P., Distler A., Sieper J. 1994. *Chlamydia pneumoniae*-a new causative agent of reactive arthritis and undifferentiated oligoarthritis. Annals of the Rheumatic Diseases, 53: 100-105.

Brown W.J., Rockey D.D. 2000. Identification of an antigen localized to an apparent septum within dividing chlamydiae. Infection and Immunity, 68, 2:708-15.

Brunham R.C., Peeling R.W. 1994. *Chlamydia trachomatis* antigens: role in immunity and pathogenesis. Infectious Agents and Diseases, 3: 218–233.

Brunham R.C. 1999. Human immunity. V: *Chlamydia*: Intracellular biology, pathogenesis and immunity. Stephens R.S. (ed.). Washington, ASM Press: 211-238.

Byrne G.I., Moulder J.W. 1978. Parasite-specified phagocytosis of *Chlamydia psittaci* and *Chlamydia trachomatis* by L and HeLa cells. Infection and Immunity, 19: 598-606.

Byrne G.I. 1998. V: Chlamydial Infections. Stephens R.S., Byrne G.I., Christensen G., Clarke I.N., Grayston J.T., Rank R.G., Ridgway G.L., Saikku P., Schachter J. and Stamm W. E. (eds.). San Francisco, June 1998. University of California: 365-374.

Byrne G.I., Ouellette S.P., Wang Z., Rao J.P., Lu L., Beatty W.L., Hudson A.P. 2001. *Chlamydia pneumoniae* express genes required for DNA replication but not cytokinesis during persistent infection of HEp-2 cells. Infection and Immunity, 69: 5423-5429.

Caldwell H.D., Kromhout J., Schachter J. 1981. Purification and partial characterization of the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis*. Infection and Immunity, 31: 1161-1176.

Campbell L.A., Kuo C.C., Wang S.P., Grayston J.T. 1990. Serological response to *Chlamydia pneumoniae* infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 28: 1261-1264.

Campbell L.A., Melgosa M.P., Hamilton D.J., Kuo C.C., Grayston J.T. 1992. Detection of *Chlamydia pneumoniae* by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 30: 434-9.

Christiansen G., Boesen T., Hjerno K., Daugaard L., Mygind P., Madsen A.S., Knudsen K., Falk E., Birkelund S. 1999. Molecular biology of *Chlamydia pneumoniae* surface proteins and their role in immunopathogenesis. *American Heart Journal*, 138; S491-S495.

Cles L.D., Stamm W.E. 1990. Use of HL cells for improved isolation and passage of *Chlamydia pneumoniae*. *Journal of Clinical Microbiology*, 28: 938-940.

Cook P. J., Davies P., Tunnicliffe W., Ayres J. G., Honeybourne D., Wise R. 1998. *Chlamydia pneumoniae* and asthma. *Thorax*, 53: 254 - 259.

Coombes B.K., Mahoney J.B. 2002. Identification of MEK- and -phosphoinositide 3-kinase-dependent signalling as essential events during *Chlamydia pneumoniae* invasion of HEp2 cells. *Cellular Microbiology*, 4: 447-460.

Cunningham A. F., Johnston S. L., Julious S. A., Lampe F. C., Ward M. E. 1998. Chronic *Chlamydia pneumoniae* infection and asthma exacerbation in children. *European Respiratory Journal*, 11: 345 - 349.

Debattista J., Timms P., Allan J. 2003. Immunopathogenesis of *Chlamydia trachomatis* infections in women. *Fertility and Sterility*, 79: 1273-1287.

Dowell S.C., Peeling R.W., Boman J., Carlone G.M., Fields B.S., Guarner J., Hammerschlag M.R., Jackson L.A., Kuo C.C., Maass M., Messmer T.O., Talkington D.F., Tondella M.L., Zaki S.R. 2001. Standardizing *Chlamydia pneumoniae* assays: Recommendations from the Centers for Disease Control and Prevention (USA) and the

Laboratory Centre for Disease Control (Canada). *Clinical Infectious Diseases*, 33: 492-503.

Erntell M., Ljunggren K., Gadd T., Persson K. 1989. Erythema nodosum—a manifestation of *Chlamydia pneumoniae* (strain TWAR) infection. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 21: 693-696.

Essig A., Simnacher U., Susa M., Marre R. 1999. Analysis of the humoral immune response to *Chlamydia pneumoniae* by immunoblotting and immunoprecipitation. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 6: 819-825.

Everett K.D.E., Bush R.M., Anderson A.A. 1999. 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 identification of organisms. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49: 425-440.

Fan P., Dong F., Huang Y., Zhong G. 2002. *Chlamydia pneumoniae* secretion of a protease-like activity factor for degrading host cell transcription factors required for (correction of factors is required for) major histocompatibility complex antigen expression. *Infection and Immunity*, 70: 345-349.

Freidank H.M., Herr A.S., Jacobs E. 1993. Identification of *Chlamydia pneumoniae*-specific protein antigens in immunoblots. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 12: 947-951.

Freidank H.M., Vogele H., Eckert K. 1997. Evaluation of a new commercial microimmunofluorescence test for detection of antibodies to *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydia psittaci*. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 16: 685-688.

Freytmuth F., Vabret A., Brouard J., Toutain F., Verdon R., Petitjean J., Gouarin S., Duhamel J.F., Guillois B. 1999. Detection of viral, *Chlamydia pneumoniae* and

Mycoplasma pneumoniae infections in exacerbation of asthma in children. *Journal of Clinical Virology*, 13: 131 - 139.

Fryer R.H., Schwobe E.P., Woods M.L., Rodgers G.M. 1997. *Chlamydia* species infect human vascular endothelial cells and induce procoagulant activity. *Journal of Investigative Medicine*, 45: 168-174.

Fukushi H., Hirai K. 1992. Proposal of *Chlamydia pecorum* sp.nov. for *Chlamydia* strains derived from ruminants. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 42,2: 306-308.

Fukushi H., Hirai K. 1993. *Chlamydia pecorum* – the fourth species of genus *Chlamydia*. *Microbiology and Immunology*, 37: 515-22.

Gaydos C.A., Quinn T.C., Eiden J.J. 1992. Identification of *Chlamydia pneumoniae* by DNA amplification of the 16S rRNA gene. *Journal of Clinical Microbiology*, 30: 796-800.

Gaydos C.A., Summersgill J.T., Sahney N.N., Ramirez J.A., Quinn T.C. 1996. Replication of *Chlamydia pneumoniae* in vitro in human macrophages, endothelial cells, and aortic artery smooth muscle cells. *Infection and Immunity*, 64: 1614-1620.

Grayston J.T., C.C. Kuo, S.P. Wang, Altman J. 1986. A new *Chlamydia psittaci* strain, TWAR, isolated in acute respiratory tract infection. *New England Journal of Medicine*, 315: 161-168.

Grayston J.T., Kuo C.C., Campbell L.A., Wang S.P. 1989. *Chlamydia pneumoniae* sp. nov. for *Chlamydia* spp. strain TWAR. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 39: 88-90.

Grayston J.T., Kuo C.C., Coulson A.S., Campbell L.A., Lawrence R.D., Lee M.J., Strandness E.D., Wang S.P. 1995. *Chlamydia pneumoniae* (TWAR) in atherosclerosis of the carotid artery. *Circulation*, 92: 3397-3400.

Grimwood J., Stephens R.S. 1999. Computational analysis of the polymorphic membrane protein superfamily of *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydia pneumoniae*. *Microbial and Comparative Genomics*, 4,3: 187-201.

Grimwood J., Olinger L., Stephens R.S. 2001. Expression of *Chlamydia pneumoniae* polymorphic membrane protein family genes. *Infection and Immunity*, 69: 2383-2389.

Gronhagen-Riska C., Saikku P., Riska H., Froseth B., Grayston J.T. 1988. Antibodies to TWAR-a novel type of Chlamydia-in sarcoidosis. V: *Sarcoidosis and other granulomatous disorders*. C. Grassi, G. Rizzato, E. Pozzi (eds.). Amsterdam, Excerpta Medica: 297-301.

Hahn D. L., Anttila T., Saikku P. 1996. Association of *Chlamydia pneumoniae* IgA antibodies with recently symptomatic asthma. *Epidemiology and Infection*, 117: 513 - 517.

Hahn D. L., Dodge R.W., Golubnjatnikov R. 1991. Association of *Chlamydia pneumoniae* (strain TWAR) infection with wheezing, asthmatic bronchitis, and adult-onset asthma. *Journal of the American Medical Association*, 266: 225-230.

Halberstadter L., von Prowazek S. 1907a. Zur Aetiologie des Trachoma. *Deutsche Medizinische Wochenschrift*, 33: 1285-1287.

Halberstadter L., von Prowazek S. 1907b. Uber Zelleinschlusse Parasitarer Natur beim Trachom. *Arb. Gesundh (Berlin)*, 26: 44-47.

Halme S., Latvala J., Karttunen R., Palatsi I., Saikku P., Surcel H.M. 2000. Cell-mediated immune response during primary *Chlamydia pneumoniae* infection. *Infection and Immunity*, 68: 7156-7158.

Haranaga S., Yamaguchi H., Friedman H., Izumi S., Yamamoto Y. 2001. *Chlamydia pneumoniae* infects and multiplies in lymphocytes in vitro. *Infection and Immunity*, 69: 7753-7759.

Haranaga S., Ikejima H., Yamaguchi H., Friedman H., Yamamoto Y. 2002. Analysis of *Chlamydia pneumoniae* growth in cells by reverse transcription-PCR targeted to bacterial gene transcripts. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 9: 313–319.

Hashigucci K., Ogawa H., Suzuki T., Kauyama Y. 1992. Isolation of *Chlamydia pneumoniae* from the maxillary sinus of a patient with purulent sinusitis. *Clinical Infectious Diseases*, 15: 570-571.

Hatch T. P. 1999. Developmental biology. V: *Chlamydia* : intracellular biology, pathogenesis, and immunity. Stephens, R. S. (ed). Washington, ASM: 29-67.

Henderson I.R., Lam A.C. 2001. Polymorphic proteins of *Chlamydia* spp.-autotransporters beyond the Proteobacteria. *Trends in Microbiology*, 9,12: 573-578.

Hsu S.M., Raine L., Fanger H.A. 1981. A comparative study of the peroxidase-antiperoxidase method and an avidin-biotin complex method for studying polypeptide hormones with radioimmunoassay antibodies. *American Journal of Clinical Pathology*, 75: 734-738.

Ihan A., Kotnik V. 2002. Prirojena imunost. Imunski odziv in mikrobi. V: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 89-94.

Ihan A. 2002. Pridobljena (specifična) imunost. Uravnavanje imunskega odziva. V: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 105-122.

Iijima Y., Miyashita N., Kishimoto T., Kanamoto Y., Soejima R., Matsumoto A. 1994. Characterization of *Chlamydia pneumoniae* species-specific proteins immunodominant in humans. *Journal of Clinical Microbiology*, 32: 583-588.

Kalman S., Mitchell W., Marathe R., Lammel C., Fan J., Hyman R.W., Olinger L., Grimwood J., Davis R.W., Stephens R.S. 1999. Comparative genomes of *Chlamydia pneumoniae* and *C. trachomatis*. *Nature Genetics*, 21: 385-389.

Kaukoranta-Tolvanen S.S., Laitinen K., Saikku P., Leinonen M. 1994. *Chlamydia pneumoniae* multiplies in human endothelial cells in vitro. *Microbial Pathogenesis*, 16: 313-319.

Kawa D.E., Stephens R.S. 2002. Antigenic topology of Chlamydial PorB protein and identification of targets for immune neutralization of infectivity. *Journal of Immunology*, 168: 5184-5191.

Kern D.G., Neill M.A., Schachter J. 1993. A seroepidemiologic study of *Chlamydia pneumoniae* in Rhode Island. *Chest*, 104: 208-213.

Keše D., Hren-Vencelj H., Sočan M., Beovič B., Čižman M. 1994. Prevalence of antibodies to *Chlamydia pneumoniae* in Slovenia. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 13,6: 523-525.

Keše D., Marin J., Čižman M. 2001. *Chlamydia pneumoniae* – prevalenca protiteles pri zdravi populaciji in bolnikih z doma pridobljeno pljučnico. *Zdravstveni vestnik*, 70: 329-333.

Keše D. 2002. Klamidije. V: *Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo*. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 321-328.

Keše D., Čižman M., Marin J., Zupanc T.A. 2002. *Chlamydia pneumoniae* infections in patients with community-acquired pneumonia in Slovenia. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 34,3: 172-6.

Knudsen K., Madsen A.S., Mygind P., Christiansen G., Birkelund S. 1999. Identification of two novel genes encoding 97- to 99-kilodalton outer membrane proteins of *Chlamydia pneumoniae*. *Infection and Immunity*, 67: 375-383.

Kubo A., Stephens R. S. 2000. Characterization and functional analysis of PorB, a *Chlamydia* porin and neutralizing target. *Molecular Microbiology*, 38: 772-776.

Kubo A., Stephens R. S. 2001. Substrat-specific diffusion of select dicarboxylates through *Chlamydia trachomatis* Por B. *Microbiology*, 147: 3135 - 3140.

Kuo C.C., Chen H.H., Wang S.P., Grayston J.T. 1986. Identification of a new group of *Chlamydia psittaci* strains called TWAR. *Journal of Clinical Microbiology*, 24: 1034-1037.

Kuo C.C., Shor A., Campbell L.A., Fukushi H., Patton D.L., Grayston J.T. 1993. Demonstration of *Chlamydia pneumoniae* in atherosclerotic lesions of coronary arteries. *Journal of Infectious Diseases*, 167: 841-849.

Kuo C.C., Jackson L.A., Campbell L.A., Grayston J.T. 1995. *Chlamydia pneumoniae* (TWAR). *Clinical Microbiology Reviews*, 8: 451-461.

Kuo C.C., Campbell L. 2000. Detection of *Chlamydia pneumoniae* in arterial tissues. *Journal of Infectious Diseases*, 181, Suppl 3: S432-S436.

Kutlin A., Flegg C., Stenzel D., Reznik T., Roblin P. M., Mathews S., Timms P., Hammerschlag M.R. 2001. Ultrastructural study of *Chlamydia pneumoniae* in a continuous-infection model. *Journal of Clinical Microbiology*, 39: 3721-3723.

Larsen F. O., Norm S., Mordhorst C. H., Skov P. S., Milman N., Clementsen P. 1998. *Chlamydia pneumoniae* and possible relationship to asthma. Serum immunoglobulins and histamine release in patients and controls. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica*, 106: 928 - 934.

Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J. 2000. Brock biology of microorganisms. 9th ed. New Jersey, Prentice Hall: 804-812.

Magee D.M., Williams D., Smith J., Bleiker C., Grubbs B., Schachter J., Rank R. 1995. Role of CD8 T cells in primary chlamydia infection. *Infection and Immunity*, 63: 512-515.

Mahony J.B. 2002. Chlamydiae host cell interaction revealed using DNA microarrays. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 975: 192-201.

Mahony J.B., Johnson D., Coombes B., Song X. 2002. Expression of a novel protein kinase gene (Cpn0148) during the replication cycle of *Chlamydia pneumoniae*. V: Proceedings of the Tenth International Symposium on Human Chlamydial Infection. Schachter J., Christiansen G., Clarke I. N., Hammerschlag M. R., Kaltenboeck B., Kuo C.C., Rank R. G., Ridgway G. L., Saikku P., Stamm W. E., Stephens R. S., Summersgill J. T., Timms P., Wyrick P. B. (eds.). Antalya, June 21-23. 2002. Basim Yeri: 559-562.

Mathews S., George C., Flegg C., Stenzel D., Timms P. 2001. Differential expression of ompA, ompB, pyk, nlpD and Cpn0585 genes between normal and interferon- γ treated cultures of *Chlamydia pneumoniae*. *Microbial Pathogenesis*, 30: 337-345.

Melgosa M.P., Kuo C.C., Campbell L.A. 1991. Sequence analyses of the major outer membrane protein gene of *Chlamydia pneumoniae*. *Infection and Immunity*, 2195-2199.

Messmer T.O., Martinez J., Hassouna F., Zell E.R., Harris W., Dowell S., Carlone G.M. 2001. Comparison of two commercial microimmunofluorescence kits and an enzyme immunoassay kit for detection of serum immunoglobulin G antibodies to *Chlamydia pneumoniae*. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 8: 588-592.

Mims C. A. 1990. The pathogenesis of infectious disease, 3rd ed., Oxford, Academic Press: 84-87.

Moore T., Ananaba G.A., Bolier J., Bowers S., Belay T., Eko F.O., Igietseme J.U. 2002. Fc receptor regulation of protective immunity against *Chlamydia trachomatis*. *Immunology*, 105: 213-221.

Morrison S. G., Morrison R. P. 2001. Resolution of secondary *Chlamydia trachomatis* genital tract infection in immune mice with depletion of both CD4+ and CD8+ T cells. *Infection and Immunity*, 69: 2643-2649.

Morrison S. G., Su H., Caldwell H. D., Morrison R. P. 2000. Immunity to murine *Chlamydia trachomatis* genital tract reinfection involves B cells and CD4+ T cells but not CD8+ cells. *Infection and Immunity*, 68: 6979-6987.

Moulder J. W. 1991. Interaction of chlamydiae and host cells in vitro. *Microbiological Reviews*, 55: 143-190.

Moulder J.W. 1993. Why is *Chlamydia* sensitive to penicillin in the absence of peptidoglycan? *Infectious Agents and Diseases*, 2: 87-99.

Mygind P., Christiansen G., Persson K., Birkelund S. 1998. Analysis of the humoral immune response to *Chlamydia* outer membrane protein 2. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 5: 313-318.

Naidu B.R., Ngeow Y.F., Kannan P., Jeyamalar R., Khir A., Khoo K.L., Pang T. 1997. Evidence of *Chlamydia pneumoniae* infection obtained by the polymerase chain reaction (PCR) in patients with acute myocardial infarction and coronary heart disease. *Journal of Infectious Diseases*, 35: 199-200.

Ogawa H., Hashigucci K., Kazuyama Y. 1992. Recovery of *Chlamydia pneumoniae* in six patients with otitis media and effusion. *Journal of Laryngology and Otology*, 106: 490-492.

Page L. A. 1966. Revision of the family *Chlamydiaceae* Rake (*Rickettsiales*): unification of the psittacosis-lymphogranuloma venereum-trachoma group of organisms in the genus

Chlamydia Jones Rake and Stearns, 1945. International Journal of Systematic Bacteriology, 16: 223-252.

Page L. A. 1968. Proposal for the recognition of two species in the genus *Chlamydia* Jones, Rake, and Stearns, 1945. International Journal of Systematic Bacteriology, 18: 51-66.

Pantoja L. G., Miller R. D., Ramirez J. A., Molestina R. E., Summersgill J. T. 2001. Characterization of *Chlamydia pneumoniae* persistence in HEp-2 cells treated with gamma interferon. Infection and Immunity, 69: 7927–7932.

Peeling R.W., Brunham R.C. 1996. Chlamydia as pathogens: new species and new issues. Emerging Infectious Diseases, 2: 307-19.

Peeling R.W., Wang S.P., Grayston J.T., Blasi F., Boman J., Clad A., Freidank H., Gaydos C.A., Gnarp J., Hagiwara T., Jones R.B., Orfila J., Persson K., Puolakkainen M., Saikku P., Schachter J. 2000. *Chlamydia pneumoniae* serology: interlaboratory variation in microimmunofluorescence assay results. Journal of Infectious Diseases, 181, Suppl. 3: S426-S429.

Penttilä J.M., Anttila M., Varkila K, Puolakkainen M., Sarvas M., Makela P. H., Rautonen N. 1999. Depletion of CD8+ cells abolishes memory in acquired immunity against *Chlamydia pneumoniae* in BALB/c mice. Immunology, 97: 490-495.

Puolakkainen M., Parker J., Kuo C.C., Grayston J.T., Campbell, L.A. 1995. Further characterization of *Chlamydia pneumoniae* specific monoclonal antibodies. Microbiology and Immunology, 39: 551-554.

Quinn T.C. 1998. Does *Chlamydia pneumoniae* cause coronary heart disease? Current Opinion in Infectious Diseases, 11: 301-307.

Rank R. G. 1999. Models of immunity. V: *Chlamydia: intracellular biology, pathogenesis and immunity*. Stephens R. S. (ed.). Washington, ASM: 239–295.

Read T.D., Brunham R.C., Shen C., Gill S.R., Heidelberg J.F., White O., Hickey E.K., Peterson J., Utterback T., Berry K., Bass S., Linher K., Weidman J., Khouri H., Craven B., Bowman C., Dodson R., Gwinn M., Nelson W., DeBoy R., Kolonay J., McClarty G., Salzberg S.L., Eisen J., Fraser C.M. 2000. Genome sequences of *Chlamydia trachomatis* MoPn and *Chlamydia pneumoniae* AR39. *Nucleic Acids Research*, 28: 1397-1406.

Rockey D.D., Lenart J., Stephens R.S. 2000. Genome sequencing and our understanding of chlamydiae. *Infection and Immunity*, 68: 5473-5479.

Ross R. 1999. Atherosclerosis - an inflammatory disease. *New England Journal of Medicine*, 340: 115-126.

Rottenberg M.E., Gigliotti Rothfuchs A.C., Gigliotti D., Svanholm C., Bandholtz L., Wigzell H. 1999. Role of innate and adaptive immunity in the outcome of primary infection with *Chlamydia pneumoniae*, as analyzed in genetically modified mice. *Journal of Immunology*, 162: 2829–2836.

Rottenberg M.E., Gigliotti Rothfuchs A., Gigliotti D., Ceausu M., Une C., Levitsky V. Wigzell H. 2000. Regulation and role of IFN-gamma in the innate resistance to infection with *Chlamydia pneumoniae*. *Journal of Immunology*, 164: 4812-4818.

Routes J. M., Nelson H. S., Noda J.A., Simon F. T. 2000. Lack of correlation between *Chlamydia pneumoniae* antibody titers and adult-onset asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 105: 391 - 392.

Saikku P., Wang S.P., Kleemola M., Brander E., Rusanen E., Grayston J.T. 1985. An epidemic of mild pneumonias due to an unusual strain of *Chlamydia psittaci*. *Journal of Infectious Diseases*, 151: 832-839.

Saikku P., Leinonen M., Tenkanen L. 1992. *Chlamydia pneumoniae* infection as a risk factor for coronary heart disease in the Helsinki heart study. *Annals of Internal Medicine*, 116; 273-278.

Saikku P. 2000. *Chlamydia pneumoniae* in atherosclerosis. *Journal of Internal Medicine*, 247; 391-396.

Schachter J., Grayston J.T. 1998. Epidemiology of human chlamydial infections. V: *Proceedings of the Ninth International Symposium on Human Chlamydial Infections*. Stephens R.S., Byrne G.I., Christiansen G., Clarke I.N., Grayston J.T., Rank R.G., Ridgway G.L., Saikku P., Schachter J., Stamm W.E. (eds). San Francisco, June 1998. University of California: 3–10.

Schachter J., Stephens R. S., Timms P., Kuo C., Bavoil P. M., Birkelund S., Boman J., Caldwell H., Campbell L. A., Chernesky M., Christiansen G., Clarke I. N., Gaydos C., Grayston J. T., Hackstadt T., Hsia R., Kaltenboeck B., Leinonen M., Ojcius D., McClarty G., Orfila J., Peeling R., Puolakkainen M., Quinn T. C., Rank R. G., Raulston J., Ridgway G. L., Saikku P., Stamm W. E, Taylor-Robinson D., Wang S.-P., Wyrick P. B. 2001. Radical changes to chlamydial taxonomy are not necessary just yet. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51: 251–253.

Shaw E.I., Dooley C.A., Fisher E.R. et al. 2000. Three temporal classes of gene expression during the *Chlamydia trachomatis* developmental cycle. *Molecular Microbiology*, 37: 913-918.

Shirai M., Hirakawa H., Kimoto M., Tabuchi M., Kishi F., Ouchi K., Shiba T., Ishii K., Hattori M., Kuhara S., Nakazawa T. 2000. Comparison of whole genome sequences of *Chlamydia pneumoniae* J138 from Japan and CWL029 from USA. *Nucleic Acids Research*, 28: 2311-2314.

Sriram S., Mitchell W., Stratton C. 1998. Multiple sclerosis associated with *Chlamydia pneumoniae* infection of the CNS. *Neurology*, 50: 571-572.

Stanier R.Y., Van Niel C.B. 1962. The concept of a bacterium. *The Archives of Microbiology*, 42: 17-35.

Stephens R.S. 1994. Molecular mimicry and *Chlamydia trachomatis* infection of eucaryotic cells. *Trends in Microbiology*, 2: 99-101.

Stephens R. S., Kalman S., Lammel C., Fan J., Marathe R., Aravind L., Mitchell W., Olinger L., Tatusov R. L., Zhao Q. 1998. Genome sequence of an obligate intracellular pathogen of humans: *Chlamydia trachomatis*. *Science*, 282: 754-758.

Stephens R. S., Koshiyama K., Lewis E., Kubo A. 2001. Heparin-binding outer membrane protein of chlamydiae. *Molecular Microbiology*, 40: 691-699.

Storz J., Page L. A. 1971. Taxonomy of the *Chlamydiae*: reasons for classifying organisms of the genus *Chlamydia*, family *Chlamydiaceae*, in a separate order, *Chlamydiales* ord. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 21: 332-334.

Thom D.H., Grayston J.T., Siscovick D.S. 1992. Association of prior infection with *Chlamydia pneumoniae* and angiographically demonstrated coronary artery disease. *JAMA*, 268: 68-72.

Tong C., Sillis M. 1993. Detection of *Chlamydia pneumoniae* and *Chlamydia psittaci* in sputum samples by PCR. *Journal of Clinical Pathology*, 46: 313-317.

Turković B., Brudnjak Z., 1989. Antigenska struktura i imunobiologija klamidija. V: Klamidijske infekcije. Zbornik predavanj Seminarja o klamidijskih infekcijah. Hren-Vencelj H. (ur). Ljubljana, Univerza Edvarda Kardelja v Ljubljani, Medicinska fakulteta: 18-24.

Valkonen K., Saikku P. 1996. Proteinase associated with *Chlamydia pneumoniae*. V: Proceedings of the 3rd Meeting of the European Society of *Chlamydia* research. Vienna, 11-14 September. Bologna, Soc Editrica Esculapio: 41-41.

Vandahl B., Christiansen G., Birkelund S. 2002. 2D-PAGE analysis of the *Chlamydia pneumoniae* outer membrane complex. V: Proceedings of the Tenth International Symposium on Human Chlamydial Infection. Schachter J., Christiansen G., Clarke I. N., Hammerschlag M. R., Kaltenboeck B., Kuo C.C., Rank R. G., Ridgway G. L., Saikku P., Stamm W. E., Stephens R. S., Summersgill J. T., Timms P., Wyrick P. B. (eds.). Antalya, June 21-23. 2002. Basim Yeri: 547-550.

Veiga E., Sugawara E., Nikaido H., de Lorenzo V., Fernandez L.A. 2002. Export of autotransported proteins proceeds through an oligomeric ring shaped by C-terminal domains. EMBO Journal, 21,9: 2122-2131.

Vuola J.M., Puurula V., Anttila M., Makela P.H., Rautonen N. 2000. Acquired immunity to *Chlamydia pneumoniae* is dependent on gamma interferon in two mouse strains that initially differ in this respect after primary challenge. Infection and Immunity, 68: 960-964.

Wagels G., Rasmussen S., Timms P. 1994. Comparison of *Chlamydia pneumoniae* isolates by Western blot (immunoblot) analysis and DNA sequencing of the *omp2* gene. Journal of Clinical Microbiology, 32: 2820–2823.

Wang S.P., Grayston T.J. 1970. Immunologic relationship between genital TRIC, lymphogranuloma venereum, and related organisms in a new indirect immunofluorescence test. American Journal of Ophthalmology, 70: 367-374.

Wang S.P. 1971. A microimmunofluorescence method. Study of antibody response to TRIC organisms in mice. V: Trachoma and related disorders caused by chlamydial agents. Nichols R.L. (ed.). Proceedings of a symposium held in Boston 1970. Amsterdam, Excerpta Medica: 273-288.

Wang S.P., Grayston T.J., Alexander E.R., Holmes K.K. 1975. Simplified microimmunofluorescence test with trachoma-lymphogranuloma venereum (*Chlamydia trachomatis*) antigens for use as a screening test for antibody. Journal of Clinical Microbiology, 1: 250-255.

Wang S.P. 2000. The microimmunofluorescence test for *Chlamydia pneumoniae* infection: technique and interpretation. *Journal of Infectious Diseases*, 181, Suppl. 3: S421-S425.

Ward M. E. 1983. Chlamydial classification, development and structure. *British Medical Bulletin*, 39,2: 109-115.

Ward M.E., Murray A. 1984. Control mechanisms governing the infectivity of *Chlamydia trachomatis* for HeLa cells: mechanisms of endocytosis. *Journal of Genetic Microbiology*, 130: 1765-1780.

Wolf K., Fischer E., Hackstadt T. 2000. Ultrastructural analysis of developmental events in *Chlamydia pneumoniae*-infected Cells. *Infection and Immunity*, 68: 2379-2385.

Wolf K., Fischer E., Mead D., Zhong G., Peeling R., Whitmire B., Caldwell H.D. 2001. *Chlamydia pneumoniae* major outer membrane protein is a surface-exposed antigen that elicits antibodies primarily directed against conformation - dependent determinants. *Infection and Immunity*, 69: 3082-3091.

Wong K.H., Skelton S.K., Chan Y.K. 1992. Efficient culture of *Chlamydia pneumoniae* with cell lines derived from the human respiratory tract. *Journal of Clinical Microbiology*, 30: 1625-1630.

Wong Y.K., Sueur J.M., Fall C.H.D., Orfila J., Ward M.E. 1999. The species specificity of the microimmunofluorescence antibody test and comparisons with a time resolved fluoroscopic immunoassay for measuring IgG antibodies against *Chlamydia pneumoniae*. *Journal of Clinical Pathology*, 52: 99-102.

Wuppermann F.N., Hegemann J.H., Jantos C.A. 2001. Heparan Sulfate-like glycosaminoglycan is a cellular receptor for *Chlamydia pneumoniae*. *The Journal of Infectious Diseases*, 184: 181-187.

Wyllie S., Ashley R.H., Longbottom D., Herring A.J. 1998. The major outer membrane protein of *Chlamydia psittaci* functions as a porin-like ion channel. *Infection and Immunity*, 66: 5202-5207.

Wyrick P.B. 2000. Intracellular survival by *Chlamydia*. *Cellular Microbiology*, 2,4: 275-282.

Yang J., Hooper W.C., Phillips D.J., Tondella M.L., Talkington D.F. 2003. Induction of proinflammatory cytokines in human lung epithelial cells during *Chlamydia pneumoniae* infection. *Infection and Immunity*, 71: 614-620.

Zhong G., Fan P., Ji H., Dong F., Huang Y. 2001. Identification of a chlamydial protease-like activity factor responsible for the degradation of host transcription factors. *Journal of Experimental Medicine*, 193: 935-942.

ZAHVALA

Najlepše se zahvaljujem asist. dr. Darji Keše za vso strokovno pomoč, uporabne nasvete in prijaznost.

Zahvalila bi se osebju Laboratorija za diagnostiko znotrajceličnih okužb, predvsem pa Ines za prijaznost in pomoč pri praktični izvedbi diplomske naloge.

Moji mentorici, prof. dr. Jožici Marin in recenzentki, doc. dr. Evi Ružič-Sabljić se zahvaljujem za strokoven pregled diplomske naloge ter za dragocene nasvete pri pisanju le-te.

Hvala vsem prijateljem, zaradi katerih bodo študentska leta ostala nepozaben spomin. Še posebej pa hvala vsem prijateljicam, ki ste bile in ste res najboljše prijateljice.

Hvala ata, mama, Jožica, Darja in Dean, ker ste me podpirali in mi vedno želeli najboljše.

Hvala Tadej za potrpežljivost in ker si vedno verjel vame.

PRILOGE

PRILOGA A: Rezultati testa MIF, proizvajalca Focus, ZDA

Zaporedna št. seruma	Št. seruma	<i>Chlamydia pneumoniae</i>			<i>Chlamydia trachomatis</i>	<i>Chlamydia psittaci</i>
		IgG	IgM	IgA		
1	109	512	Neg	512	Neg	Neg
2	111	1024	Neg	512	Neg	Neg
3	131	512	Neg	64	IgG 256	Neg
4	139	Neg	Neg	Neg	IgG 64	Neg

5	141	Neg	Neg	Neg	IgG 32	Neg
6	166	Neg	Neg	Neg	IgG 128 IgA 64	Neg
7	174	128	Neg	64	IgG 64 IgA 64	IgG 32
8	212	128	Neg	Neg	IgG 128	Neg
9	229	Neg	Neg	Neg	IgG 32 IgA 64	Neg
10	262	Neg	Neg	Neg	IgG 128	Neg
11	325	32	Neg	Neg	IgG 128 IgA 64	Neg
12	348	1024	Neg	512	Neg	Neg
13	387	512	20	256	Neg	Neg
14	388	512	20	256	Neg	Neg
15	402	512	20	64	Neg	Neg
16	426	32	Neg	Neg	IgG 512	IgG 32
17	467	1024	Neg	128	IgG 512 IgA 64	IgG 1024 IgA 256
18	477	Neg	Neg	Neg	IgG 512 IgM 8	Neg
19	506	1024	Neg	256	Neg	Neg
20	531	Neg	Neg	Neg	IgG 1024 IgA 64	Neg
21	289	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
22	33	32	Neg	Neg	IgG 32	Neg
23	84	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
24	85	32	Neg	Neg	Neg	Neg
25	117	128	Neg	64	Neg	Neg
26	145	32	Neg	Neg	Neg	Neg

Zaporedna št. seruma	Št. seruma	<i>Chlamydia pneumoniae</i>			<i>Chlamydia trachomatis</i>	<i>Chlamydia psittaci</i>
		IgG	IgM	IgA		
27	175	128	Neg	64	Neg	Neg
28	292	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
29	203	128	Neg	64	Neg	Neg
30	377	256	Neg	256	Neg	Neg
31	402	512	20	512	IgG 32	IgG 32
32	415	16	Neg	Neg	Neg	Neg
33	466	128	16	/	Neg	Neg

34	469	64	Neg	32	Neg	Neg
35	472	64	16	64	Neg	Neg
36	516	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
37	531	128	Neg	64	Neg	Neg
38	613	128	Neg	64	Neg	Neg
39	626	1024	512	Neg	IgG 32	Neg
40	635	512	16	256	Neg	Neg
41	1699	64	Neg	64	Neg	Neg
42	1702	128	Neg	64	Neg	Neg
43	1703	512	Neg	256	Neg	Neg
44	1704	128	Neg	64	Neg	Neg
45	1705	64	Neg	Neg	Neg	Neg
46	1706	512	Neg	64	Neg	Neg
47	289	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
48	1709	128	Neg	256	IgG 32	IgG 32
49	1711	128	Neg	64	Neg	Neg
50	1712	128	Neg	64	Neg	Neg
51	1713	16	Neg	Neg	Neg	Neg
52	1714	128	Neg	64	Neg	Neg
53	292	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
54	1716	64	Neg	Neg	Neg	Neg
55	1717	128	Neg	64	Neg	Neg
56	1718	32	Neg	Neg	Neg	Neg

Zaporedna št. seruma	Št. seruma	<i>Chlamydia pneumoniae</i>			<i>Chlamydia trachomatis</i>	<i>Chlamydia psittaci</i>
		IgG	IgM	IgA		
57	1719	32	Neg	128	Neg	Neg
58	1478	1024	Neg	512	Neg	Neg
59	1506	256	16	256	Neg	Neg
60	301	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
61	1721	128	Neg	Neg	IgA 64	IgA 64
62	1722	32	Neg	256	Neg	Neg

63	1723	128	Neg	128	Neg	Neg
64	1724	128	Neg	64	Neg	Neg
65	1725	64	Neg	Neg	IgA 64	Neg
66	1727	128	Neg	64	Neg	Neg
67	304	Neg	Neg	/	Neg	Neg
68	1729	128	Neg	64	Neg	Neg
69	1730	32	Neg	Neg	Neg	Neg
70	305	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
71	1732	128	/	32	Neg	Neg
72	1733	1024	/	256	IgA 64	IgA 64
73	1734	256	/	64	Neg	Neg
74	1735	128	Neg	64	Neg	Neg
75	1737	64	Neg	64	Neg	Neg
76	306	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
77	1739	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg

PRILOGA B: Rezultati testa MIF, proizvajalca Labssystem, Finska

Zaporedna št. seruma	Št. seruma	<i>Chlamydia pneumoniae</i>			<i>Chlamydia trachomatis</i>	<i>Chlamydia psittaci</i>
		IgG	IgM	IgA		
1	109	256	Neg	256	Neg	Neg
2	111	512	Neg	256	Neg	Neg
3	131	128	Neg	64	IgG 128	IgG 32
4	139	Neg	Neg	Neg	IgG 64	Neg
5	141	Neg	Neg	Neg	IgG 32	Neg

6	166	Neg	Neg	Neg	IgG 32	Neg
7	174	128	Neg	64	IgG 32 IgA 64	IgG 32 IgA 64
8	212	32	NR	Neg	IgM 16	IgM 16
9	229	Neg	NR	Neg	IgG 32 IgM 16	IgM 16
10	262	Neg	Neg	Neg	IgG 32	Neg
11	325	32	Neg	Neg	IgG 128	IgG 32
12	348	512	Neg	256	Neg	Neg
13	387	256	16	256	Neg	Neg
14	388	256	Neg	64	Neg	Neg
15	402	512	Neg	Neg	Neg	Neg
16	426	16	Neg	Neg	IgG 256	Neg
17	467	512	16	64	IgG 256	IgG 128
18	477	Neg	Neg	Neg	IgG 256	Neg
19	506	512	16	256	Neg	Neg
20	531	Neg	Neg	Neg	IgG 512	Neg
21	289	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
22	33	32	Neg	Neg	Neg	Neg
23	84	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
24	85	32	Neg	Neg	Neg	Neg
25	117	64	Neg	64	Neg	Neg
26	145	32	NR	Neg	IgM 16	IgM 16
27	175	128	Neg	64	Neg	Neg
28	292	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg

Zaporedna št. seruma	Št. seruma	<i>Chlamydia pneumoniae</i>			<i>Chlamydia trachomatis</i>	<i>Chlamydia psittaci</i>
		IgG	IgM	IgA		
29	203	64	Neg	Neg	Neg	Neg
30	377	256	16	256	Neg	Neg
31	402	512	16	256	IgG 512	IgG 512
32	415	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
33	466	128	16	64	Neg	Neg
34	469	128	16	Neg	Neg	Neg
35	472	128	16	64	Neg	Neg
36	516	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
37	531	128	Neg	64	Neg	Neg
38	613	128	Neg	64	Neg	Neg
39	626	512	16	Neg	IgG 512	IgG 512
40	635	512	Neg	256	Neg	Neg
41	1699	32	NR	64	IgG 32 IgM 16	IgG 32 IgM 16
42	1702	64	Neg	64	Neg	Neg
43	1703	128	16	64	Neg	Neg
44	1704	128	8	64	IgG 32	Neg
45	1705	32	Neg	Neg	Neg	Neg
46	1706	512	Neg	64	Neg	Neg
47	289	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
48	1709	128	NR	256	IgG 128 IgM 16	IgG 128 IgM 16
49	1711	32	NR	64	IgG 32 IgM 16	IgG 32 IgM 16
50	1712	64	Neg	Neg	Neg	Neg
51	1713	Neg	NR	Neg	IgM 16	IgM 16
52	1714	32	Neg	32	Neg	Neg
53	292	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
54	1716	32	Neg	Neg	IgM 16	IgM 16
55	1717	64	Neg	64	IgG 32 IgM 16	IgG 32 IgM 16
56	1718	16	NR	Neg	IgG 32 IgM 16	IgM 16
57	1719	32	NR	64	IgG 32 IgM 16	IgM 16
58	1478	512	Neg	512	Neg	Neg

Zaporedna št. seruma	Št. seruma	<i>Chlamydia pneumoniae</i>			<i>Chlamydia trachomatis</i>	<i>Chlamydia psittaci</i>
		IgG	IgM	IgA		
59	1506	128	16	128	Neg	Neg
60	301	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
61	1721	32	Neg	Neg	Neg	Neg
62	1722	16	NR	256	IgM 16	IgM 16
63	1723	128	Neg	64	Neg	Neg
64	1724	128	16	Neg	Neg	Neg
65	1725	32	Neg	Neg	Neg	Neg
66	1727	128	Neg	64	Neg	Neg
67	304	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
68	1729	32	Neg	64	Neg	Neg
69	1730	16	Neg	Neg	Neg	Neg
70	305	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
71	1732	128	NR	Neg	IgM 16	IgM 16
72	1733	512	16	256	Neg	Neg
73	1734	256	16	Neg	IgG 32	Neg
74	1735	128	NR	64	IgM 16	IgM 16
75	1737	64	Neg	64	Neg	Neg
76	306	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
77	1739	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg

(NR = navzkrižna reaktivnost; št. = številka; neg. = negativen serum)