

Etiološka dijagnostika atipičnih pneumonija

Etiological Diagnosis of Atypical Pneumonias

Oktavija Đaković Rode

Klinika za infektivne bolesti "Dr. Fran Mihaljević"

10000 Zagreb, Mirogojska c. 8

Sažetak Najčešći uzročnici atipičnih pneumonija su *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydophila pneumoniae* i *Legionella pneumophila*, rjeđe *Chlamydophila psittaci* i *Coxiella burnetii*. Atipične pneumonije mogu biti uzrokovane i različitim virusima. Kliničke i radiološke značajke atipičnih pneumonija nisu specifične i definitivna dijagnoza ovisi o laboratorijskim testovima. Za postavljanje specifične dijagnoze rabe se kultivacija uzročnika, serološke metode, izravno određivanje antigena i molekularne metode. Određivanje etiologije atipičnih pneumonija primarno se temelji na serologiji. Serološkim testiranjem dijagnoza se obično postavlja retrospektivno. Visoki titar protutijela ili četverostruki ili veći porast titra između akutnog i rekonvalescentnog seruma smatra se dijagnostičkim u pacijenata s prisutnim kliničkim simptomima atipične pneumonije. Nijedan dijagnostički test samostalno ne ispunjava sva očekivanja za postavljanje dijagnoze, budući da serološki odgovor može biti različit, kultivacija je zahtjevana i dugotrajna, a molekularne metode nisu standardizirane. Istodobnom uporabom različitih metoda, neodgovornim testiranjem akutnog, a zatim parnog seruma, određivanjem antigena i ako je moguće kultivacijom uzročnika, etiologija atipičnih pneumonija može se definirati brže i sigurnije. Komunikacija i suradnja kliničara i mikrobiologa osnovne su za postizanje zadovoljavajućih rezultata. Glavni razlozi za određivanje etiologije atipičnih pneumonija su potvrda adekvatno ordinirane empirijske terapije, rasvjetljavanje epidemiologije i kontrola epidemija.

Ključne riječi: atipična pneumonija, dijagnostika, serološka dijagnostika, *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae*, *L. pneumophila*, *C. psittaci*, *C. burnetii*

Summary The most common agents associated with atypical pneumonias are *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydophila pneumoniae* and *Legionella pneumophila*. *Chlamydophila psittaci* and *Coxiella burnetii* have been rarely reported. Atypical pneumonia could be also caused by a variety of viral agents. The clinical and radiological features of atypical pneumonia are not specific, and diagnosis depends on laboratory tests. Laboratory tests available for specific diagnosis include culture, serology, direct antigen detection and molecular methods. The etiology of atypical pneumonia is primarily based on serology. Definitive diagnosis through serologic testing is usually retrospective. Either a high initial titer or a fourfold or greater rise between the acute and convalescent serum is considered diagnostic in patients with clinical symptoms of atypical pneumonia. Serologic response can differ, cultures are cumbersome and time-consuming, and molecular methods are not standardized. Therefore, none of the available diagnostic tests fulfills all expectations in a diagnosis of atypical pneumonia. Only the simultaneous combination of different methods, immediate testing of acute and later of paired sera, antigen detection and, if possible, cultivation of pathogens, can define the etiology of atypical pneumonia more promptly and accurately. Communication and cooperation among clinicians and microbiologists is essential for successful results. The key reason to make a definitive etiological diagnosis of these atypical pathogens is to approve the prescription of empiric therapy, clarify the epidemiology of the disease, and control disease outbreaks.

Key words: atypical pneumonia, diagnostics, serology, *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae*, *L. pneumophila*, *C. psittaci*, *C. burnetii*

Akutne respiratorne infekcije najraširenije su i najčešće bolesti čovjeka. Relativno kratka inkubacija, kratkotrajni imunitet i prijenos kapljicama ili aerosolom daju im posebno medicinsko, ali i socioekonomsko značenje. Kliničke manifestacije ovise o vrsti mnogobrojnih biološki različitih uzročnika. Različiti uzročnici uzrokuju iste kliničke simptome pa je brza dijagnostika vrlo važna radi primjene liječenja i specifičnih mjera prevencije (1, 2).

Uzročnici atipičnih pneumonija su mikroorganizmi čija se patogeneza, klinička slika i prirodni tijek bolesti razlikuju od klasične tipične pneumokokne infekcije. Najčešći uzročnici atipičnih pneumonija su *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydophila pneumoniae* i *Legionella pneumophila*. Atipične pneumonije mogu biti i zoonoze koje uzrokuju *Chlamydophila psittaci* i *Coxiella burnetii*. Respiratorni virusi također mogu uzrokovati pneumonije. U mlađe djece najčešći je

respiratorni sincicijski virus (RSV) i virus parainfluece, a u starije djece i mlađih odraslih adenovirusi. U vrijeme epidemije influence bilježi se veća pojava pneumonija u starijih odraslih osoba (3).

M. pneumoniae, *C. pneumoniae* i *L. pneumophila* dobro su poznati uzročnici koji zahtijevaju posebno liječenje. Ni jedan ne raste na standardnim bakteriološkim podlogama; ni jedan se ne može identificirati bojenjem po Gramu i ni jedan ne reagira na standardnu terapiju penicilinom ili cefalosporinom koji se često rabe u terapiji pneumonija. Problemi s postavljanjem etiološke dijagnoze pneumonija predmet su mnogih studija budući da nema jednostavne, sigurne i jeftine metode koja bi dala brz rezultat. Ipak, racionalno bi bilo utvrditi etiologiju bolesti radi odabira prikladne terapije za pojedine uzročnike čime se ograničava nepotrebna upotreba antibiotika te sprečavaju posljedice njihove neracionalne primjene (1, 4, 5).

Etiološka dijagnoza može se utvrditi izravno, tj. dokazom uzročnika u kliničkome materijalu i neizravno dokazom specifičnog imunosnog odgovora na infekciju serološkim testovima. Serologija obuhvaća dijagnosticiranje bolesti određivanjem reakcije protutijela i antigena. Najčešće se rabi za dijagnostiku uzročnika koji se ne mogu uzgojiti ili se uzgajaju vrlo teško, u koje spadaju i uzročnici atipičnih pneumonija (virusi, teško uzgojive bakterije – *M. pneumoniae*, *C. burnetii*, *C. pneumoniae*, *C. trachomatis*, *C. psittaci*, *L. pneumophila*). U diferencijalnodijagnostičke postupke zbog netipičnosti kliničke slike često treba uključiti određivanje protutijela na različite uzročnike. Pojedini antigeni mogu stvarati ukriženo reaktivan imunosni odgovor. Za pravilnu interpretaciju nužno je evaluirati rezultate testiranja u skladu s anamnezom, kliničkom slikom i epidemiološkim podacima.

Serološka dijagnostika

Općenito, u serologiji se prate značajke humoralnog imunosnog odgovora. Određivati se mogu specifična protutijela razreda IgM, IgG, IgA. U primarnoj infekciji (prvi kontakt s nepoznatim antigenom) prvo se pojavljuju protutijela IgM. Desetak dana kasnije dolazi do stvaranja protutijela IgG koja postepeno rastu. Dinamika stvaranja protutijela može se pratiti određivanjem titra, tj. količine protutijela. Serološka dijagnostika temelji se na određivanju protutijela u parnim serumima. Serum akutne faze (prvi ili akutni serum) u pravilu se uzima što ranije na početku bolesti, a serum rekonvalescentne faze (drugi ili parni serum) općenito 2-3 tjedna kasnije. Uzročnici atipičnih pneumonija mogu stvarati kasnu serokonverziju, tj. promjenu negativnog nalaza protutijela u pozitivan, nakon 4-9 tjedana i dulje, pa je ponekad potrebno uzeti i treći serum (6).

Određivanje protutijela IgM uglavnom omogućava brzi način postavljanja dijagnoze akutne bolesti. Međutim, postoje brojni problemi u interpretaciji reaktivnog

odgovora IgM, kao što su interferencija reumatoidnog faktora, poliklonska aktivacija, reinfekcija ili nejasna perzistencija IgM godinama nakon primarne infekcije. Reaktivni odgovor IgM nije obvezni pokazatelj akutne infekcije. Za sigurnu potvrdu dijagnoze treba dokazati serokonverziju i/ili značajan porast titra IgG u parnim serumima. Prisutnost samo protutijela IgG u jednom uzorku seruma pokazatelj je kontakta s antigenom u nedefinirano vrijeme. Izrazito visoki titar specifičnih protutijela IgG (najmanje četiri puta veći od granične vrijednosti testa, odnosno dva puta za enzimski imunotest) u serumu koji je uzet u vremenu između akutne i rekonvalescentne faze bolesti može upućivati na akutnu infekciju. To je vjerojatni dokaz infekcije budući da su stvaranje i količina protutijela individualno različiti i ovisni o metodi testiranja. Serološka dijagnostika temelji se na rezultatima testiranja parnih seruma. Uspoređivati se mogu samo rezultati testiranja parnih seruma obrađenih istom metodom, u isto vrijeme i u istom laboratoriju. Brojni su problemi povezani sa serološkom dijagnostikom. Jedan od glavnih problema je relativno dugo vrijeme potrebno za potvrdu dijagnoze. U imunokompromitiranih pacijenata imunosni odgovor može biti reduciran ili izostati. I u djece imunosni odgovor može biti odgođen. Protutijela IgG mogu se pasivno prenijeti transfuzijama krvi i krvnih produkata, odnosno transplacentarno (7).

Specifična protutijela mogu se određivati različitim metodama kao što su imunoenzimski test (EIA, ELISA), neizravna imunofluorescencija (IFA), imunoblot testovi (*western blot*, WB), radioimunotest (RIA), reakcija vezanja komplementa (RVK), aglutinacija te precipitacija. Novije metode (EIA, IFA, WB) omogućuju detekciju specifičnih protutijela IgM, IgG, IgA i imaju bolju osjetljivost, specifičnost i reproducibilnost nego primjerice RVK koja detektira ukupna protutijela.

Svaki rezultat serološke pretrage treba smatrati reaktivnim odgovorom specifičnih protutijela na antigen. Jedino je sigurno da se protutijela stvaraju kao odgovor na antigeni poticaj. Značenje nalaza kao potvrde izvora i akutnosti infekcije treba pažljivo sagledati u sklopu kliničke slike, anamnestičkih i epidemioloških podataka. Za interpretaciju serološkog nalaza važno je poznavanje vremena infekcije u kojem se serum uzima, specifičnosti i osjetljivosti testa, referentnih vrijednosti testa te zamki mogućih lažno pozitivnih i lažno negativnih rezultata. Najbolji su testovi koji imaju visoku osjetljivost i specifičnost. Važno je nadalje poznavati pozitivnu prediktivnu vrijednost testa koja je povezana s prevalencijom ispitivane infekcije u populaciji.

Serološke metode detektiraju imunološku potvrdu infekcije dokazom prisutnosti specifičnih protutijela koja se pojavljuju s napredovanjem infekcije. Reakcija vezanja protutijela i antigena na kojoj se temelji serologija može se iskoristiti i za dokaz antigena u kliničkome materijalu na samom početku bolesti. Metode koje izravno detektiraju antigene mikroorganizama nisu značajno modificirane ranijim liječenjem, dok

stvaranje protutijela može biti suprimirano ranim uvođenjem antibiotika. Testovi koji omogućavaju brzu detekciju mikroorganizama u kliničkim materijalima sve su dostupniji. Izravna dijagnostika omogućava identifikaciju uzročnika u kliničkim uzorcima unutar 24 sata vizualiziranjem uzročnika izravnim mikroskopiranjem ili metodama imunološkog bojenja s obilježenim monoklonskim protutijelima te detekcijom antigena ili genskog materijala (nukleinskih kiselina) metodama molekularne biologije (4, 5, 8).

Nakon što se prikupe rezultati svih testiranja, potrebna je pravilna evaluacija rezultata. Svaki test ima specifično značenje i može dati različite informacije za različite populacije i različite kliničke slike. Za pravilnu interpretaciju mikrobioloških nalaza nužna je stoga suradnja kliničara i mikrobiologa, jer ne postoje jednostavni algoritmi interpretacije nalaza. Važno je poznavanje mogućnosti različitih testova kojima se može doći do definitivne dijagnoze iako se svi ne mogu rutinski raditi u svakom laboratoriju. Svaka ustanova trebala bi osigurati metode i dijagnostičke postupke prilagođene problemima populacije, epidemiološkoj situaciji i financijskim mogućnostima (5, 6).

Mycoplasma pneumoniae

M. pneumoniae je najčešći uzročnik atipičnih pneumonija. Uzrokuje oko 20% svih pneumonija u općoj populaciji. Nakon inkubacije od 2 do 3 tjedna, najčešće se manifestira kao traheobronhitis. U oko 3% inficiranih pacijenata razvije se pneumonija. Prijenos je spor i češće se događa u zatvorenim kolektivima. Infekcije se pojavljuju u epidemijama svakih 4-6 godina (9).

Laboratorijski testovi za potvrdu infekcije obuhvaćaju kultivaciju, serologiju i lančanu reakciju polimerazom (PCR). Za rast trebaju obogaćenu podlogu sa serumom, ekstraktom kvasca i metaboličkim supstratima. Na hranjivim podlogama rastu sporo. Za kultivaciju je potrebno 7-21 dan. Uzorci za izdvajanje *M. pneumoniae* i PCR su ispirak ždrijela, sputum i bronhoalveolarni lavat (BAL), a prihvatljiv je i obrisak ždrijela. *M. pneumoniae* je izrazito osjetljiva na vanjske uvjete, posebno na sušenje i toplinu, tako da se uzorak mora brzo inokulirati na odgovarajuću transportnu podlogu. Ako se uzorak ne može odmah transportirati, treba ga pohraniti u hladnjak i transportirati u mokrom ledu. Ako čuvanje ili transport prelazi 24 sata, uzorke u transportnome mediju treba zamrznuti na -70 °C. Kultura ima osjetljivost oko 90%, dok je specifičnost 50-90%, zbog visoke razine nosilaštva u zdravoj populaciji. Općenito, kultivacija je dugotrajan i kompliciran postupak i nije dovoljno osjetljiva za potvrdu dijagnoze (4, 10).

Sve metode kultivacije su jako zahtjevne i spore i nisu široko u upotrebi, tako da se za dijagnostiku infekcija *M. pneumoniae* najčešće rabi serologija, koja se danas smatra "zlatnim standardom" prema kojem se uspoređuju ostali testovi (4, 11). Protutijela

IgM pojavljuju se rano nakon početka bolesti. Najviši titar dosežu nakon 1-4 tjedna. Unutar nekoliko mjeseci dolazi do pada titra IgM. Protutijela IgM mogu perzistirati godinu dana. Protutijela IgG rastu sporije od IgM, ali dugo ostaju povišena. Značajan porast titra IgG u parnim serumima upućuje na akutnu infekciju ili reinfekciju. U reinfekciji protutijela IgM ne moraju biti detektibilna. Protutijela IgA mogu biti pokazatelj akutnosti. U starijih pacijenata u kojih je veća vjerojatnost reinfekcije, protutijela IgA pojavljuju se u višim titrovima. Za potvrdu dijagnoze treba uzeti parni serum u razmaku od 2 do 4 tjedna u kojem će se dokazati serokonverzija ili najmanje dvostruki porast titra protutijela u imunoenzimskim testovima, odnosno četverostruki ili veći porast titra protutijela u testovima RVK (12). RVK se temelji na glikolipidnim antigenima. Ta mješavina glikolipida nije specifična za *M. pneumoniae*. Slične molekule nalaze se u humanim tkivima, streptokokima i povrću, što uzrokuje ukriženu reaktivnost i moguć lažno pozitivan rezultat. Protutijela u testu RVK perzistiraju nekoliko godina nakon infekcije pa je za potvrdu dijagnoze nužno testiranje parnih seruma uzetih u razmaku od oko 2 tjedna (4, 5, 8).

Imunoenzimski test (EIA) specifičniji je i osjetljiviji od RVK i omogućava određivanje protutijela IgM, IgG i IgA. Najspeficijasniji su serološki testovi koji kao antigen rabe membranski protein athezina P1 koji je glavni imunogen. Pouzdana dijagnoza temelji se i za testove EIA na određivanju dinamike protutijela u parnim serumima (9-11).

M. pneumoniae ima sposobnost hemadsorpcije što se rabi u dijagnostičkom postupku hladne aglutinacije. Povišena razina hladnih aglutinina može upućivati na akutnu infekciju *M. pneumoniae*. Hladni aglutinini su protutijela IgM koja reagiraju s antigenom I na membrani eritrocita što uzrokuje njihovu aglutinaciju na +4 °C. Stvaraju se tijekom prvog do drugog tjedna bolesti u ~30-50% slučajeva i perzistiraju nekoliko tjedana. Titar od 128 ili četverostruki ili viši porast titra između akutnog i rekonvalescentnog seruma upućuje na recentnu infekciju, no test nije specifičan. Hladni aglutinini mogu biti inducirani u različitim virusnim infekcijama (adenovirusi, influenza, RSV, Epstein-Barrov virus), kao i u kolageno-vaskularnim bolestima i mijelomu. Određivanje hladnih aglutinina ima nisku specifičnost i ne preporučuje se za dijagnostiku infekcija *M. pneumoniae* (11).

Zbog ograničenja koja imaju kultivacija i serologija sve se više kao alternativni dijagnostički postupci evaluiraju molekularne dijagnostičke metode kao što je PCR iz respiratornih uzoraka. Iako je objavljeno nekoliko radova koji su opisali visoku osjetljivost i specifičnost metode PCR, nema dogovora o optimalnom uzorku, postotku inhibicije PCR i interpretaciji rezultata. PCR za *M. pneumoniae* ne razlikuje aktivnu infekciju od nosilaštva *M. pneumoniae*. Detekcija *M. pneumoniae* u respiratornom traktu nije nužno povezana s bolesti respiratornog trakta, posebno u imunokompetentnih

Tablica 1. Dijagnostika infekcija koje uzrokuje *M. pneumoniae* (5)

Metoda	Uzorak	Osjetljivost %	Specifičnost %	Potrebno vrijeme	Komentar
Kultivacija	sputum, BAL, ispirak nazofarinksa	>90	50-90	7-10 dana	selektivne podloge; izolate treba specficirati pomoću DNK-proba
Serologija					
RVK	serum	75-80	80-90	4-9 tjedana	akutni i rekonvalescentni serum
Hladna aglutinacija	serum	33-75	<50	2-6 tjedana	IgM-protutijela za antigene I eritrocita nisu specifična
ELISA	serum	92-98	74-99	2-4 tjedna	detekcija specifičnih IgM, IgG, IgA; akutni i rekonvalescentni serum
PCR	sputum, BAL, ispirak ždrijela, obrisak nazofarinksa	95	95-99	2 dana	nije komercijalno dostupno

Legenda:

RVK = reakcija vezanja komplementa

ELISA = imunoenzimski test

PCR = lančana reakcija polimerazom

BAL = bronhoalveolarni lavat

Tablica 2. Interpretacija nalaza specifičnih protutijela za *M. pneumoniae*

Infekcija / bolest	Nalaz protutijela		
	IgM	IgG	IgA
Sadašnja infekcija	+	- / +	- / +
Infekcija u neodređenom vremenu	-	+	-
Akutna infekcija (reinfekcija)	-	- / +	+

Legenda:

+ = pozitivno

- / + = negativno ili pozitivno

- = negativno

pacijenata. Stoga se serološki testovi trebaju izvoditi kao dodatni uz PCR za razlikovanje akutne od perzistentne infekcije (5, 12-14).

Nedostatak brze, prihvatljive i sigurne dijagnostike za *M. pneumoniae* značajan je razlog da se velik broj infekcija ne dijagnosticira (tablica 1). Zbog zahtjevnih uvjeta rasta i duge inkubacije rijetki laboratoriji kultiviraju *M. pneumoniae*. Serološka testiranja smatraju se dijagnostičkom metodom izbora uz pravilnu interpretaciju rezultata (tablica 2).

Klamidijske pneumonije

Sve do 1999. godine u redu *Chlamydiales*, porodici *Chlamydiaceae* nalazio se jedan rod *Chlamydia* koji je obuhvaćao četiri poznate vrste klamidija: *C. trachomatis*, *C. psittaci*, *C. pecorum* i *C. pneumoniae*. Analizama gena 16S i 23S rRNK postavljena je nova taksonomska klasifikacija prema

kojoj je rod *Chlamydiales* razdvojen u 4 porodice: *Chlamydiaceae*, *Simkaniaceae*, *Parachlamydiaceae* i neimenovanu porodicu s vrstom *Waddlia*. Porodica *Chlamydiaceae* sadržava rod *Chlamydia*, koji obuhvaća vrste *C. trachomatis*, *C. muridarum* i *C. suis* te rod *Chlamydophila*, koji obuhvaća *C. pneumoniae*, *C. pecorum*, *C. psittaci*, *C. abortus*, *C. caviae* i *C. felis*. Respiratorne infekcije uzrokuju *C. pneumoniae*, *C. psittaci* i *C. trachomatis* (15).

C. pneumoniae uzrokuje različite respiratorne infekcije (bronhitis, faringitis, sinusitis, pneumoniju). Infekcija je česta i najčešće se stječe u djetinjstvu nakon pete godine života, u adolescenciji i ranoj odrasloj dobi. Oko polovice populacije dvadesetogodišnjaka ima protutijela za *C. pneumoniae*. Seroprevalencija u pedesetim godinama života dostiže oko 70%. Uzrokuje 5-15% izvanbolnički stečenih pneumonija. Većina pneumonija je blaga i povezana s niskim mortalitetom. Reinfekcije su česte. Infekcija se dokazuje kultivacijom, detekcijom DNK, metodom PCR i

Tablica 3. Dijagnostički testovi za dokazivanje *C. pneumoniae*

Metoda	Uzorak	Osjetljivost %	Specifičnost %	Potrebno vrijeme	Komentar
Kultivacija	obrisak nazofarinksa	50-85		6 dana	kultivacija na HeLa ili Hep-2 stanicama; potrebne posebne transportne podloge
Serologija					
MIF	serum	50-90	nepoznato	4-6 tjedana	četverostruki porast titra između akutnog i rekonvalescentnog seruma ili jedan titar IgM >20 ili jedan titar IgG >512
RVK	serum	30-40	<50	4-6 tjedana	ukrižena reaktivnost s <i>C. trachomatis</i> i <i>C. psittaci</i>
PCR	obrisak nazofarinksa, bronhoalveolarni lavat	80-90	>85	2 dana	nije komercijalno dostupno

Legenda:

MIF = mikroimunofluorescencija

RVK = reakcija vezanja komplementa

PCR = lančana reakcija polimerazom

serološki, određivanjem specifičnih protutijela (tablica 3). Klamidije su obvezni unutarstanični mikroorganizmi pa se njihovo izdvajanje može izvesti samo na staničnim kulturama. Općenito, kultivacija se još uvijek smatra "zlatnim standardom" za klamidijske infekcije, iako je vrlo zahtjevna i dugotrajna (3-7 dana). *C. pneumoniae* se teže kultivira na staničnim kulturama nego *C. trachomatis* i *C. psittaci*, a može se identificirati komercijalno dostupnim testovima sa specifičnim obilježenim monoklonskim protutijelima. Testovima s monoklonskim protutijelima u mikroskopskim preparatima kliničkih uzoraka detektiraju se elementarna tjelešca klamidija. U usporedbi s kultivacijom test izravne imunofluorescencije ima osjetljivost 75-85%, a specifičnost 98-99%, no test je zahtjevan i potrebno je veliko iskustvo u mikroskopiranju (5, 6, 8).

U primarnoj klamidijskoj infekciji dominantan je odgovor protutijela IgM koja se pojavljuju unutar 2-4 tjedna nakon infekcije. Odgovor IgG može biti odgođen, a nastaje unutar 6-8 tjedana. Do gubitka IgM nakon primarne infekcije dolazi unutar 2-6 mjeseci. Sekundarnu klamidijsku infekciju, reinfekciju, karakterizira odsutnost IgM i brzi porast protutijela IgG i IgA (za 1-2 tjedna), koji dosežu više razine. Protutijela IgA brže se smanjuju nakon terapije i eradikacije infekcije. U kroničnoj ili rekurentnoj infekciji prevalencija IgM je niska, a kao imunološki marker mogu se pojaviti protutijela IgA. Dijagnostički kriterij za klamidijsku infekciju je prisutnost protutijela IgM u titru od 20 ili višem (uz potvrdu serokonverzije IgG), visoka razina IgG u titru od 512 ili višem, četverostruki porast titra protutijela ili serokonverzija u parnom serumu. Parni serum treba uzeti 2-3 tjedna nakon seruma akutne faze. Uloga protutijela IgA kao markera akutne ili kronične infekcije nije potpuno razjašnjena budući da

proizvodnja protutijela IgA nije konstantna. Protutijela IgA u titru većem od 32 predstavljaju vjerojatni dokaz aktivnosti infekcije (tablica 4) (4, 5, 15).

Tablica 4. Interpretacija rezultata testa mikroimunofluorescencije za klamidijske infekcije

Tip infekcije	Mikroimunofluorescencija (MIF) Protutijela
Akutna	IgM titar >20 Četverostruki porast titra IgG Četverostruki porast titra IgA
Kronična	Perzistentna prisutnost povišenih razina IgG i IgA

Metoda izbora za dijagnostiku klamidijskih infekcija je test mikroimunofluorescencije (MIF). Test MIF može razlikovati vrste klamidija, kao i razrede imunoglobulina u imunosnom odgovoru. Moguće je kvantitativno određivanje specifičnih protutijela reaktivnih na elementarna tjelešca klamidija. Ponekad je teško dokazati porast titra protutijela zbog prisutnosti kronične perzistentne klamidijske infekcije.

U serološkoj dijagnostici klamidija mogu se rabiti i metode RVK i EIA. U RVK određuju se protutijela specifična za lipopolisaharide roda klamidija, tako da nije moguće razlikovanje prema vrsti, pa metoda ima manju specifičnost od MIF. Antibiotička terapija može odgoditi ili smanjiti proizvodnju protutijela koja vežu komplement što smanjuje osjetljivost testa. U EIA za određivanje protutijela kao antigeni se najčešće rabe lipopolisaharidi izdvojeni iz specifičnih elementarnih tjelešaca. Postoji problem ukrižene reaktivnosti koji se

pokušava riješiti uvođenjem imunoenzimskih testova u kojima se kao antigeni rabe sintetski peptidi koji su specifični za vrstu klamidija (5, 8, 12, 15).

C. psittaci je uzročnik psitakoze, ubikvitarne bolesti ptica, za koju je čovjek slučajni domaćin. Ptice izlučuju klamidije fecesom, a infekcija se prenosi aerosolom. Zbog velike kontagioznosti i opasnosti od širenja, izolacija *C. psittaci* smije se izvoditi samo u specijaliziranim laboratorijima u biološki sigurnom kabinetu razine 3, tako da se rutinski ne radi. Dijagnoza se temelji na serološkim testovima. Test RVK nije species-specifičan za klamidije, a osjetljivost mu je oko 50%. Test mikroimunofluorescencije (MIF) smatra se metodom izbora za razlikovanje *C. psittaci* od drugih vrsta klamidija. Serokonverzija ili četverostruki porast titra protutijela smatra se dijagnostičkom potvrdom akutne psitakoze. Odgovor protutijela može biti odgođen ili pritajen nakon uvođenja antibiotske terapije (4, 15).

C. trachomatis uzrokuje infekcije respiratornog trakta u novorođenčadi majki koje imaju genitalnu infekciju. U 10-20% novorođenčadi inficiranih majki razvit će se pneumonija. Dijagnoza se postavlja izolacijom uzročnika iz obriska konjunktive ili nazofarinksa na staničnoj kulturi. Inkluzije na staničnoj kulturi boje se jodom ili se identificiraju monoklonskim protutijelima obilježenim fluorescentnom bojom. Dostupne su metode detekcije antigena imunoenzimskim testom i imunofluorescencijom koje imaju izvrsnu osjetljivost i specifičnost kad se testiraju uzorci iz oka, ali znatno slabiju osjetljivost kad se testiraju uzorci iz respiratornog trakta. Postoje brojni testovi amplifikacije *C. trachomatis* iz genitourinarnog trakta, no ni jedan nije prilagođen za respiratorne uzorke. "Zlatni standard" za dijagnostiku infekcija *C. trachomatis* je metoda umnožavanja nukleinske kiseline zajedno s kultivacijom na staničnoj kulturi za uzorke koji su zbog prisutnosti inhibitora negativni u testovima amplifikacije nukleinskih kiselina (4, 15).

Nalaz protutijela IgG za *C. trachomatis* ili *C. psittaci* u testu MIF veći od 64 može upućivati na sadašnju ili nedavnu infekciju koju treba potvrditi u parnom serumu zbog mogućeg ukriženog imunogenog odgovora. *C. psittaci* stvara kasnu serokonverziju nakon više od 4 tjedna pa sukladno s tim parni serum treba uzeti u adekvatno dugom razmaku.

Najvažniji napredak u području dijagnostike klamidijских infekcija bio je razvoj molekularnih dijagnostičkih postupaka umnožavanja nukleinskih kiselina. Najčešće se rabi metoda PCR. *C. pneumoniae* se metodom PCR može determinirati iz sputuma, leukocita periferne krvi i tkiva. PCR može identificirati rod, vrstu i specifičan soj. Specifičnost PCR se procjenjuje na 95-100%. Zbog prisutnosti inhibicijskih čimbenika osjetljivost je varijabilna. PCR za *C. pneumoniae* nije u široj upotrebi zbog nedovoljne standardizacije metode (4).

Općenito za dijagnostiku klamidijских infekcija stanične kulture za izdvajanje rutinski nisu dostupne, već su

vezane uz istraživačke laboratorije; PCR nije dovoljno standardiziran, a serologija zahtijeva strogu i pravilnu evaluaciju i interpretaciju rezultata. Serološke metode su najrašireniji dijagnostički postupci za klamidijске respiratorne infekcije. Glavni dijagnostički kriterij je dokaz četverostrukog porasta titra protutijela između akutnog i rekonvalescentnog seruma. Problem dijagnostike *C. pneumoniae* jest izostanak postavljanja etiološke dijagnoze u optimalno vrijeme za uvođenje ciljane terapije, tako da je terapija najčešće empirijska (12).

Legionella pneumophila

Porodica *Legionellaceae* obuhvaća 45 vrsta i više od 60 serogrupa. Većinu legionelozu uzrokuju *Legionella pneumophila*, i to serogrupe 1. *L. pneumophila* obuhvaća 14 serotipova od kojih je serogrupa 1 odgovorna za oko 80% bolesti (16, 17).

Izbor dijagnostičke metode ovisi o kliničkoj slici, laboratorijskim mogućnostima (rutinski i istraživački laboratoriji) i pravilnoj interpretaciji rezultata budući da ne postoji dijagnostički "zlatni standard". Ne postoji jedan test koji je brz, dovoljno osjetljiv i specifičan (tablica 5).

Legionele su maleni gram-negativni štapići koji se blijedo boje. Obligatni su spororastući nefermentativni aerobi. Legionele su nutritivno zahtjevne bakterije koje ne rastu na standardnim bakteriološkim podlogama. Za rast trebaju podloge s L-cisteinom, solima željeza i α -ketoglutaratom. Najbolje se izoliraju iz sekreta donjeg dijela respiratornog trakta (sputum, uzorci uzeti bronhoskopijom). Uzorci za izolaciju moraju se uzeti s mjesta infekcije i poslati u laboratorij što je prije

Tablica 5. Neinvazivni testovi za dokazivanje Legionella (5, 22)

Metoda	Osjetljivost %	Specifičnost %	Potrebno vrijeme
Kultivacija sputuma	10-80	100	3-7 dana
Serologija	40-75	95-99	3 (4)-24 tjedna
DFA sputuma	33-70	95-99	2-4 sata
Urinarni antigen	>90	99-100	
• ELISA			2-3 sata
• ICA			15 minuta
PCR (serum, urin, respiratorni uzorci)	33-70	98-100	2-4 sata

Legenda:

DFA = izravni imunofluorescentni test

ELISA = imunoenzimski test

ICA = imunokromatografski test

PCR = lančana reakcija polimerazom

moгуće. Kultivacija legionela je zahtjevna i ne rabi se u kliničkoj rutinskoj dijagnostici (4, 16-19).

Izravna dijagnostička metoda za dokaz legionela je detekcija legionela u respiratornim sekretima i uzorcima tkiva metodom izravne imunofluorescencije (DFA). Rezultat je dostupan za 2-4 sata, no metoda je tehnički zahtjevna i potrebno je veliko iskustvo u mikroskopiranju. Osjetljivost DFA kreće se od 20 do 70%. Specifičnost testa je oko 95%. Mogući su lažno pozitivni rezultati zbog ukrižene reaktivnosti s drugim bakterijama kao što su *Bacteroides fragilis*, *Pseudomonas* sp., *Stenotrophomonas* sp., *Flavobacterium* sp., ali i kontaminacije legionelama iz okoliša. Problem ukrižene reaktivnosti značajno je smanjen upotrebom specifičnih monoklonskih protutijela. Pozitivan rezultat DFA bez dokaza legioneloze dodatnom drugom metodom nije dovoljan za postavljanje dijagnoze (17, 18).

Određivanje antigena *Legionella* u urinu brz je i jeftin test koji rano potvrđuje dijagnozu. Izvodi se kao imunoenzimski test (EIA), odnosno sve rjeđe radioimunotest (RIA). Proizveden je i imunokromatografski test (ICA) koji ima sličnu osjetljivost i specifičnost kao EIA. Rezultati testa se interpretiraju kao prisutnost ili odsutnost vidljive ružičaste do ljubičaste crte koja je rezultat reakcije antigena i obilježenih protutijela. Pozitivan rezultat može se očitati za 15 minuta pa i manje ovisno o koncentraciji antigena koji je prisutan u urinu. Za detekciju antigena *L. pneumophila* serogrupe 1 u urinu navodi se osjetljivost od 70 do 90% uz visoku specifičnost od gotovo 100%. Glavni nedostatak ovog testa je nemogućnost detekcije drugih vrsta i serogrupa legionela. Međutim *L. pneumophila* serogrupe 1 odgovorna je za 80-90% infekcija koje uzrokuju članovi *Legionellaceae*. Antigenurija se može detektirati od trećeg dana nakon pojave simptoma i može perzistirati danima do tjednima. Antigeni legionela mogu se izlučivati u urinu i nekoliko mjeseci, tako da pozitivan test nije uvijek potvrda akutne infekcije. Uvođenje rane terapije može smanjiti izlučivanje antigena. Lažno pozitivan rezultat urinarnog antigena može se javiti u pacijenata sa serumskom bolesti (8, 16, 18, 20).

Za potvrdu dijagnoze akutne legioneloze trebalo bi dokazati specifična protutijela IgM i IgG u parnim uzorcima seruma. Serum akutne faze treba uzeti što ranije, a rekonvalescentni 2-6 tjedana od početka bolesti. Prisutnost samo protutijela IgM nije siguran dokaz akutne infekcije, budući da IgM može perzistirati dulje vrijeme. Do serokonverzije obično dolazi nakon nekoliko tjedana. Većinom se četverostruki porast titra protutijela dokazuje unutar 3-4 tjedna, no ponekad je potrebno i više od 10 tjedana. 20-30% pacijenata detektabilna protutijela stvara kasno, pa prerano uzimanje parnih seruma može biti razlog nedijagnosticiranja legioneloza. Manji dio pacijenata nikad ne stvori detektabilnu serokonverziju. Općenito, u prvom tjednu bolesti 25-40% pacijenata ima detektabilna protutijela. Ako se ni u parnom serumu

uzetom 3 tjedna nakon seruma rane akutne faze ne detektiraju protutijela, a postoji osnovana sumnja da se radi o legionelozi, preporučuje se uzimanje trećeg seruma rekonvalescentne faze. Procjenjuje se da je osjetljivost serologije 75%-80%, a specifičnost oko 96% (5, 21).

Specifična protutijela mogu se određivati metodom imunofluorescencije i imunoenzimskim testom. Dijagnoza se temelji na četverostrukom ili većem porastu titra protutijela između akutnog i rekonvalescentnog seruma. Treba određivati protutijela IgM i IgG budući da neki pacijenti mogu stvoriti mjerljiv samo odgovor IgM. Protutijela IgM mogu perzistirati mjesecima. U sredinama s niskom prevalencijom legioneloze, ako se u pacijenata sa pneumonijom nađe titar protutijela od 256 ili veći, vjerojatno se radi o akutnoj legionelozi (16).

Jedan od glavnih nedostataka serološkog pristupa je retrospektivna priroda testa i mogućnost ukrižene reaktivnosti između legionela i drugih bakterija (17). Radi pronalaženja brzog i učinkovitoga dijagnostičkog postupka nedavno je razvijena metoda PCR za direktnu detekciju DNK iz bronhoalveolarnog lavata, urina, sputuma i seruma. Međutim metoda još nije dovoljno standardizirana ni komercijalno dostupna. Osjetljivost PCR za legionele je slična ili bolja od kultivacije. Amplifikacija nukleinskih kiselina legionela metodom PCR daje brze rezultate i povećava osjetljivost dosadašnjih metoda. PCR ima osjetljivost i specifičnost >90%. PCR može razlikovati vrste i serogrupe legionela (16, 18).

Coxiella burnetii

Coxiella burnetii je striktni unutarstanični mikroorganizam koji uzrokuje Q-vrućicu, široko rasprostranjenu zoonozu. Infekcija *C. burnetii* može biti akutna ili kronična. Oko polovice inficiranih osoba bolest preboli asimptomatski. Težina kliničke slike ovisi o infektivnoj dozi, načinu prijenosa, karakteristikama organizma i imunosnom statusu domaćina. *Coxiella burnetii* u staničnoj kulturi pokazuje promjenu antigene strukture, tzv. faznu varijaciju pri čemu se virulentna faza I mijenja u avirulentnu fazu II. Proces je srodan s prijelazom glatke (*smooth*, S) u hrapavu (*rough*, R) formu lipopolisaharida gram-negativnih bakterija. Fazna varijacija je posljedica mutacijskog brisanja kromosoma što dovodi do promjene lipopolisaharida i prijelaza iz visoko virulentnog oblika faze I u avirulentni oblik faze II. Faza I je infektivna prirodna faza i nalazi se u inficiranih životinja i čovjeka. Faza II nije infektivna, ali je u kulturi superiorna fazi I. Iznenađuje pojava da su protutijela nakon primarne infekcije uglavnom usmjerena na antigene faze II. Pacijenti s kroničnom infekcijom imaju visoke titrove protutijela i za fazu I i za fazu II (23, 24).

Izolacija *C. burnetii* zbog izrazite kontagioznosti može se izvoditi samo u posebno opremljenim laboratorijima

koji posjeduju biološki sigurne kabinete razine 3 i nije rutinski dostupna. Do danas nije razvijen komercijalni test PCR, a ni specifična protutijela za imunokemijske izravne dijagnostičke testove koji stoga nisu u općoj upotrebi. Dijagnoza Q-vrućice temelji se na serološkim testovima. Za definitivnu dijagnozu preporučuje se testiranje akutnog i rekonvalescentnog seruma. Protutijela se obično detektiraju 2-4 tjedna nakon početka bolesti. Serologija omogućava razlikovanje akutne i kronične bolesti. Akutna Q-vrućica potvrđuje se nalazom serokonverzije (četverostruki ili veći porast titra protutijela između akutnog i rekonvalescentnog seruma) ili prisutnosti protutijela IgM na antigene faze II. Kronična Q-vrućica može se dijagnosticirati u jednom serumu koji pokazuje visoki titar protutijela za antigene faze I uz prisutna protutijela u visokom titru za fazu II. Nakon započinjanja terapije za Q-vrućicu, protutijela IgM prva nestaju nakon ~6 mjeseci, a zatim nestaju i protutijela IgA. Postepeno se smanjuju i protutijela IgG koja nikad potpuno ne nestaju. Za serološku dijagnostiku komercijalno su dostupne metode: mikroaglutinacija, RVK, imunofluorescentni (IFA) i imunoenzimski test (ELISA). IFA se smatra referentnom metodom, no ELISA je osjetljivija od IFA. ELISA nije standardizirana za usporedbu rezultata, tako da nije moguće usporediti kvantitativne nalaze (titrove) različitih laboratorija. RVK je manje osjetljiva i vremenski je zahtjevnija od IFA te se ne preporučuje. Serumi oko 20% pacijenata s akutnom Q-vrućicom su antikomplementarni. U nekih pacijenata s kroničnom Q-vrućicom može se javiti fenomen prozone, tj. lažno negativnog rezultata zbog visokog titra protutijela (23-26).

Titar protutijela IFA za fazu I veći od 200 indikativan je za kroničnu infekciju. Protutijela IgG za fazu II \geq 200 i IgM za fazu II u titru \geq 50 u IFA dijagnostička su za akutnu bolest. Protutijela IgG za fazu I i fazu II titra \geq 1600 u IFA metodi visoko su prediktivna za kroničnu Q-vrućicu (endokarditis, hepatitis) (tablica 6) (23, 24).

Zaključak

Uzročnici atipičnih pneumonija su ubičajeni i česti, no u značajnog broja pacijenata uzročnik se ne identificira. Razlog tomu leži u problemima dijagnostičkih postupaka (zahtjevna kultivacija, kasna serokonverzija), ali i u izostanku uključivanja manje čestih uzročnika (*C. burnetii*, *C. psittaci*, virusi) u diferencijalnodijagnostičke postupke. U dijagnostici primjerice legioneloza standardni serološki postupci obuhvaćaju najčešće legionele (*L. pneumophila* serogrupe 1-6), a u urinu se dijagnosticira samo *L. pneumophila* serogrupe 1. Iako *L. pneumophila* serogrupe 1-6 uzrokuje 70-80% svih legioneloza, ostaje mogućnost da legioneloza uzrokovana drugim vrstama ostane nedijagnosticirana.

Tablica 6. Interpretacija nalaza specifičnih protutijela za *C. burnetii*

C. burnetii	Faza II		Faza I	
	IgM	IgG	IgG	IgA
Akutna bolest	+ / ++	++	(+)	-
Kronična bolest				
Granulomatozni hepatitis	++ / +++	+++	+ / ++	- / +
Endokarditis	+ / ++	++ / +++	++ / +++	++ / +++

Legenda:

- + = pozitivno
- ++ = jače pozitivno
- +++ = visoko pozitivno
- = negativno
- / + = negativno ili pozitivno

Problemima interpretacije dijagnostičkih postupaka pridonose i istodobne infekcije s više uzročnika, tzv. koinfekcije. Primjerice *M. pneumoniae* i *C. pneumoniae* uzrokuju ciliostazu što olakšava invaziju drugih patogena, posebno *S. pneumoniae*. *C. pneumoniae* primarno inficira alveolarne makrofage i endotelne stanice pa može uzrokovati kroničnu upalu koja je predisponirajući čimbenik za težu respiratornu infekciju (6, 27).

Ranije epidemiološke studije temeljile su dijagnozu atipičnih pneumonija gotovo isključivo na serologiji. Jedini prihvaćeni kriterij za dijagnozu atipične pneumonije bio je četverostruki porast titra protutijela između akutnog i rekonvalescentnog seruma. Za serokonverziju je ponekad potrebno dulje vrijeme (4-9 tjedana), a serološki odgovor u imunokompromitiranih može biti odgođen ili nedetektabilan. Serološki testovi nisu stoga praktični u akutnoj fazi bolesti. Jedan titar može biti dijagnostički ako je dovoljno visok. S druge strane, kultivacija uzročnika je dugotrajna (4-10 dana), zahtjevna (posebni uvjeti), komplicirana i skupa. Razvijaju se nove metode za brzo određivanje antigena i nukleinskih kiselina. No, molekularne metode nisu standardizirane i zahtijevaju kritičku evaluaciju s obzirom na moguću kroničnu prisutnost uzročnika nevezanih za akutnu bolest. Jedino je kombinacijom različitih metoda i postupaka moguće poboljšati i ubrzati etiološku dijagnostiku atipičnih pneumonija (12).

Utvrđivanje etiologije pneumonija predstavlja racionalan pristup odabiru adekvatne antimikrobne terapije čime se ograničava nepotrebna upotreba antibiotika, smanjuju troškovi i sprečava stvaranje rezistencije zbog neadekvatne terapije. Iako serologija zapravo daje retrospektivnu dijagnozu, dobrom suradnjom kliničara i mikrobiologa i izborom pravilnih dijagnostičkih postupaka, utvrđivanje uzročnika može se postići u zadovoljavajućem vremenu.

Literatura

1. FILE TM. Community-acquired pneumonia. *Lancet* 2003;362:1991-2001.
2. OOSTERHEERT JJ, BONTEN MJ, HAK E, SCHNEIDER MM, HOEPELMAN AI. Severe community-acquired pneumonia: what's in a name? *Curr Opin Infect Dis* 2003;16:153-9.
3. KUZMAN I. Pneumonije: uzročnici, dijagnostika, liječenje. Zagreb: Medicinska naklada, 1999.
4. HINDIYEH M, CARROLL KC. Laboratory diagnosis of atypical pneumonia. *Semin Respir Infect* 2000;15:101-13.
5. SHELHAMER JH, GILL VJ, QUINN TC, CRAWFORD SW, KOVACS JA, MASUR H i sur. The laboratory evaluation of opportunistic pulmonary infections. *Ann Intern Med* 1996;124:585-99.
6. GUPTA SK, SAROSI GA. The role of atypical pathogens in community-acquired pneumonia. *Med Clin North Am* 2001;85:1349-65.
7. HALONEN P, MADELEY CR. The laboratory diagnosis of viral infections. U: Mahy B, Collier L, (ur.) *Topley and Wilson's microbiology and microbial infections*. New York: Arnold, 1998:947-62.
8. RUIZ M, AROSIO C, SALMAN P, BAUER TT, TORRES A. Diagnosis of pneumonia and monitoring of infection eradication. *Drugs* 2000;60:1289-302.
9. HAMMERSCHLAG MR. *Mycoplasma pneumoniae* infections. *Curr Opin Infect Dis* 2001;14:181-6.
10. TALKINGTON D, WAITES KB, SCHWARTZ SB, BESSER RE. Emerging from obscurity: understanding pulmonary and extrapulmonary syndromes, pathogenesis, and epidemiology of human *Mycoplasma pneumoniae* infections. U: Scheld WM, Craig WA, Hughes JM, (ur.) *Emerging infections 5*. Washington: ASM Press, 2001:57-84.
11. WAITES K, RIKIHISA Y, TAYLOR-ROBINSON D. *Mycoplasma* and *Ureaplasma*. U: Murray P, (ur.) *Manual of clinical microbiology*. Washington: ASM Press, 2003:972-90.
12. BARTLETT JG, DOWELL SF, MANDELL LA, FILE JR TM, MUSER DM, FINE MJ. Practice guidelines for the management of community-acquired pneumonia in adults. *Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis* 2000;31:347-82.
13. IEVEN M, GOOSSENS H. Relevance of nucleic acid amplification techniques for diagnosis of respiratory tract infections in the clinical laboratory. *Clin Microbiol Rev* 1997;10:242-56.
14. EDELSTEIN PH. Use of DNA probes for the diagnosis of infections caused by *Mycoplasma pneumoniae* and legionellae-a review. *Adv Exp Med Biol* 1990;263:57-69.
15. MAHONY J, COOMBES BK, CHERNESKY MA. *Chlamydia* and *Chlamydophila*. U: Murray P, (ur.) *Manual of clinical microbiology*. Washington: ASM Press, 2003:991-1004.
16. STOUT J, RIHS JD, YU VL. *Legionella*. U: Murray P, (ur.) *Manual of clinical microbiology*. Washington: ASM Press, 2003:809-23.
17. FIELDS BS, BENSON RF, BESSER RE. *Legionella* and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. *Clin Microbiol Rev* 2002;15:506-26.
18. WATERER GW, BASELSKI VS, WUNDERINK RG. *Legionella* and community-acquired pneumonia: a review of current diagnostic tests from a clinician's viewpoint. *Am J Med* 2001;110:41-8.
19. ROIG J, SABRIA M, PEDRO-BOTET ML. *Legionella* spp.: community acquired and nosocomial infections. *Curr Opin Infect Dis* 2003;16:145-51.
20. WEVER PC, YZERMAN EP, KUIJPER EJ, SPEELMAN P, DANKERT J. Rapid diagnosis of Legionnaires' disease using an immunochromatographic assay for *Legionella pneumophila* serogroup 1 antigen in urine during an outbreak in the Netherlands. *J Clin Microbiol* 2000;38:2738-9.
21. WILKINSON HW, REINGOLD AL, BRAKE BJ, MCGIBONEY DL, GORMAN GW, BROOME CV. Reactivity of serum from patients with suspected legionellosis against 29 antigens of legionellaceae and *Legionella*-like organisms by indirect immunofluorescence assay. *J Infect Dis* 1983;147:23-31.
22. ROIG J, RELLO J. Legionnaires' disease: a rational approach to therapy. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51:1119-29.
23. BROUQUI P, MARRIE TJ, RAOULT D. *Coxiella*. U: Murray P, (ur.) *Manual of clinical microbiology*. Washington: ASM Press, 2003:1030-6.
24. RAOULT D, MEGE J-L, MARRIE T. Q fever: queries remaining after decades of research. U: Scheld WM, Craig WA, Hughes JM, (ur.) *Emerging infections 5*. Washington: ASM Press, 2001:29-56.
25. LA SCOLA B. Current laboratory diagnosis of Q fever. *Semin Pediatr Infect Dis* 2002;13:257-62.
26. WAAG D, CHULAY J, MARRIE T, ENGLAND M, WILLIAMS J. Validation of an enzyme immunoassay for serodiagnosis of acute Q fever. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1995;14:421-7.
27. SHEMER-AVNI Y, LIEBERMANN D. *Chlamydia pneumoniae*-induced ciliostasis in ciliated bronchial epithelial cells. *J Infect Dis* 1995;171:1274-8.

Klavocin® bid

Provjerena Klavocin kvaliteta.



- više od 15 godina kliničkog iskustva u Hrvatskoj
- više od 10.000 zadovoljnih liječnika
- više od 5.000.000 izliječenih bolesnika
- više od 10.000.000.000... nezadovoljnih bakterija

Respiratorne
infekcije

PLIVA  antibiotici