

Örebro Universitet

Institutionen för hälsovetenskap och medicin

Enheten klinisk medicin

Biomedicinska analytikerprogrammet

BMLV C, Biomedicinsk laborietvetenskap, Examensarbete, BL1701 VT15

2015-05-28

## **Diagnostik samt visualisering av Chlamydia som orsak till luftvägssjukdom**

Författare: Zainab ElDaoui

Handledare: Hans Fredlund, Docent, Överläkare  
Bihandledare: Inger Agnee Stradling, BMA, Immunolog  
Universitetssjukhuset Örebro

## SAMMANFATTNING

Chlamydia bakterier är obligata intracellulära parasiter och är gramnegativa, kockoida samt orörliga. Intracellulära parasiter innebär att både förökningen och energimetabolismen sker i värdcellen. Värdcellen kommer att förse chlamydia bakterierna med energi som leder till att bakterien förökar sig. Chlamydia bakterier tillhör släkten Chlamidophila och består av tre arter som skapar sjukdom hos människor (*Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae* (känt som Taiwan Acute Respiratory Disease, TWAR), *Chlamydia psittaci*). Där TWAR orsakar lunginflammation. Syftet var att med microimmunofluorescens (MIF) metoden undersöka om skillnad i företagskvalitet föreligger som påverkar analysresultatet samt att analysera chlamydia antikroppar med komplementbindningsmetod (KB). Metoden utfördes genom tre olika MIF kit för att undersöka Immunoglobulin G (IgG) samt Immunoglobulin M (IgM) antikroppar. IgM antikropparna kompletterades med KB metoden för undersökning av infektionens aktualitet. Resultatet för analyserna presenteras i två tabeller där patienternas resultat analyseras. Utifrån resultaten kunde det bestämmas om skillnad föreligger mellan de olika företagskitten. Slutsatsen är att man bör ha ett positivt KB test i kombination med ett positivt MIF IgM test för att fastställa en aktuell chlamydia diagnos, samt att mikroskopisten ska vara erfaren för att minska risken för att fel diagnos fastställs. Det föreligger ingen uppenbar skillnad i företagskvalitet mellan de olika kiten.

**Nyckelord:** *Chlamydia pneumoniae* (Twar), Chlamydia, Microimmunofluorescence

## FÖRKORTNINGAR

*C.pneumoniae*

*C.trachomatis*

*C.psittaci*

EB

FITC

IgM

IgG

IgA

KB

MIF

PBS

PCR

RB

TWAR

*Chlamydia pneumoniae*

*Chlamydia trachomatis*

*Chlamydia psittaci*

Elementär kropp

Fluoresceinisotiocyanat-konjugerat

Immunoglobulin M

Immunoglobulin G

Immunoglobulin A

Komplementbindning

Microimmunofluorescens

Fosfat buffrad saltlösning

Polymeraskedjereaktion

Retikulär kropp

Taiwan Akut Respiratorisk sjukdom

# INNEHÅLLSFÖRTECKNING

INTRODUKTION .....	1
De olika Chlamydia arterna .....	1
<i>Livscykel</i> .....	2
Serologisk identifiering av Chlamydia .....	4
Komplementbindning .....	5
Syfte.....	6
METOD OCH MATERIAL.....	6
Etiska överväganden.....	6
Provmaterial.....	7
Metod.....	7
Statistik .....	8
RESULTAT .....	9
DISKUSSION .....	12
Slutsats.....	14
REFERENSER.....	15

## INTRODUKTION

Chlamydiabakterier är obligata intracellulära parasiter, som kännetecknas av att vara gramnegativa kockoida och orörliga. Intracellulära parasiter innebär att både förökningen och energimetabolismen sker i värdcellen dvs. i de eukaryota cellerna då den inte kan överleva samt skapa sjukdom hos en värd om den inte tagit sig in till cellen. Värdcellen kommer att förse chlamydiabakterierna med Adenosintrifosfat (ATP) och andra intermediärer vilket bakterien inte själv kan göra och på så vis så kommer bakterien att kunna föröka sig [1,2]. Chlamydiabakterierna kan misstas för virus eftersom de behöver individens celler och biosyntes för att kunna överleva men eftersom de innehåller ribosomer, nukleinsyror så som deoxiribonukleinsyra (DNA) och Ribonukleinsyra (RNA) samt en cellvägg så klassificeras de som bakterier. Chlamydia bakterier tillhör släkten Chlamidophila och består av tre olika arter som skapar sjukdom hos människor, nämligen *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae* (känt som Taiwan Acute Respiratory Disease, TWAR) samt *Chlamydia psittaci* där bakterien som orsakar TWAR tillståndet är den vanligaste chlamydiaarten som orsakar lunginflammation [1]. Jämfört med andra mikrobiologiska orsaker till lunginflammation, främst pneumokocker, så är chlamydia ovanlig.

### De olika Chlamydia arterna

*Chlamydia trachomatis* kan orsaka flera infektioner hos den individ som bakterien koloniserar (drabbar oftast människor). *Chlamydia trachomatis* typ A-C ger ögonsjukdomen trakom, typ D-K genital chlamydia och typ L1-L3 lymfgranuloma venerum. Trakom drabbar ögats epitelceller och medför att det uppstår en subepitelial infiltration av lymfocyter. Denna infiltration kommer att leda till att folliklar bildas och inflammation i ögats bindhinna uppstår. Hornhinnan kommer bli grumlig samt vaskuliserad. Om sådana infektioner upprepas så kommer ögonlocken att bli ärrade och resultera i blindhet. Andra infektioner som *C. trachomatis* brukar orsaka är genitala och rektala sexuellt överförbara infektioner. Hos män kan proktit (ändtarmsinflammation), uretrit (inflammation i urinröret eller urinblåsan) samt epididymit (bitestikelinflammation) orsakas av *Chlamydia trachomatis* medan hos kvinnan kan cervicit (inflammation i livmoderhalsen) samt akut salpingit (äggledarinfektion/äggledarinflammation) orsakas. Nyfödda barn kan också infekteras av

denna bakterie genom att modern överfört bakterien till barnet vid förlossning, vilket kan medföra att barnet får en ögoninfektion [1].

*Chlamydia psittaci* kan drabba både fåglar och vissa däggdjur så som exempelvis människan. Fåglarna blir infekterade genom andningsvägarna och dessa infekterade fåglar kan smitta människan oavsett om fåglarna är levande eller döda så kan man fortfarande smittas då bakterien finns i fjäderdräkten. Man kan smittas och feber uppstår, som kan utvecklas till lunginflammation hos både människor och djur. Även en toxisk pneumonit kan uppstå [1].

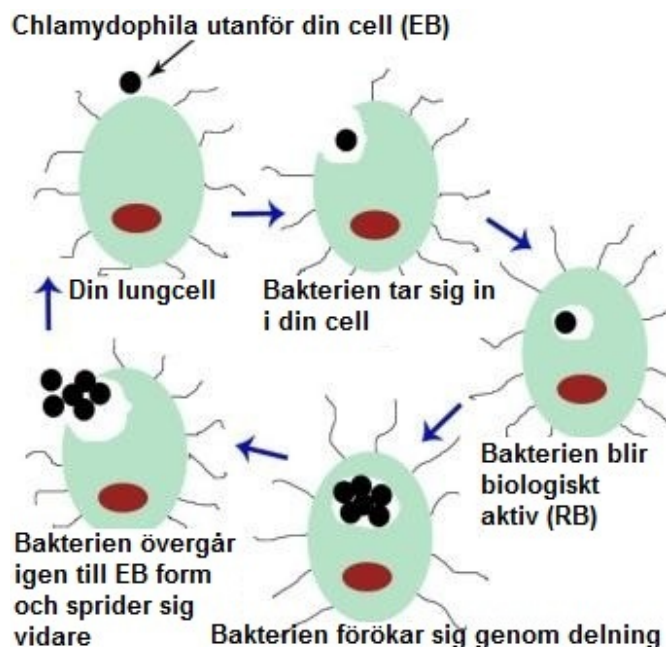
*Chlamydia pneumoniae* arten som är väldigt liten (storleken är 0,2-1 µm) är en vanligt förekommande bakterie som smittar endast från människa till människa och som ofta kallas för TWAR, en benämning som är samma som *Chlamydia pneumoniae* infektion. Bakterien orsakar respiratoriska komplikationer så som luftvägsinfektioner/ inflammationer som antingen kan vara akuta eller långvariga kvardröjande infektioner [2,3,4]. *Chlamydia pneumoniae* har sin största inverkan på luftvägsepitelet med en ciliostatisk effekt, och detta har en betydande faktor för både symtom som uppvisas hos den drabbade individen samt patogenes. *Chlamydia pneumoniae* kan orsaka bronkit men även orsaka inflammationer djupare ner i luftrören (som resulterar i slembildning) [3]. Själva smittan av bakterien sker oftast via droppsmitta i samband med hosta och nysningar med störst risk inom familjen individen befinner sig i, men bakterien kan även kolonisera människan via kontakt då bakterier som är associerade med TWAR finns exempelvis på handen. Inkubationstiden mellan sjukdomens utbrott och smittan är cirka 3 veckor [3,5]. Oftast blir många infekterade i ett tidigt skede det vill säga i tidig ålder. Sjukdomen kan ofta vara asymtomatisk eller mer sällan uppträda som svåra infektioner. Luftvägsbesvären kan vara lock för öronen, snuva, halsont som resulterar i heshet, slemhosta som är ganska långdragen, lättare pneumoni där även sinuitbesvär och allmänt trötthet kan vara vanliga. Dessa symtom kan pågå i ett flertal veckor även månader [5,6]. Dessa ovan nämnda symtom uppstår oftast vid akuta tillstånd, om tillståndet istället är kroniskt så uppkommer symtom så som kronisk svalginflammation (faryngit), kronisk rinit men även att symtom så som slemansamlingar uppkommer i både svalg och näsa [5].

### ***Livscykel***

Chlamydia har en speciell livscykel och en speciell utveckling i individens kropp, där bakteriens utveckling sker i olika stadium. Den kan förekomma i två former nämligen i sin

elementära kroppsform (elementar kropp, EB) eller i sin retikulära kroppsform (retikulär kropp, RB) [3].

Då individen först smittas av bakterien så kommer bakterien att uppträda i sin EB form och vara infektiös, samt sprida sig mellan individer. Då bakterien befinner sig i sin EB form så är bakterien inte biologiskt aktiv och kan leva utanför värdecellen med en stor smittspridning mellan olika människor. Bakterien kommer att vara ganska okänslig för olika påverkan av sin omgivning. Livslängden för bakterien i EB formen är bestämd och har en gräns, vilket så småningom kommer att leda till att bakterien dör och inte kan infektera och skapa en infektion hos individen. Då bakterien tagit sig in i individen i sin EB form så kommer bakterien att penetrera och ta sig in i värdecellen och omvandlas till en RB form och bli biologiskt aktiv. Detta resulterar i att bakterien kommer att kunna föröka sig via celledelning och sedan omvandlas igen till en sporliknande EB form. Då den återkommit till EB formen så kommer dessa förökade bakterier att vilja komma ut och detta kan de göra på två sätt, nämligen genom att antingen penetrera cellmembranet eller genom att lysa värdcellen. Detta resulterar i att personen själv kommer att bli smittsam och kan orsaka att andra smittas av bakterien (figur 1) [3]. Chlamydia bakterier är alltid känsliga för tetracyklin så behandlingen är enkel [1].



**Figur 1:** Illustrerar livscykeln för hur Chlamydiabakterierna förökar sig i värdecellen och skapar sjukdom. Visar även de två formerna (EB och RB) som bakterien förkommer i för att kunna föröka sig. Källa: <http://www.twar.se/twar-infektion.html>

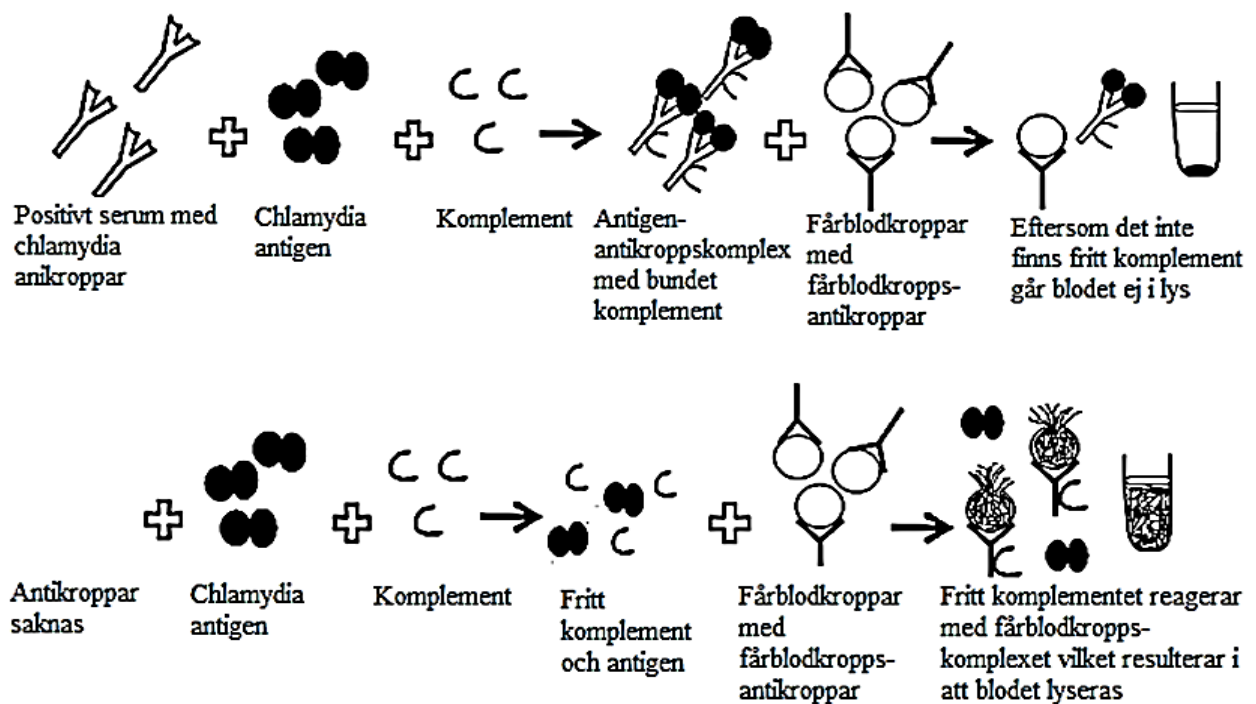
## Serologisk identifiering av Chlamydia

För att kunna diagnostisera och analysera en TWAR infektion så krävs det att man finner antikroppar som oftast cirkulerar i serum om man blivit utsatt för infektionen. *Chlamydia pneumoniae* är svårödlad och växer dåligt vid odling på medier då kolonierna knappt kan ses med blotta ögat [2]. Man kan utföra en PCR analys för att identifiera bakterien från svalget dock är den bäst lämpligast vid ett tidigt insjuknande (då bakterien lätt kan identifieras) eftersom även friska individer kan bära på *C.pneumoniae*, och att vara bärare av bakterien betyder inte att man är sjuk [4]. Den serologiska analys som är mest använd är microimmunofluorescens (MIF-test) som utvecklades för att kliniskt kunna identifiera antikroppar som kroppen bildar vid en TWAR-infektion. Då en individ blivit utsatt för en TWAR infektion så kommer antikroppar av typen IgM, IgG samt IgA att bildas och beroende på vilken typ av antikropp som ses beror på om infektionen är en gammal eller en ny infektion [2]. Om infektionen är en ny infektion det vill säga de första månaderna efter insjuknandet så bildas IgM antikroppar som anger aktuell infektion, men om infektionen har funnits i månader så bildas IgG antikroppar [4]. Om en sekundär smittning uppstår, dvs att man åter igen smittas av bakterien så kan det vara svårt att tolka antikropparna eftersom IgG antikropparna som tidigare bildats kvarstår livet ut, dessutom så blir man aldrig resistent mot bakterien. Om man har påvisande av IgA antikroppar så betraktades det förr vara ett stöd för persisterande infektion dock är relevansen ifrågasatt idag [3]. Falska IgM positiva resultat kan uppstå då patienten till exempel har reumatoid faktor av typen IgM cirkulerande i blodet som medför att de istället ger falska resultat. MIF-testet är en fluorescerande-antikroppstestning som kan skilja mellan IgG samt IgM antikroppar för att kunna särskilja mellan tidigare och nuvarande infektioner [2]. Detta sker genom att objektglas är preparerat med EB kroppar från alla tre Chlamydia arterna (*C.pneumoniae*, *C.trachomatis*, *C.psittaci*) med jämna mellanrum mellan varje EB kroppar. På dessa preparatglas inkuberas patientserum och om det uppstår en positiv reaktion så kommer antikroppar som finns i patientens serum att binda till dessa EB som fungerar som antigen. För att detta sedan ska kunna visualiseras så tillsätts sekundära fluoresceinisotiocyanat-konjugerat (FITC) antikroppar som är fluorescerande molekyllära markörer. Dessa är riktade mot humant IgG eller IgM. Detta kan därefter studeras i ett fluorescens mikroskop [2,7]. Svårigheten med MIF metoden är själva tolkningen av analysresultatet av *Chlamydia pneumoniae*-infektioner då bristen ligger i standardiseringen inom chlamydia serologi [8].



## Komplementbindning

Komplementbindningsreaktioner används för att kliniskt kunna påvisa antikroppar mot exempelvis olika virus och bakterier så som *Mycoplasma pneumoniae* och chlamydia. Vid förekomst av en serumfaktor dvs komplement (C) så kommer bakterier eller erythrocyter att lyseras då de möter och reagerar med dess motsvarande antikropp. Komplement förekommer normalt i individens serum och har tendensen att reagera med ett antigen antikroppskomplex. Metodens princip utgår på att antikroppar reagerar med dess motsvarande antigen och om antikroppar finns i patientens serum så kommer det att uppstå ett antigen-antikroppskomplex. Sedan vid ett nästa steg kommer komplement att tillsättas och om antikroppar finns så kommer komplementet att binda in till antigen-antikroppskomplexet, men om antikroppar inte finns tillgängligt så kommer istället komplementet att vara fritt. Detta är koncentrationsberoende där för lite antigen-antikroppskomplex ger mer fritt komplement och tvärtom då för mycket antigen-antikroppskomplex ger för lite fritt komplement, därför bör koncentrationen balanseras då en sådan analys ska utföras. För att detta sedan ska kunna studeras och analyseras behövs ett indicatorsystem som kommer att skapas genom tillsättning av fårerythrocyter, där dessa fårerythrocyter är klädda med fårerythrocyt-antikroppar. Dessa fårerythrocyter kommer att förbli opåverkade om komplementet förbrukats av antigen-antikroppskomplexet medan om det inte blivit någon reaktion mellan antigen-antikroppskomplexet och det istället finns fritt komplement så resulterar det i att de antikroppsklädda fårerythrocyterna lyseras eftersom komplementet reagerat istället med fårerythrocyterna (figur 2). Då IgM aktiverar komplement mer effektivt än IgG så är komplementbindningsresultaten främst beroende av IgM förekomst [9].



**Figur 2:** figuren ovan illustrerar komplementbindnings metoden i två steg, nämligen ett positivt serum med chlamydia antikroppar som resulterar i ej hemolyserat blod samt ett negativt serum då chlamydia antikroppar saknas som medför att blodet lyseras av det fria komplementet.

## Syfte

Syftet var att med hjälp av serologiska metoder kunna undersöka objektglas preparerade med olika chlamydia varianter, se om skillnad i företagskvalitet föreligger som påverkar analysresultatet samt att analysera chlamydiaantikroppar med komplementbindningsmetod för att säkerställa aktualiteten av en infektion.

## METOD OCH MATERIAL

### Etiska överväganden

Ingen etisk problematik föreligger eftersom proven är avidentifierade före analysen men de tidigare erhållna analys svaren bevaras för respektive prov. Kvalitetsproverna är avidentifierade, tidigare resultat är bevarade.

## Provmaterial

Serumprover från patienter med klinisk misstanke om Chlamydia infektioner som orsak till luftvägssjukdom undersöktes. Patientserumprover (20 stycken) samt fem kvalitetspaneler (utskick från organisationen Equalis med prover som tidigare analyserats) med serumprover som var frysförvarade analyserades med MIF metoden. De internkontroller som användes var patientsera med positivt resultat för antikroppar mot *C.pneumoniae* IgG samt IgM, *C.trachomatis* IgG samt *C.Psittaci* IgG (USÖ).

## Metod

Metoden utfördes med tre olika kit: Euroimmun AG (Seekamp, Lübeck, Germany), Labsystems diagnostics (Tiilitie, Vantaa, Finland) samt Focus diagnostics (Cypress, California, USA) enligt tillverkarens anvisningar. Enligt Focus diagnostics kit späddes alla serumprover, kvalitetsprover samt interna kontroller för analys av IgG i 1/16 i fosfat buffrad saltlösning, (PBS) (0.1M, pH 7.2, Focus diagnostics, USA) medan för analys av IgM späddes serumproverna, kvalitetsprover samt interna kontroller i 1/10 i pretreatment diluent (Focus diagnostics, Cypress, California, USA) och inkuberades i 5 minuter. Sedan adderades 25 µl av respektive kontroll, kvalitetsprover samt patientserum spädningarna till objektglas med de tre olika bakteriearterna (Focus diagnostics, Cypress, California, USA). Objektglaset inkuberades i fuktig kammare (30 minuter för IgG och 90 minuter för IgM) i 37°C. Preparaten sköljdes med PBS buffert i 10 minuter och sedan i destillerat vatten. IgM samt IgG konjugat (Anti-human FITC IgG och IgM, Focus diagnostics, Cypress, California, USA) tillsattes (25 µl) och sedan inkuberades i fuktig kammare 30 minuter i 37°C. Sköljningssteget upprepades och därefter monterades objektglaset i PBS buffrad glycerol (9 delar glycerol, 85 %, Merck) med täckglas. Objektglaset avlästes tillslut i ett fluorescensmikroskop.

Enligt Euroimmun AG kittet späddes alla serumprover, kvalitetsprover samt interna kontroller till analys av IgG i 1/100 i PBS-Tween (PBS pH 7.2 och 2 ml Tween) (Euroimmun AG, Seekamp, Lübeck, Germany) medan till analys av IgM späddes serumproverna, kvalitetsprover samt interna kontroller i 1/10 i blocking reagent (Labsystems diagnostics, Finland) och inkuberades i 15 minuter. Sedan adderades 30 µl av respektive kontroll, kvalitetsprover samt patientserum spädningarna till reaktionsfältet på reaktionsbrickan (Euroimmun AG, Seekamp, Lübeck, Germany). Ovanpå reaktionsbrickan placerades ett BIOCHIP glas innehållande de tre olika bakteriearterna (BIOCHIP-slide, Euroimmun AG,

Seekamp, Lübeck, Germany). BIOCHIP glasen inkuberades i 30 minuter för IgG i rumstemperatur och 60 minuter för IgM i 37°C. BIOCHIP glasen sköljdes med PBS-Tween i 5 minuter. Sedan applicerades 25 µl av IgM samt IgG konjugat (Anti-human FITC IgG och IgM, Euroimmun AG, Germany) och sedan inkuberades i 30 minuter för IgG i rumstemperatur och 30 minuter för IgM i 37°C. Sköljningssteget upprepades och därefter monterades BIOCHIPEN i monterings medium (embedding medium, Euroimmun AG, Germany) med täckglas. Resultatet avlästes sedan i ett fluorescensmikroskop.

Enligt Labsystems diagnostics kittet spädde alla serumprover och kvalitetsprover i en spädningsserie nämligen 1/64, 1/256 samt 1/1024 (för IgG) och internkontrollerna i 1/64 samt 1/256 i PBS (pH 7.2–7.4) + 1 % BSA (bovine serum albumin, MP, Biomedicals, Inc). Sedan tillsattes 10 µl av respektive kontroll, kvalitetsprover samt patientserum till objektglas med de tre olika bakteriearterna som sedan inkuberades över natt i kyl (2-8 °C). Till IgM spädde serumproverna, kvalitetsproverna samt interna kontroller i 1/8 i blocking reagent (Labsystems diagnostics, Finland) som inkuberades i kyl (2-8 °C) över natt. Dagen därpå spädde ytterligare till IgM både serumproverna samt kvalitetsproverna i 1/16 och 1/32 i PBS medan internkontrollerna spädde 1/16 i PBS. Sedan tillsattes 10 µl av respektive kontroll, kvalitetsprover samt patientserum spädningarna till objektglas med de tre olika bakteriearterna som sedan inkuberades 3 timmar i fuktig kammare i 37°C. Preparaten (IgG samt IgM) sköljdes med PBS i 10 minuter och sedan i milli-Q vatten. IgM och IgG konjugat (Anti-human FITC IgG och IgM, Labsystems diagnostics, Finland) tillsattes (10 µl) och sedan inkuberades i fuktig kammare 30 minuter för IgG i rumstemperatur och 30 minuter för IgM i 37°C. Sköljningssteget upprepades och därefter monterades objektglasen i PBS buffrad glycerol (9 delar glycerol, 85 %, Merck) med täckglas. Objektglasen avlästes i ett fluorescensmikroskop av en och samma avläsare i samtliga fall (Hans Fredlund).

För att säkerställa aktualiteten av infektionerna kompletterades analysen med en komplementbindningsmetod då proverna titrerades i flera titersteg och sedan bedömdes utifrån hur långt ett positivt resultat erhöles utifrån titerstegen.

## **Statistik**

Statistik beräkning är inte rimligt att utföra eftersom att det inte medför en förbättrad bedömning av resultaten. Detta är en liten studie där en ”gold standard” saknas.

## RESULTAT

Resultatet för kontrollerna illustreras i tabellerna nedan då (tabell 1) visar resultaten för alla kontroller och patientprover som analyserades för IgG antikroppar medan tabell 2 visar resultaten för alla kontroller och patientprover som analyserades för IgM, här redovisas även resultatet för komplementbindningsmetoden där siffrorna illustrerar hur långt i titersteg ett positivt resultat har erhållits. Resultatet i både tabell 1 och tabell 2 redovisas i form av plus tecken samt minus tecken, där detta motsvarar analysvaret för de tre chlamydia arterna. Första tecknet (plus eller minus) visar resultatet för *C.pneumoniae*, andra tecknet visar resultatet för *C.trachomatis* och sista tecknet för *C.psittaci*.

Skillnaden i resultat mellan de olika kätten illustreras i de båda tabellerna och sedan jämförs resultatet med tidigare resultat från universitetssjukhusets rutin resultat, Gävles rutin resultat samt mellan Equalis förväntade resultat (de svar som anses korrekt) för samma patientprover. Där USÖ-rutin och Gävle-rutin är de resultat som tidigare svarats ut för de analyserade patientproverna.

Kontrollerna för IgG samt IgM är godkända. Vissa prover som är negativa i Equalis ger på vissa ställen positiva resultat så som i prov nummer 2 (IgG, tabell 1), prov nummer 18 (IgM, tabell 2) samt prov 19 (IgM, tabell 2). Alla metoder identifierar *C.psittaci*. IgM positiviteten verifieras med komplementbindnings metod där siffrorna visar hur långt ett positivt resultat erhållits i spädningsfaktorn. Flera IgG prover vars resultat är negativa i Gävles rutin blir positiva i Labsystem och i USÖ rutin så som i prov nummer 6,10,11 (IgG, tabell 1). Vissa IgM prover som är negativa i KB testet ger positiva resultat i analysmetoden Labsystem (prov nummer 6 och 18, tabell 2), kan även vid en enstaka gång ge ett positivt resultat i de 2 andra metoderna (prov nummer 18 och 19, tabell 2). Vid positivt resultat i KB testet ger alla metoder positiva IgM fynd.

**Tabell 1:** tabellen nedan visar patientprovernans resultat för IgG som analyserats med de 3 olika kiten där *C.pn*, *C.tr* och *C.psitt* står för de positiva kontrollerna. Tabellen redovisar även rutinernas resultat för samma patientprover. Första tecknet visar *C.pneumoniae*, andra tecknet visar *C.trachomatis* och sista tecknet *C.psittaci*. += pos – = neg. K21-K25 står för kvalitetpanelernas resultat.

IgG						
Prov	Focus	Euroimmun	Labsystem	USÖ-rutin	Gävle-rutin	Equalis-förväntad
<i>C.pn</i>	+--	(+/-)--	+--			
<i>C.tr</i>	--+	--+	--+			
<i>C.psitt</i>	-- (+/-)	+++	--+			
1	+--	+++	+++	+++		+++
2	---	---	+++	---		---
3	---	---	+--	+--	+--	
4	+--	+--	+++	+--	+--	
5	+--	+--	+--	+--	+--	
6	---	---	+--	+--	---	
7	---	--+	---	---		
8	---	---	---	---		
9	+--	+--	+ (-/+)	+--	+--	
10	---	---	+--	+--	---	
11	+--	---	+--	+--	---	
12	+--	+--	+--	+--	+--	
13	---	---	+--	+--	---	
14	---	---	---	---	---	
15	+--	---	+--	+--	+--	
16	---	--+	---	---	---	
17	---	--+	--+	+--		+--
18	--+	--+	--+	++-		++-
19	+--	--+	++-	++-		++-
20	+--	---	+++	---+		---+
K21	---	---	---			
K22	+--	++-	--+			
K23	++-	+++	---			
K24	---	+--	--+			
K25	+++	+++	+++			

**Tabell 2:** tabellen nedan visar patientprovernas resultat för IgM som analyserats med de 3 olika kiten där C.pn står för den positiva kontrollen. Tabellen redovisar även rutinernas resultat för samma patientprover där första tecknet indikerar C.pneumoniae, andra tecknet indikerar C.trachomatis och sista tecknet C.psittaci. Sista kolumnen visar komplementbindningsmetodens resultat där siffrorna indikerar spädningsfaktorn. += pos – = neg. K21-K25 står för kvalitetpanelernas resultat. Då det står ett ”?” vid ett resultat så indikerar det ett osäkert positivt/negativt svar.

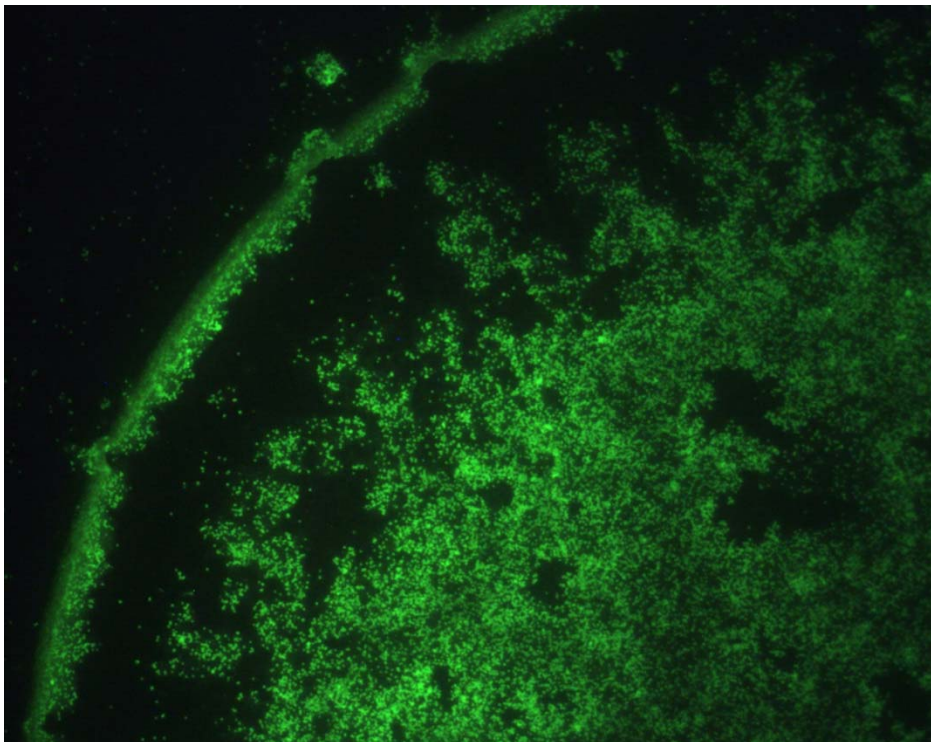
IgM							
Prov	Focus	Euroimmun	Labsystem	USÖ-rutin	Gävle-rutin	Equalis-förväntad	KB
C.pn	+--	+--	+--+	/	/	/	/
1	+++	+--	+++	+++	/	+++	320
2	+--	+--+	+--+	+--+	/	+--+	40
3	---	---	(+/-)---	+--	---	/	-
4	+++	+--	+--	+--	---	/	10
5	---	+--	---	+--	---	/	-
6	---	---	---	+--	---	/	-
7	---	---	---	/	/	/	/
8	---	---	---	/	/	/	/
9	---	---	+--	---	---	/	-
10	---	---	---	---	---	/	/
11	---	---	---	---	---	/	/
12	---	---	---	---	---	/	/
13	---	---	---	---	---	/	/
14	---	---	---	+--	---	/	-
15	---	---	---	---	---	/	/
16	+--	+? --	-? --	+--	---	/	10
17	+--	+--	+--	+--	/	+--	40
18	+--	+--+	---	---	/	---	-
19	---	-+-	---	---	/	---	-
20	+++	---+	---+	---+	/	---+	160
K21	---	-+-	---	/	/	/	/
K22	+--	+--	+--+	/	/	/	/
K23	+--	+--	---+	/	/	/	/
K24	+--	++-	+--	/	/	/	/
K25	---	---+	---	/	/	/	/

## DISKUSSION

Utifrån resultatet kan det bedömmas att det finns stora svårigheter i bedömning av MIF-testen oberoende av tillverkaren av glasen och att ett avvikande resultat kan uppstå i alla tre testmetoder. Detta har även testats och visats i en annan artikel som beskriver fallet [8].

kvalitetspaneler är utskick från en central organisation (Equalis) med prover som tidigare analyserats och har kända resultat. Alla laboratorier i landet analyserar proverna och jämför resultaten med förväntat utfall. Detta görs för att kontrollera att alla laboratorierna har en metod med tillräcklig kvalitet. Equalis förväntat är det svar som anses vara korrekt. Vad som anses vara korrekt är upprepade analyser av referenslaboratorier på dessa prover. Dessa prover är analyserade med både MIF metoden samt enzymkopplad immunadsorberande analys (ELISA). Sådana resultat finns endast för kvalitetspaneler. En del patientprover som analyserats har tidigare varit kvalitetspaneler.

De utvalda kontrollerna som användes i MIF testen gav ett förväntat svar med distinkta resultat och alla metoder får acceptabla resultat för patientprover analyserade för IgG förutom för patientprov nummer två som gav ett falskt positivt resultat på Labsystems analysresultat.



**Figur 3:** figuren ovan illustrerar ett positivt IgG antikropps fynd mot *C.pneumoniae* som analyserats med MIF metoden och som sedan observerats i ett fluorescens mikroskop.

Källa: [http://www.imagejournals.org/chlamydophila-pneumoniae-by-microimmunofluorescence.php?image\\_id=7](http://www.imagejournals.org/chlamydophila-pneumoniae-by-microimmunofluorescence.php?image_id=7)



Dock för det patientprover analyserade för IgM uppstår det däremot i alla metoder något falskt positivt resultat. Här ligger svårigheten i korsreaktionen för IgM testen vilket ger bedömningssvårigheten för mikroskopisten, då mikroskopisten måste vara erfaren för att kunna ge en korrekt bedömning av resultaten. Då det uppstår en positiv reaktivitet i MIF IgM testen så bör det kompletteras med en komplementbindnings metod för att öka säkerheten för resultatet samt för att kunna ge en verifikation av resultatet. Vissa patientprover visar ett positivt resultat i MIF testet men ett negativt resultat i KB testet vilket indikerar ett falskt positivt MIF test. Ett sådant resultat uppstår i patientprov nummer 3, 5, 9, 18 samt i patientprov nummer 19.

Helt förväntat negativa serum i MIF testen ger ibland enstaka positiva reaktioner i några av MIF metoderna men är genomgående KB negativa. Hela MIF metoden ger emellanåt falskt positiva reaktioner. Ingen av de testade metoderna är överlägsen eftersom det finns ett likartat avvikande resultat lika många gånger i alla tre testmetoder. Det har stor betydelse att som tidigare nämnts mikroskopisten är erfaren för att så mycket som möjligt kunna minska risken för att få falskt positiva resultat. Både fluorescensintensiteten och morfologin måste bedömmas med den största noggrannhet för att kunna minska risken för att få falskt positiva resultat. Precisionen med pipettering för MIF metoden är viktig eftersom det är ganska små mängder och då serumet ska pipetteras på objektglasets brunnar så måste brunnarna vara helt täckta med både konjugat samt serum, vilket annars kan resultera till att fel analysresultat uppstår. Analysen krävde mycket inkubationstider och dessa tider är viktiga att ta hänsyn till därför att analysresultaten ska kunna bli så utförliga som möjligt.

Det krävs stöd av KB testen för att säkert kunna sätta en aktuell chlamydia diagnos som ger sannolikt några falska negativa svar eftersom KB testen bedöms vara mindre känsliga än MIF testen. Dock kan några falska negativa svar vara bättre att få än att få fler falskt positiva diagnoser med chlamydia för att inte ge patienten en onödig behandling av antibiotika. Ett sådant KB test är väldigt användbart för att kunna skilja mellan en aktuell och en gammal infektion då ett högt titersteg i KB testet indikerar att det är en aktuell infektion. Dock bedöms den största risken för att få falskt positiva resultat vara beroende av mikroskopisten. MIF testen bör mikroskoperas av enbart några få erfarna avläsare.

Felkällorna som kan ha uppstått under utförandet av analysen kan vara att precisionen av pipetteringen inte varit så utförlig som det borde samt att det skapat stress då dessa analyser

utfördes parallellt som även medfört att det kanske har missats att ta hänsyn till något viktigt under analysen.

### **Slutsats**

Slutsatsen kan härmed bestämmas att man bör ha ett positivt KB test i kombination med ett positivt MIF IgM test för att säkert fastställa en aktuell chlamydia diagnos, samt att mikroskopisten ska vara erfaren för att minska risken för att fel diagnos fastställs. Det föreligger ingen uppenbar skillnad i företagskvalitet mellan de olika kätten.

## REFERENSER

1. Baron S, editor. Medical microbiology. 4:e upplagan. Galveston: The University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996.
2. Kuo CC, Jackson LA, Campbell LA, Grayston JT, Chlamydia pneumoniae (TWAR), Clinical Microbiology, 1995;8:451-456
3. Chlamydia pneumoniae [internet], TWAR; - [2008-2015]. Tillgänglig från: <http://www.twar.se/chlamydia-pneumoniae.html>
4. Falck G, TWAR-epidemin som inte finns, läkartidningen, 2012;109:2196-2197
5. Chlamydia pneumoniae, TWAR, akuta/persisterande infektioner i luftvägarna [internet], Göteborg: Internetmedicin; - [uppdaterad 2014-04-06]. Tillgänglig från: <http://www.internetmedicin.se/page.aspx?id=442>
6. Chlamydia pneumoniae. TWAR [internet], Uddevalla: Praktiskmedicin; - [uppdaterad 2014-01-16]. Tillgänglig från: <http://www.praktiskmedicin.se/sjukdomar/chlamydia-pneumoniae-twar/>
7. Barnes RC, Laboratory Diagnosis of Human Chlamydial Infections, Clinical Microbiology, 1989;2:119-136
8. Peeling R, Wang SP, Grayston JT, Blasi F, Boman J, Clad A, Freidank H, Gaydos CA, Gnarp J, Hagiwara T, Jones RB, Orfila J, Persson K, Puolakkainen M, Saikku P, Schachter J. Chlamydia pneumoniae Serology: Interlaboratory Variation in Microimmunofluorescence Assay Results. Oxford Journals. 2000;181:426-429
9. Kjellander J, Danielsson D. Klinisk mikrobiologi. 1:a upplagan. Stockholm: Almqvist & Wiksell AB;1973