

PŘÍMÁ DIAGNOSTIKA INFEKČÍ *CHLAMYDIA TRACHOMATIS* – průkaz antigenů imunofluorescenční metodou

MUDr. Miroslav Förstl¹, MUDr. Vlasta Štěpánová¹, MUDr. Josef Mlynář, CSc.¹, MUDr. Lenka Plíšková²,
MUDr. Miroslav Fajfr³, prof. MUDr. Miroslav Špliňo^{1,3}

¹Ústav klinické mikrobiologie FN a LFUK Hradec Králové

²Ústav klinické biochemie a diagnostiky FN a LFUK Hradec Králové

³Vojenská lékařská akademie JEP Hradec Králové

Předkládáme výsledky retrospektivní studie zabývající se diagnostikou *Chlamydia trachomatis* pomocí přímé imunofluorescenční metody v letech 1997–2003 ve východočeském regionu České republiky. Chlamydiové infekce dnes patří mezi specialisty, ale i praktickými lékaři, k tak často diskutovaným tématům, že jsme se rozhodli (poněkud netradičně) do úvodu původní práce zařadit také stručné shrnutí celé problematiky. V souboru 6126 vzorků od pacientů s podezřením na chlamydiovou infekci jsme zjistili pozitivitu 14,4 %, z toho v materiálech z urogenitálního systému žen 14,1 % a u mužů 15,2 %, ve stěrech ze spojivek 14,1 %, v materiálech z dolních cest dýchacích 3,7 %.

Úvod

Etiologie a patogenéza

(1, 6, 10, 11, 13)

Chlamydia trachomatis je gramnegativní bakterie. V lidském těle se množí pouze v epitelu urogenitálního systému, spojivek, dýchacích cest, v makrofázích a u chronických infekcí se setkáváme také s poškozením kloubní výstelky nebo endotelu. Manifestace v močových a pohlavních orgánech ji řadí mezi sexuálně přenosné nemoci, nepodléhá hlášení.

Extracelulárně mají chlamydie podobu drobných infekčních **elementárních tělísek** (ET, EB; 250–400 nm). Až v napadených buňkách, tedy **intracelulárně se ET transformuje** v neinfekční, ale metabolicky aktivní **retikulární tělísko** (RT, RB; 800–1200 nm). Již po 8–9 hod. probíhá první **binární dělení**, jehož výsledkem jsou po **kondenzaci dvě nová ET**. To vše za spotřeby „hostitelské“ ATP. Výsledkem vývojového cyklu (obrázek 1) může být až 10 000 nových infekčních elementárních tělísek v jediné buňce. K jejich uvolnění dochází buď rupturou buňky, nebo exocytózou (buňka přežívá = chronická).

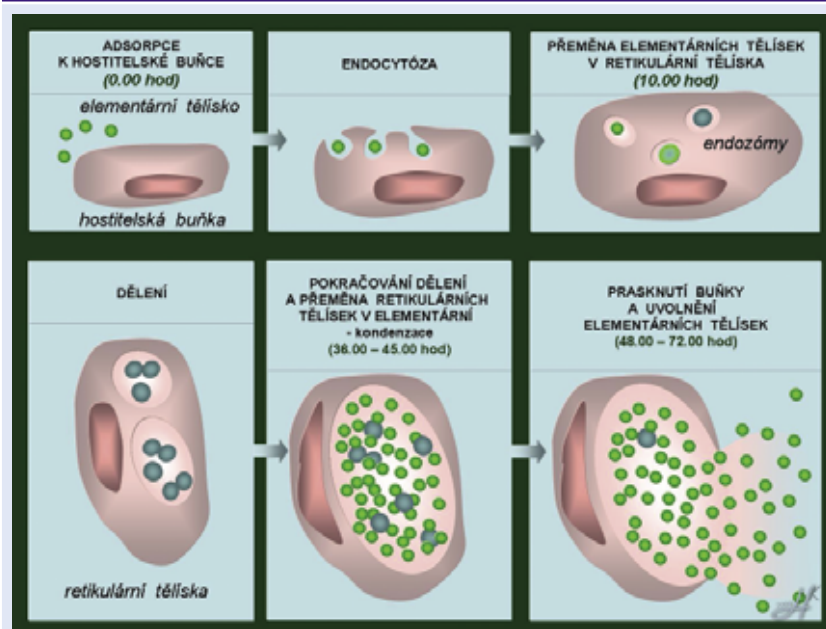
Pro člověka jsou z rodu *Chlamydia* patogenní 4 druhy (tabulka 1 a 2). (Radikální změna v klasifikaci s ustavením nového rodu *Chlamydophila* z roku 1999 se sice dosud nevžila, ale na dalším dělení obou rodů na ještě více druhů taxonomové zarputile pracují.) V této práci se zabýváme pouze druhem *Ch. trachomatis*. Ten lze dále dělit na 18 sérovarů, tomuto dělení odpovídá i klinická manifestace (tabulka 3).

Klinický obraz

(1, 3, 5, 6, 7, 8)

Stručný přehled manifestace chlamydiózy je uveden v tabulce 3 a stejnou formou (tabulka 4) je

Obrázek 1. Vývojový cyklus chlamydií (Schéma Hana Kotlandová)



Tabulka 1. Chlamydie patogenní pro člověka a typické antigeny pro jejich diagnostiku

čeleď	<i>Chlamydiaceae</i>	
rod	<i>Chlamydia</i>	společný rodový lipopolysacharidový (LPS) antigen
druh	<i>Chlamydia trachomatis</i> <i>Chlamydia pneumoniae</i> <i>Chlamydia psittaci</i> <i>Chlamydia pecorum</i>	proteinové antigeny – vnější membránové proteiny (MOMP) pro rozlišení druhů

Tabulka 2. Nové rozdělení čeledi Chlamydiaceae do dvou rodů (1999)

rod	<i>Chlamydia</i>	LPS
druh	<i>Chlamydia trachomatis</i>	MOMP
rod	<i>Chlamydophila</i>	
druh	<i>Chlamydophila pneumoniae</i> <i>Chlamydophila psittaci</i> <i>Chlamydophila pecorum</i>	MOMP

zpracován i přehled o správných odběrech materiálu pro jejich diagnostiku.

Laboratorní diagnostika

(1, 2, 3, 6, 9, 12)

Naše laboratoř disponuje jak metodou přímého imunofluorescenčního (IF) průkazu antigenu, tak jsme schopni nálezy konfirmovat pomocí metody detekce genomu – polymerázovou řetězovou reakcí (PCR). Naše možnosti doplňuje metoda stanovení sérových protilátek. Komplexní hodnocení mikrobiologického materiálu, založené na více metodikách, je dnes pro kvalitní laboratoř nezbytné; jedna jediná naprosto spolehlivá metoda prostě neexistuje!

1. Světelná mikroskopie

(tuto metodu nevyužíváme)

V epitelích v preparátu ze stěru nebo seškrabu obarveném **Lugolovým roztokem** lze nalézt charakteristické buněčné inkluze – u *Ch. trachomatis* totiž obsahují fagosomy napadené buňky

jódem hnědě se barvící glykogen. K dispozici jsou i další barvicí techniky (**Giemsa-Romanowski, dle Macchiavella, dle Gimeneze**).

Fluorescenční mikroskop a průkaz antigenů viz 4.

2. Elektronová mikroskopie

(tuto metodu nevyužíváme)

V odůvodněných případech k dispozici na specializovaných pracovištích.

(Např. Národní referenční laboratoř pro přímou diagnostiku virů, bakterií a cizorodých buněk v klinickém materiálu pomocí elektronmikroskopických metod, Státní zdravotní ústav Praha.)

3. Kultivace

(tuto metodu nevyužíváme)

S kultivací chlamydií se nejen v České republice vzhledem ke značné metodické i časové náročnosti takřka nesetkáme. Vyšetřovaný materiál lze kultivovat na žloutkovém vaku **kuřecího embrya**, na **buněčných kulturách** (McCoy, HeLa),

popř. ho očkovat do mozku, peritonea nebo nosu laboratorní **myši**.

4. Stanovení antigenu

Pro vyšetření přítomnosti antigenu *Ch. trachomatis* pomocí přímé **imunofluorescence** (IF, MIF) je třeba do laboratoře zaslat buď nefixovaný preparát na podložním skle, nebo materiál tekutý (laváž, aspirát, sputum, sperma). Doručený preparát se v laboratoři chemicky fixuje, pak „barví“ konjugátem (monoklonální druhová protilátka proti hlavnímu membránovému proteinu značená fluorescenčním barvivem) a po přidání kapky glycerolu a překrytí krycím sklíčkem se pomocí fluorescenčního mikroskopu hodnotí. Podrobný popis viz „Materiál a metodika“.

Zpracování a odečet je otázkou několika hodin.

Pro stanovení antigenu dále připadají v úvahu i metody **enzymoimunoanalytické** (EIA), nejčastěji v modifikaci ELISA. Problematický však je odběr i zpracování materiálu (buňky epitelu).

5. Detekce genomu

(metodu využíváme, ale její výsledky nejsou součástí této práce)

V současnosti se v diagnostice chlamydií stále více využívají molekulárně biologické metody – podle světových guidelines je nutné použít amplifikační metody buď **polymerázové řetězové reakce (PCR)**, nebo **transkripční mediované amplifikace (TMA)**. V úvahu dále přichází z metod amplifikačních ještě **ligázová řetězová reakce (LCR)** nebo metody bez amplifikace, tzn. **genové sondy**.

Jako materiál slouží stěr na suchém sterilním odběrovém tampónu (popř. speciální komerční souprava), biopsie, moč, krev.

V Laboratoři molekulární biologie (společné pracoviště ÚKBD a ÚKM FN Hradec Králové) používáme 2 metody, obě nested PCR. Je to jednak průkaz DNA *Chlamydia* spp. (primery z oblasti

Tabulka 3. Onemocnění vyvolaná jednotlivými sérovary *Ch. trachomatis*

sérovar	onemocnění
A, B, Ba, C	• trachom (endemicky v tropech a subtropích, v ČR ne)
D, Da, E, F, G, H, I, Ia, J, K	• inkluzní konjunktivitida • uretritida (primární nekapavčitá nebo dokonce postgonokoková uretritida) • epididymitida, prostatitida • cervicitida, endometritida, bartolinitida, salpingitida • chronický zánět v malé pánvi, periapendicitida, perihepatitida • Fitz-Hugh-Curtisův syndrom (akutní perihepatitida) • Reiterův syndrom (konjunktiva, uretra, klouby popř. mukokutánní léze) • reaktivní artritida • proktitida, faryngitida • chlamydiové infekce novorozenců (akutní inkluzní konjunktivitida, pneumonie i za několik měsíců, mesotitida) • pneumonie dospělých • ateroskleróza (?) • astma (?) • některé karcinomy (?)
L1, L2, L2a, L3	• lymfogranuloma venereum (endemicky v tropech a subtropích, v ČR ne)

Tabulka 4. Odběry materiálu na průkaz antigenu

děložní čípek a vagina	po důkladném odstranění hlenu (s ním je preparát nehodnotitelný) provést speciální odběrovou soupravou buď dva samostatné stěry nebo jen jeden společný; získaný materiál nanést v tenké vrstvě na odmaštěné podložní sklíčko a nechat zaschnout
ženská uretra	jeden zaschlý stěr na podložním sklíčku
mužská uretra	pacient před odběrem 2–3 hodiny nemočí; z ústí močové trubice provést sterilní bakteriologickou kličkou razantní stěr epitelů z hloubky cca 4 cm a přenést jej krouživým pohybem do kapky fyziologického roztoku na podložním skle
moč	její hodnocení ať již IF, nebo PCR je přinejmenším sporné – chlamydie jsou v epitelích a sediment vzorku jich nemusí obsahovat dostatek; v případě, že je tento vzorek přesto doporučen, nesmí pacient před odběrem 2–3 hodiny močit a odebírá se první porce
prostatický sekret, sperma	nátěry na sklíčku, sperma je jen obtížně hodnotitelné
oko – spojivka	výtěr z očí může být pro průkaz antigenu problematický materiál, ale jen při chybném odběru; pokud je setřeno dostatečné množství epitelů a jsou ze suchého odběrového tampónu řádně otisknuty (válivým pohybem) na podložní sklo, je odečet celkem snadný a podle porovnání se souběžně provedenou metodou PCR (opět suchý odběrový tampón) spolehlivý
dolní cesty dýchací – laváž (BAL), aspirát, sputum	sediment z laváží a aspirátů je sice vyšetřován až po centrifugaci, přesto je odečet velmi obtížný – nacházíme jen malé množství epitelů, IF vyšetření by mělo sloužit jen pro orientaci a vždy (!) by mělo být doplněno metodou PCR
extirpovaná uzlina	pouze u lymfogranuloma venereum

Chlamydie jsou sice bakterie, ale parazitují intracelulárně a k hodnocení je třeba získat dostatek epitelů, odběry tedy provádějte s náležitou razancí! Sklíčko vždy opatřete štítkem se základními daty pacienta a fixem nebo lépe rydlem na něm přesně označte i místo nanesení materiálu. Při transportu chraňte nefixované preparáty např. buničitou vatou.

MOMP (ompA) genu, produkt o velikosti 930 bp rozdělen na 2% agarózovém gelu barveném ethidiem bromidem) nebo průkaz DNA *Ch. trachomatis* (primery z plazmidové oblasti, produkt o velikosti 108 bp rozdělen na 3% agarózovém gelu barveném ethidiem bromidem).

Výsledek lze získat řádově v hodinách, maximálně dnech.

6. Průkaz specifických protilátek, sérologie (metodu využíváme, ale její výsledky nejsou součástí této práce)

Předcházející diagnostické metody jsou tzv. metody přímého průkazu. Pro nepřímou diagnostiku, tzv. sérologii, slouží sérum (nesmí být chylózní ani hemolytické!) získané ze srážlivé krve. U lokálních zánětů je ale vypovídající hodnota protilátek problematická a v indikovaných případech je vhodné toto vyšetření ordinovat až po konzultaci konkrétního případu s mikrobiologem.

Metody typu komplement fixační reakce (KFR) nebo imunofluorescenční (IF) se již pro stanovení protilátek neužívají, sérologické laboratoře dnes ovládly **enzymoimunoanalýzy (EIA) v modifikaci ELISA**. Pro chlamydie je přesnější konstruovat diagnostické ELISA soupravy s využitím vnějších membránových proteinů (MOMP). A to nejen proto, že jsou charakteristické pro konkrétní druh, ale rodové lipopolysacharidové antigeny (LPS) mohou být sdíleny i jinými bakteriemi! Na druhé straně je nutné počítat s dvojnásobným zvýšením finančních nákladů, protože je prokázáno, že i *Ch. pneumoniae* vzácně vyvolá některé klinické projevy charakteristické pro *Ch. trachomatis* a naopak (konjunktivitida *Ch. pneumoniae*; pneumonie *Ch. trachomatis* u dospělých).

Výsledky jsou dle vybavení laboratoře dostupné do několika hodin nebo dnů po odběru.

I když se v této práci vyšetřováním protilátek dále nezabýváme, tvoří u chlamydióz důležitou součást komplexního diagnostického spektra. Vždy je třeba si uvědomit:

- Tzv. „**diagnostické okno**“ – tedy dobu uběhlou od nákazy do vytvoření dostatečně vysokého množství volných sérových protilátek, které je již daná diagnostická souprava schopna detekovat. U lokálního zánětu může být navíc protilátková odpověď značně opožděná, pokud se dostatečná hladina protilátek vůbec vytvoří.
- Anamnestické protilátky třídy **IgG** nás pouze informují o tom, zda se s touto infekcí pacient v minulosti již setkal. Jejich negativita stejně jako pozitivita nevylučují ani nepotvrzují právě probíhající infekci.
- Pozitivita **IgM** nebo sérových **IgA** protilátek nás informuje o primoinfekci, reinfekci nebo o chronické infekci. Jejich negativita ale nikdy nevylučuje akutní lokální chlamydiózu, při které je ze sčtu pozitivní antigen i průkaz nukleové kyseliny. Na druhé straně při chybném

odběru nebo při chlamydiovém zánětu mimo dosah odběrové soupravy (myometritida, salpingitida, perihepatitida; prostatitida, epididymitida; kloubní projevy) může být právě pozitivita IgM a IgA jediným vodítkem. Interpretacním problémem zůstává dlouhodobé přetrvávání těchto protilátek.

Terapie (4)

Léky vhodné k terapii chlamydióz musí splňovat následující kritéria. Chlamydie by na ně měly být citlivé, terapeutických hladin musí dosahovat v endosomech (přeměna RT na nová ET) a lze je podávat dlouhodobě (týdny). Při léčbě urogenitálních chlamydióz je samozřejmě vždy bezpodmínečně nutné najednou léčit oba/všechny sexuální partnery! V praxi jsme mnohdy svědky vážných organizačních problémů jak ve smyslu „kdo komu předepíše drahá antibiotika“, tak v citlivých otázkách promiskuity a manželské věrnosti.

Za lék volby u akutních stavů (i u všech těhotných a dětí) je dnes považován **azitromycin**, který je transportován makrofágy přímo do místa zánětu. Tento lék má velmi dobrou farmakokinetiku, tkáňovou a buněčnou penetraci. Někteří autoři doporučují **1g/den jednorázově u akutní nekomplikované infekce**, v praxi se ale setkáváme i s dávkováním po dobu 3–5 dní. Cyklickou terapii **1,5g azitromycinu jednou za 7–10 dní** (např. 3 dny 500mg a 4 dny přestávka) **nebo klaritromycin 2 x denně 500mg (nebo 1 x denně 500mg retardované formy) po 2–3 týdny volíme u komplikované nebo chronické formy onemocnění**. Z makrolidů lze použít ještě roxitromycin, spiramycin a josamycin.

Další terapeutickou možností jsou antibiotika tetracyklinová, zejména **doxycyklin v dávkách 2 x denně 100mg po 10 dní**. Na některých pracovištích a u vybraných případů je v praxi dávkovací interval prodlužován až na 30 dní nebo je při dobré toleranci léku dávka dvojnásobná – 2 x denně 200mg po 10 dní. Lék je kontraindikován u dětí do 12ti let a u těhotných. Pozor na hepatotoxicitu, gastro a fototoxicitu.

Lze použít také fluorované chinolony III. generace, zejména **ciprofloxacin 2 x denně 500mg po 7–10 dní** nebo ofloxacin, ale jejich indikace by měla být vyhrazena spíše pro vážnější a chronické stavy, v těchto případech je navíc volena kombinace s výše uvedenými antibiotiky, zejména s azitromycinem. Preferuje se dlouhodobá léčba po dobu

více týdnů, protože eradikace chlamydií in vivo je někdy obtížná, dochází pouze k redukci chlamydií s rizikem vzniku jejich perzistence. Kontrolní odběry 3 týdny po léčbě by měly být samozřejmostí. Chinolony jsou kontraindikovány do 18ti let věku, v graviditě a laktaci, náležitou pozornost je třeba věnovat četným nežádoucím účinkům.

Materiál a metodika

Cílem retrospektivní studie bylo zjistit četnost přítomnosti antigenu *Ch. trachomatis* výše zmíněnou **imunofluorescenční metodou** ve vyšetřovaném souboru vzorků od pacientů s podezřením na tuto infekci (!) z východočeského regionu z let 1997–2003. Pro vyšetření byly použity komerční soupravy Pathfinder od firmy BIO-RAD *Chlamydia trachomatis* direct specimen (Direct antigen detection system), které jsou určeny k detekci membránových proteinů elementárních i retikulárních tělísek všech sérotypů *Ch. trachomatis*.

V uvedeném období byly k vyšetření doručeny **materiály z urogenitálního systému mužů i žen** (stěry z močových trubic; z děložního čípku a vagíny dohromady nebo zvlášť), dále **stěry ze spojivek a materiály z dolních cest dýchacích** (bronchoalveolární laváže, aspiráty a sputa – u těchto vzorků třeba nejprve provést jejich zkapalnění, homogenizaci a koncentraci).

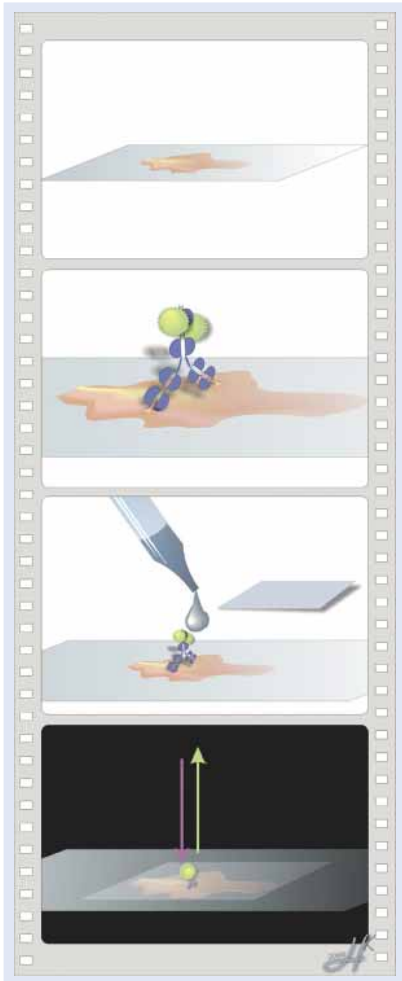
Dle návodu výrobce je postup zpracování následující:

- Fixace preparátu na podložním skle jeho převrstvením 0,5ml vychlazeného roztoku metylalkoholu po dobu 15 min při pokojové teplotě.
- Barvení preparátu pomocí 30 µl myší monoklonální protilátky proti *Chlamydia trachomatis* konjugované s fluoresceinem (FITC) a Evansovou modří po dobu 15 min ve vlhké komůrce při pokojové teplotě. Současně barvíme preparát s negativní a pozitivní kontrolou.
- Opláchnutí skla proudem destilované vody (jemně, pomocí UH stříčky).
- Po oschnutí a aplikaci 1 kapky montovacího média na místo barveného stěru překrytí krycím sklíčkem.
- Hodnocení a interpretace při odečtu v imunofluorescenčním mikroskopu při zvětšení 400–600 x: negativní kontrolní preparáty nesmí vykazovat fluorescenci, pozitivní kontrolní preparát vykazuje jasnou světle zelenou „apple green“ fluorescenci extra a intracelulárně uložených elementárních nebo větších retikul-

Tabulka 5. Počet pozitivních vzorků od pacientů s podezřením na infekci *Ch. trachomatis*, 1997–2003

vzorky	vyšetřeno celkem	pozitivní	pozitivita v %
všechny vzorky	6126	881	14,4
urogenitál ženy	3515	494	14,1
urogenitál muži	2217	337	15,2
spojivky	340	48	14,1
dolní cesty dýchací	54	2	3,7

Obrázek 2. Princip detekce antigenu pomocí přímé imunofluorescence (Schéma Hana Kotlandová).



lárních tělísek; jako pozitivní u urogenitálních vzorků hodnotíme nález 5 a více elementárních tělísek na vzorek, u ostatních materiálů nález 1 a více (obrázky 2, 3, 4 a 5).

Počítačové záznamy ÚKM z let 1997–2003 obsahují údaje o 6126 takto vyhodnocených vzorcích. Potřebná data byla z databáze získána po volbě vhodných denominátorů, po exportu do programu Microsoft Excel byla anonymizována a následně pomocí jednoduchých funkcí téhož programu zpracována.

Výsledky

Pro stručnost a přehlednost jsou zde základní výsledky studie prezentovány jen formou jednoduchých čísel. Podrobné statistické zpracování bude publikováno v urologické a gynekologické odborné literatuře, ale tato data jsou případným zájemcům u autora k dispozici.

Diskuze

Celkové procento pozitivních nálezů antigenu *Ch. trachomatis* v našem souboru vzorků je 14,4 %. U jednotlivých materiálů kolísá v úzkém rozmezí 14,1–15,2 % s výjimkou 3,7 % u vzorků z dolních cest dýchacích (zde ale jde o značně

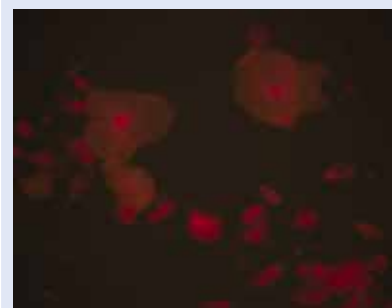
Obrázek 3. Preparát k odečtu; akutní chlamydiový zánět močové trubice ženy (Foto MUDr. Miroslav Förstl).



Obrázek 4. Imunofluorescenční snímek předchozího preparátu; *Ch. trachomatis* masivně pozitivní (Foto MUDr. Miroslav Förstl).



Obrázek 5. Imunofluorescenční snímek negativního nálezu výtěru z pochvy; zachyceny pouze epitelie a další buněčné elementy (Foto RNDr. Ctírad Andrýs, Ph.D.).



problematický materiál, který je obvykle i pro zkušného odborníka obtížně hodnotitelný – právě zde je nezbytné IF vyšetření vždy doplnit o vyšetření PCR). Naše výsledky se nám v rámci České republiky nepodařilo porovnat, jinou podobnou

studii vzorků od pacientů s podezřením na infekci *Ch. trachomatis* se nám i přes značné úsilí nepodařilo najít. Dostupná jsou pouze hodnocení několika málo epidemiologických studií vybraných skupin pacientů, v nich je obvykle uváděna průměrná pozitivita 5–10 %. (3, 6)

Nevyřešeným problémem nadále zůstávají chronické chlamydiozy ve vyšších etážích urogenitálního systému, kde existuje možnost negativního sčtu z pro odběr dostupné etáže nižší – nelze než připustit, že takové případy opravdu mohou přímé diagnostice unikát. Zde je pak nutné IF nebo PCR doplnit o průkaz sérových protilátek, správná interpretace výsledků ale i tak zůstává mnohdy svízelná.

Na tomto místě je třeba také zdůraznit, že dle našich zkušeností značný počet pozitivních nálezů zejména z menších laboratoří ne vždy odpovídá skutečnosti! Často jsme totiž v poslední době ošetřujícími lékaři vyzýváni k ověření výsledků jiných laboratoří a mnohé často i „opakovaně pozitivní“ případy (zejména z těch, které disponují pouze jedinou diagnostickou metodou!?) se na našem pracovišti pomocí přímé detekce antigenu a nukleové kyseliny i ze stejného odběru nepotvrdí...

Závěr

Přímá diagnostika infekcí *Chlamydia trachomatis* pomocí průkazu antigenu imunofluorescenční metodou je spolehlivá metoda, která měla a má své místo v diagnostickém spektru mikrobiologických laboratoří. Ke kontrole nebo konfirmaci sporných výsledků je však bezpodmínečně nutné mít k dispozici další metody, např. PCR a průkaz protilátek.

Naše poděkování patří paní Haně Kotlandové (Ústav klinické imunologie a alergologie LF a FN Hradec Králové) za precizně zhotovená schémata a panu Miroslavu Holečkovi (ÚKM) za výraznou pomoc při zpracování dat.

Literatura

1. Bednář M, Fraňková V, Schindler J, Souček A, Vávra J. Lékařská mikrobiologie. Marvil, 1996; 325–333.
2. Cribb P, Scapini JP, Serral E. One-tube Nested Polymerase Chain Reaction for Detection of *Chlamydia trachomatis*. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, September 2002; 97 (6): 897–900.
3. Gebouský P, Kapla J, Kosina P. Doporučené postupy pro praktické lékaře. 2002: <http://www.cls.cz/dp/2002/t230.rtf>
4. Jarčuška P. Liečba chlamydiových infekcií. In: Medková Z, Kalousek I, Jarčuška P. Chlamydiové infekce. Triton Praha, 2001: 72–93.
5. Marešová V. Infekce močových cest. In: Havlík J, et al.: Infekční nemoci. Galén: 2002: 99–103.
6. Medková Z, Kalousek I, Jarčuška P. Chlamydiové infekce. Triton Praha, 2001.
7. Ondrovčík P. Močové infekce. In: Votava M, Ondrovčík P. Vybrané kapitoly z klinické mikrobiologie. Masarykova univerzita Brno, 2000: 61–66.
8. Ondrovčík P. Sexuálně přenosné nemoci. In: Votava M, Ondrovčík P. Vybrané kapitoly z klinické mikrobiologie. Masarykova univerzita Brno, 2000: 66–74.
9. Ong GM, Wyatt DE, ONiell HJ, McCaughey C, Coyle PV. A comparison of nested polymerase chain reaction and immunofluorescence for the diagnosis of respiratory infections in children with bronchiolitis, and the implications for a cohorting strategy. Journal of Hospital Infection, 2001; 49: 122–128.
10. Schachter J, Ridgway GL, Collier L. Chlamydial diseases. In: Collier L, Balows A, Sussman M. Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections, Volume 3, Bacterial Infections. 9 ed., Arnold London, 1998: 977–994.
11. Smith IW. Chlamydie. In: Greenwood D, Slack RCB, Peutherer JF, a kol. Lékařská mikrobiologie. Grada, 1999: 369–377.
12. Votava M. Rod Chlamydia. In: Votava M, a kol. Lékařská mikrobiologie II – Přehled vyšetřovacích metod. Masarykova univerzita Brno, 2000: 204–205.
13. Woznicová V. Chlamydie. In: Votava M, a kol. Lékařská mikrobiologie speciální. Neptun, 2003: 173–176.