

Eerika Pesonen

***CHLAMYDIA TRACHOMATIS*-BAKTEERIN AIHEUTTAMAN INFEKTION
ANALYSOINTI LABORATORIOSSA**

**CHLAMYDIA TRACHOMATIS-BAKTEERIN AIHEUTTAMAN INFEKTION
ANALYSOINTI LABORATORIOSSA**

Eerika Pesonen
Opinnäytetyö
Kevät 2015
Bioanalytiikan koulutusohjelma
Oulun seudun ammattikorkeakoulu

TIIVISTELMÄ

Oulun ammattikorkeakoulu
Bioanalytiikan koulutusohjelma

Tekijä: Eerika Pesonen

Opinnäytetyön nimi: *Chlamydia trachomatis*-bakteerin aiheuttaman infektion analysointi laboratoriossa

Työn ohjaajat: Outi Mäkitalo ja Irja Parkkinen

Työn valmistumislukukausi ja -vuosi: Kevät 2015

Sivumäärä: 35 + 6 liitettä

Klamydiainfektio on yleinen sukupuolitauti ja aiheuttaa vakavimmassa tapauksessa lapsettomuutta. Ennaltaehkäisevistä toimista tai valistuksesta huolimatta vuosittaisten klamydia-infektioiden ilmaantuvuutta ei ole saatu laskemaan vaan uusia infektioita raportoidaan noin 13000 vuodessa. Tämä opinnäytetyö liittyy laajempaan tutkimukseen, jossa tutkitaan kroonisen tai toistuvan klamydia-infektion yhteyttä tahattomaan lapsettomuuteen. Tutkimuksessa hyödynnettiin Terveys 2000 aineistoa, jossa on kerätty tietoa väestön terveydentilasta, hyvinvoinnista ja toimintakyvyn muutoksista.

Tämän tutkimuksen tarkoitus on arvioida seerumista mitattavien vasta-aineiden merkitystä ja soveltuvuutta *Chlamydia trachomatis*-infektion osoittamisessa tai vasta-aineiden yhteyttä lapsettomuuteen. T2000 tutkimuksessa kerätyistä seeruminäytteet analysoitiin vasta-aineet *C.trachomatis*-bakteerin MOMP- ja HSP60-proteiineille.

MOMP-proteiinille spesifisiä vasta-aineita oli 14,1 % kaikista tutkittavista ja naisilla vasta-aineita oli merkittävästi useammin kuin miehillä. Itse raportoituja klamydia-infektioita oli miehillä useammin kuin naisilla, mikä on ristiriidassa THL:n tartuntatautirekisteritiedon kanssa. Tämän perusteella päätellään seerumin MOMP-vasta-aine määrittämisen olevan luotettavampi aiemman klamydia-infektion markkeri kuin itse raportoitu infektio. Tulostemme mukaan klamydia-spesifinen MOMP-vasta-ainetesti erottaa selvästi klamydia-infektion sairastaneet niistä, jotka eivät ole sairastaneet klamydia-infektiota. Yli puolet MOMP-vasta-aine positiivisista näytteistä oli myös HSP60 –positiivisia, mutta HSP60-vasta-aineiden esiintyvyys ei näyttänyt tuovan lisäarvoa aiemman infektion todentamisessa tai lisääntyneen lapsettomuusongelman markkerina.

Opinnäytetyö tutkimus toteutettiin yhteistyössä Terveiden ja hyvinvoinnin laitoksen Seksuaali- ja lisääntymisterveys –yksikön (SELI) kanssa. Laboratoriotyöt toteutettiin SELI yksikön neuvolaserologian laboratoriossa.

Asiasanat:

Klamydia, lapsettomuus, vasta-aineet

ABSTRACT

Oulu University of Applied Sciences
Degree Program in Biomedical Laboratory Science

Author: Eerika Pesonen

Title of Bachelor's Thesis: *Chlamydia trachomatis* infection analysis in the laboratory

Supervisors: Outi Mäkitalo and Irja Parkkinen

Term and year of when the thesis was submitted: Spring 2015

Number of pages: 35 + 6 appendices

Chlamydia is a common sexually transmitted disease and causes the most severe case of infertility. Preventive action or enlightenment, despite the annual incidence of chlamydia infections have not been to count, but new infections are reported about 13,000 a year. This thesis is part of a wider study, which examines the treatment of chronic or recurrent chlamydial infection, contact the unintentional childlessness. The study utilized the Health 2000 data, which is collected on the population's health, well-being and functional capacity changes.

Purpose of this study is to evaluate the measured serum antibodies to the importance and applicability of *Chlamydia trachomatis* infection in demonstrating or antibodies Contact infertility. T2000 study collected serum samples were analyzed for antibodies to the bacterium *C.trachomatis* MOMP- and HSP60 proteins.

MOMP protein-specific antibodies was 14.1% of all subjects and in women of antibodies was significantly more often than men. Self-reported chlamydia infections were more frequent in men than in women, which is inconsistent with the THL infectious disease registry data. Based on the above serum-MOMP antibodies to be more reliable determination of a chlamydial infection earlier than the marker of infection were reported. According to our results chlamydial MOMP-specific antibody test to clearly distinguish chlamydial infection of the patients who do not have a history of *Chlamydia* infection. More than half of MOMP antibody positive samples were also HSP60-positive, but HSP60-prevalence of antibodies did not seem to add value to the verification of a previous infection or increased infertility problem as a marker.

The thesis was carried out in cooperation with National Institute for Health and Welfare. The laboratory work was carried out in their serology laboratory.

Keywords:

Chlamydia, interfility, antibodies

SISÄLLYS

TIIVISTELMÄ.....	3
ABSTRACT	4
1 JOHDANTO	6
1 TUTKIMUKSEN TAUSTA JA TAVOITTEET	7
2 YLEISTÄ KLAMYDIASTA.....	9
3 KLAMYDIAN MIKROBIOLOGIA	11
3.1 Rakenne	11
3.2 Bakteerin lisääntyminen.....	14
3.3 Klamydia-infektion käynnistämä immuunivaste.....	15
3.3.1 Luonnollinen immuuniteetti	16
3.3.2 Hankittu immuuniteetti	17
4 KLIININEN TAUDINKUVA JA OIREET	20
5 DIAGNOSTIIKKA JA TUTKIMINEN.....	22
5.1 Nukleiinihappomonistus	22
5.2 Viljely.....	24
5.3 Antigeenit	25
5.4 Vasta-aineet	26
6. TUTKIMUKSEN AINEISTO JA TOTEUTTAMINEN.....	28
6.1 Tutkimusjoukko ja aineiston hankinta.....	28
6.2 Tutkimusmetodologia	29
6.3. Tutkimuksen laboratoriotyön toteutus.....	29
6.4. Tilastolliset menetelmät	29
7. TULOKSET JA JOHTOPÄÄTELMÄT	30
7.1 Klamydia-spesifiset vasta-aineet.....	30
7.2 C. C.trachomatis –spesifisten vasta-aineet tai diagnosoitu klamydia-infektio lapsettomuuden riskitekijänä.....	32
8 POHDINTA	34
LÄHTEET	36

1 JOHDANTO

Klamydiainfektio on yleinen sukupuolitauti ja aiheuttaa vakavimmassa tapauksessa lapsettomuutta. Vuoden 1996 jälkeen raportoitujen tartuntatapausten määrä nousi tasaisesti vuosittain, mutta on 2000-luvulla tasaantunut noin 13000 vuosittaiseen tapaukseen. Klamydiainfektioihin liittyvä tutkimus on tärkeää seksuaaliterveyden näkökulmasta, koska tartuntatapauksien määrää ei ole ennaltaehkäisevistä toimista huolimatta saatu laskemaan. (THL Tartuntatautirekisteri)

Opinnäytetyössä avataan lukijalle *Chlamydia trachomatis* -bakteerin elinkaarta, tartuntatapaa ja lisääntymistä, sekä käydään läpi *C. trachomatis* -bakteerin aiheuttaman infektion analysointimenetelmiä. Lisäksi opinnäytetyössä kerrotaan laajemmin opinnäytetyössä tehdyn tutkimuksen tarkoituksesta, toteutuksesta, sekä perehdytään tarkemmin klamydiainfektion diagnostiikkaan ja tutkimusmenetelmiin laboratoriossa.

Tutkimus toteutetaan yhteistyössä Terveystieteiden ja hyvinvoinnin laitoksen Seksuaali- ja lisääntymisterveys -yksikön (SELI) kanssa. Laboratoriotyöt toteutetaan SELI yksikön neuvolaserologian laboratoriossa. Tutkimuksen vastuullisena tutkijana, sekä opinnäytetyön työelämän ohjaajana toimii dosentti Heljä-Marja Surcel. Tutkimusryhmän laboratoriotyön toteuttaa allekirjoittanut. Opinnäytetyössä tehdään moniammatillista yhteistyötä kahden Oulun ammattikorkeakoulussa opiskelevan kättilöopiskelijan kanssa. Pipsa Savolainen ja Helena Puusaari tekevät opinnäytetyötä samasta aiheesta oman alansa näkökulmasta keskittyen klamydian aiheuttamaan lapsettomuuteen. Laboratoriotyöstä saadut tulokset jaetaan heidän kanssaan.

1 TUTKIMUKSEN TAUSTA JA TAVOITTEET

Tämän opinnäytetyö liittyy laajempaan tutkimukseen, jonka tavoitteena on selvittää kroonisen tai toistuvan klamydia-infektion yhteyttä tahattomaan lapsettomuuteen. Tämän tutkimuksen tarkoitus on arvioida seerumista mitattavien vasta-aineiden merkitystä ja käyttöä *C. trachomatis*-infektion osoittamisessa. Tutkimuksessa hyödynnetään Terveys 2000 aineistoa, jossa on kerätty tietoa väestön terveydentilasta, hyvinvoinnista ja toimintakyvyn muutoksista.

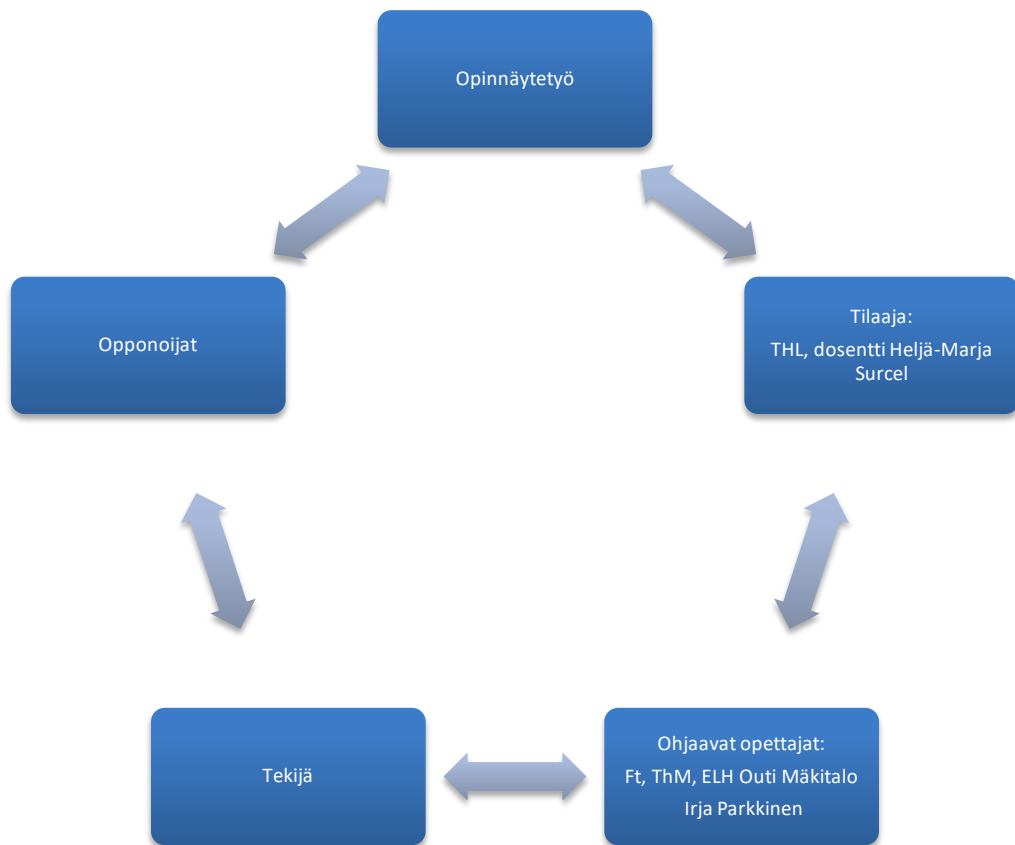
Terveys 2000 kerätyistä seeruminäytteistä tutkitaan *C. trachomatis*-spesifisiä IgG-vasta-aineita klamydian ulkomembraani- (MOMP) ja 60kDa:n lämpöshokkiproteiinia (HSP60) vastaan. Molemmissa analyyseissä mittausmenetelmänä on epäsuora entsyymi-immunologinen menetelmä (EIA). HSP60-spesifiset vasta-aineet (anti-HSP60) mitataan näytteistä, jotka ovat vasta-ainepositiivisia MOMP:n suhteen (anti-MOMP-positiivinen). Kahden analyysin tuloksia verrataan keskenään ja tehdään johtopäätöksiä anti-HSP60- ja anti-MOMP-vasta-aineiden yhteydestä sairastettuun klamydia-infektioon, jonka T2000 tutkimukseen osallistuneet henkilöt ovat raportoineet sairastaneensa. Klamydia-infektion ja vasta-aineiden yhteyttä lapsettomuuteen selvitetään hyödyntämällä T2000-tutkimukseen osallistuvien henkilöiden raportoimia tietoja seksuaaliterveydestään.

Tulosanalyyseissä huomioidaan tutkittavien raportoimat tiedot muista sukupuolitauteina tarttuvista infektioista (Herpes ja kondylooma) Tutkimukseen on käytettävissä 1534 seeruminäytettä.

Tässä tutkimuksessa on tarkoitus löytää vastauksia seuraaviin kysymyksiin:

- Onko MOMP- tai HSP60-spesifisillä vasta-aineilla yhteyttä T2000 tutkimuksessa ilmoitettuun klamydia-infektioon
- Onko miesten ja naisten välillä eroja vasta-aineiden esiintyvyydessä
- Liittyykö jompikumpi, MOMP tai HSP60 spesifiset vasta-aineet enemmän raportoituun tahattomaan lapsettomuuteen
- Voiko MOMP tai HSP60 spesifisiin vasta-aineisiin perustuvilla menetelmillä erottaa klamydia-infektioon sairastuneita verrokeista

Tämän tutkimuksen tutkimusorganisaatiota on esitetty kaaviossa 1.



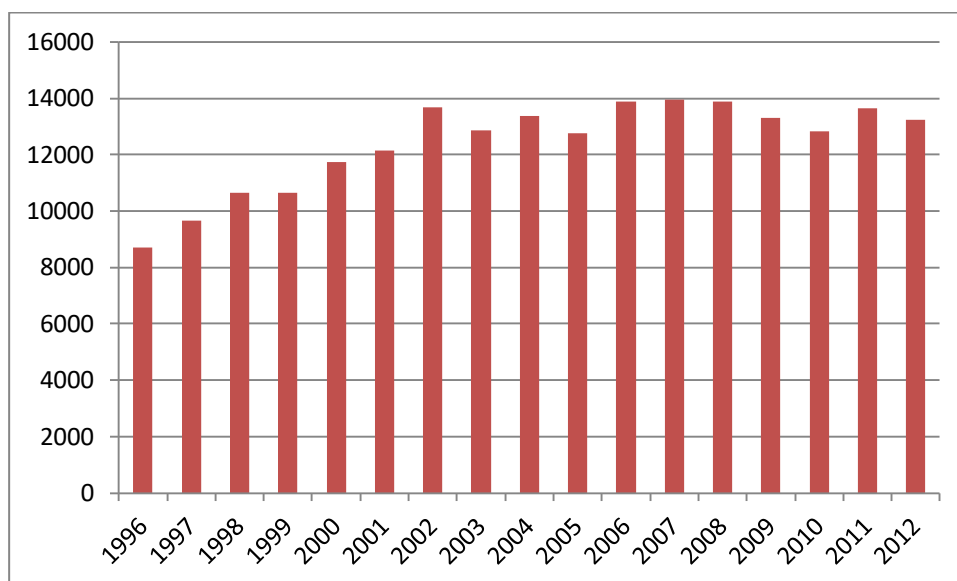
KUVIO 1. Tutkimusorganisaatio

2 YLEISTÄ KLAMYDIASTA

Klamydia-infektio on Suomessa yleisin sukupuolitauti, jonka aiheuttaa pieni gram-negatiivinen *C. trachomatis* -bakteeri. *C. trachomatis* tarttuu suojaamattomassa sukupuoliyhdyntässä limakalvokosketuksessa vagina-, suu, tai anaaliseksi yhteydessä. Vastasyntynyt voi saada tartunnan synnytyksen aikana, jos äidillä on hoitamaton infektio. (Öhman 2010, 18–20)

Klamydia kuuluu ilmoitettaviin tartuntatauteihin, jonka määrää seuraa Terveiden ja hyvinvoinninlaitoksen tartuntatautirekisteri. Taulukosta 1 näkee, että vuosittain tartuntatapauksia ilmoitetaan keskimäärin 13 000. (Tartuntatautirekisteri, THL, haettu 28.11.2013)

Klamydiatapauksista jopa 60 % todetaan naisilla ja tartunnan riskiryhmään kuuluvat etenkin nuoret 16–24 vuotiaat. Tartuntariskiä nostavia tekijöitä ovat usein vaihtuvat kumppanit, sekä kumppanien lukumäärä. Riskiä nostaa piittaamattomuus seksuaaliterveydestä, johon liittyy vähentynyt kondomin käyttö ja alhainen sukupuolitautitesteissä käyminen. (Öhman 2010, 18–19)



KUVIO 2. Klamydiatapaukset Suomessa vuosina 1996–2012 (THL, Tartuntatautirekisteri)

Klamydiatartunta on usein oireeton. Varmaa syytä tähän ei tiedetä. Naisilla oireettomuus on miehiä yleisempää. Naisilla kolme neljäsosaa tartuntatapauksista on oireettomia, kun taas miehillä vain puolissa tapauksissa havaitaan oireettomuutta. Juuri oireettomuus tekee klamydiasta vaarallisen etenkin naisten lisääntymisterveydelle. Useat tapaukset havaitaan vasta

5-10 vuoden kuluttua tartunnasta, kun aletaan etsiä syytä naisen hedelmättömyydelle. Hoitamaton tai krooninen tulehdus voi aiheuttaa naiselle sisäsynnytintulehduksen, joka voi johtaa munanjohtimien arpeutumiseen tai kohdunulkoiseen raskauteen. Myös miehillä on havaittu hedelmättömyyttä hoitamattoman infektion aiheuttamana, vähentäen elävien siittiöiden määrää ja laatua. (Peipert 2003, 2424–2428; Joki-Korpela ym. 2009, 1448-1450)

Eräät *C.trachomatis* –bakteerin biotyypit aiheuttavat trakoomaa eli tarttuvaa silmätulehdusta, joka on yksi yleisin sokeutumisen syy kehitysmaissa. Trakoomatulehdus saa yläluomen kääntymään sisäänpäin, jolloin silmäripset hankaavat silmämunaa samalla arpeuttaen sen pintaa. Hoitamattomana arpeutuminen aiheuttaa sarveiskalvon sameutumista ja lopulta sokeutumista. Bakteeri tarttuu limakalvotartunnan, sormien, sekä jaettujen vaatteiden ja pyyhkeiden välityksellä. Huono hygienia edesauttaa leviämistä. (WHO, haettu 20.1.2014)

Ihmiseen tarttuvia klamydialajeja on *C. trachomatis* lisäksi *C. pneumonia*, joka aiheuttaa hengitystieinfektiota. *C. pneumonia* aiheuttamat infektiot vaihtelevat oireettomasta ylähengitystieinfektiosta vakavaan keuhkokuumeeseen. (Hedman ym. 2010, 287)

3 KLAMYDIAN MIKROBIOLOGIA

Klamydiälajeja on useita. Ihmisestä toiseen tarttuvia lajeja on jo aikaisemmin mainittu *C. trachomatis* ja *C. pneumonia*. Näiden lisäksi on lähinnä eläimiä tartuttavia lajeja, kuten *C. psittaci*, *C. abortus* ja *C. felis*. Kaikille klamydioille yhteistä on niille ominainen lisääntymiskierto. Ne pystyvät lisääntymään vain elävän solun sisällä. Kohdesolun ulkopuolella klamydiabakteerit ovat ulkoisia olosuhteita kestävässä EB-muodossa (elementary body), joka on infektiivinen. Solun sisälle päästyään klamydiabakteerit muuttavat muotoaan RB-muotoon (reticulate body), joka ei ole infektiivinen, mutta pystyy lisääntymään. (Hedman ym. 2012, 287; Reunala ym. 2003, 21–23)

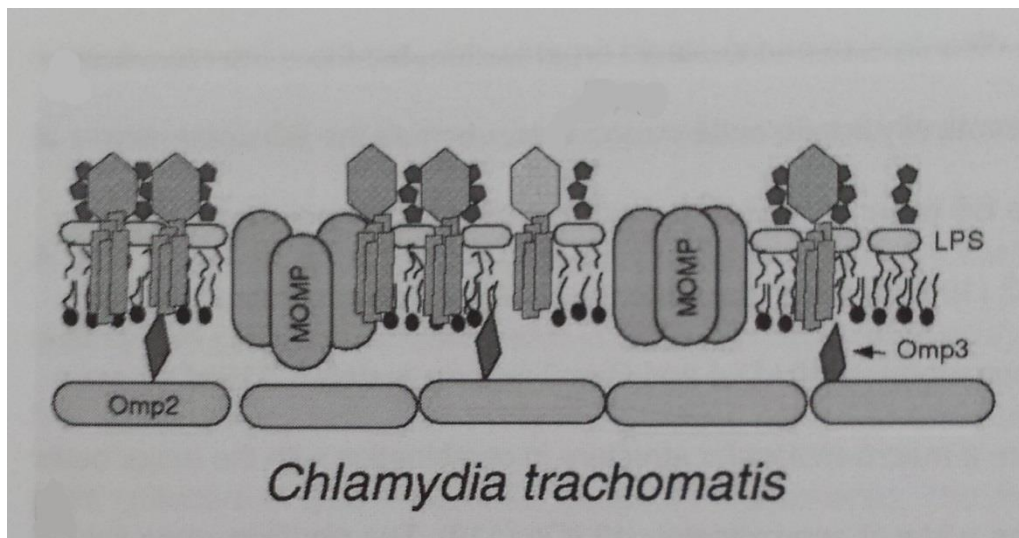
3.1 Rakenne

Kuten muillakin gram-negatiivisilla bakteereilla, myös *C. trachomatis* -bakteerin soluseinä koostuu kahdesta kalvosta, ulko- ja sisämembraanista. Osa rakenteista on spesifisiä ja osa yhteisiä eri klamydiälajien kesken. Yhteiset rakenteet voivat aiheuttavaa ristireagointia laboratoriodiagnostiikassa, joka vaikeuttaa lajien erottelua. Ulkokalvolla olevat lipopolysakkaridit (LPS) ovat kaikille lajeille yhteinen rakenne, joka muodostuu rasvasta ja suurimolekyylisistä hiilihydraateista. LPS:n tunnistukseen perustuvissa laboratoriomenetelmissä ei siis voida erottaa eri klamydiälajeja toisistaan. LPS:t toimivat endotoksiineina, eli ne saavat aikaan infektion aikana isäntäelimistössä toksisia reaktioita, kuten kuumetta, valkosolujen ja verihiutaleiden niukkuutta. (Hedman ym. 2012, 287–289; Reunala ym. 2003, 21–23; Öhman 2010, 18)

Ulkokalvolla on myös proteiineja, joista tärkein on MOMP-proteiini (major outer membrane protein). MOMP immunogeneettisyyttä eli kykyä aktivoida elimistön puolustusjärjestelmää on tutkittu paljon. MOMP:n geneettisten eroavaisuuksien perusteella voidaan *C. trachomatis* -bakteeri jakaa yli 20 eri immunotyyppiin. Tyypit A-C kuuluvat trakoomabiotyyppeihin, jotka aiheuttavat silmätulehdusta ja tyypit D-K kuuluvat sukupuolitauteina leviäviin tyyppeihin. Tyypit L₁-L₃ kuuluvat lymfogranuloomabiotyyppeihin, jotka aiheuttavat tulehdusta lymfaattisessa kudoksessa, jolloin kehittyy Lymphogranuloma venereum (LGV) sukupuolitauti. LGV on harvinaisempi ja oireiltaan täysin erilainen kuin muut klamydia infektiot. (Hedman ym. 2012, 287–289; Reunala ym. 2003, 21–23; Öhman 2010, 18)

Klamydia-bakteerilta puuttuu gram-negatiivisille bakteereille tyypillinen muotoa antava mureiini- eli peptidoglykaanikerros. Kuitenkin bakteerin DNA-sekvenssin perusteella voidaan päätellä, että klamydialla olisi peptidoglykaanisynteesiin tarvittava koneisto. Bakteerin jakautumisen aikana on havaittu peptidoglykaanin synteesiin liittyvien geenien ilmentymistä eli ekspressoitumista. (Solunetti 2006b, haettu 14.6.2013; Hedman ym. 2010, 287–290)

Kroonisissa klamydiainfektioissa yksi tärkeimpiä tulehdusvasteen aiheuttajia on HSP60-proteiini. Ilmeisesti jatkuva tulehdusreaktio voi aiheuttaa arpeutuvan kudostuhoon, eli munanjohtimen arpeutumisen. (Hedman ym. 2010, 289; Reunala ym. 2003, 24)



KUVA 1. *Chlamydia trachomatis* –bakteerin pintarakenne kaavamaisesti esitettynä (Mygind. 2002, 10)

Lämpöshokkiproteiinit (HSP) ovat ryhmä kaperoniproteiineja, joiden tehtävänä on esimerkiksi auttaa muista proteiineja laskostumaan oikein, sekä korjata väärin laskostuneita proteiineja. Lämpöshokkiproteiineja on löydetty kaikista organismeista bakteereista nisäkkäisiin. Lämpöshokkiproteiineja esiintyy useimmissa soluissa ja niitä kutsutaan myös toisella nimellä stressiproteiineiksi. Nimitys tulee niiden solujen suojaamiskyvystä stressiolosuhteissa. Kohonneen lämpötilan lisäksi stressiolosuhteita ovat mm. infektiot, karsinogeenit, hapen- tai ravinnonpuutostilat. (Jolly ym. 2000, 1564–1566; Jolly ym. 2000)

Lämpöshokkiproteiineja on useita ja ne luokitellaan niiden molekyylipainon mukaan neljään pääryhmään: HSP90, HSP70, HSP60 ja pienet HSP10:t. HSP60 esiintyy läpi koko klamydian lisääntymiskierron ja sen määrä kasvaa lämpöshokin vaikutuksesta tai kun bakteeri joutuu vaikeisiin kasvuolosuhteisiin. Tällaisia olosuhteita ovat esimerkiksi antibiootin vaikutus tai

elimistön aktivoituneet puolustusreaktiot, jotka pyrkivät rajoittamaan klamydia-bakteerin kasvua (Kinnunen 2002, 22–23; Karinen 2006, 21)

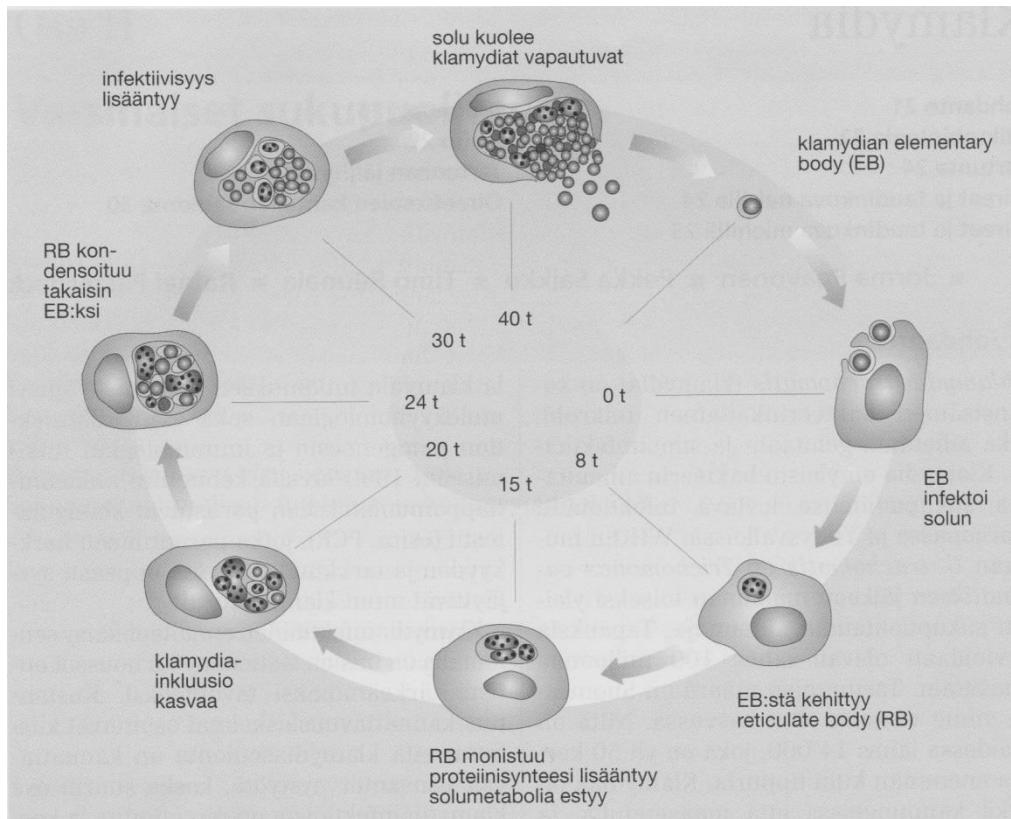
Infektion aikana tuotettu *C.trachomatis*-spesifinen HSP60 aktivoi elimistön puolustusreaktioita, joka ilmenee HSP60-vasta-aineiden ilmaantumisenä verenkiertoon. HSP60-spesifisten vasta-aineiden olemassaolo on liitetty erityisesti krooniseen tai pitkittyneeseen klamydia-infektioon, ja suurentunut HSP60-vasta-aineiden määrä potilaan veressä pidetään markkerina klamydia-infektion syy-yhteydestä mm. sisäsynnytintulehduksen (PID) ilmenemiselle. (Kinnunen ym. 2001, 76–77)

3.2 Bakterin lisääntyminen

Klamydiat pystyvät lisääntymään vain elävän isäntäsolun sisällä. Trakoomabiotyyppit ovat erikoistuneet lisääntymään lieriöepiteelisolujen sisällä, kun taas LGV-biotyyppit pystyvät lisääntymään jopa syöjäsolujen eli makrofagien sisällä. (Reunala ym. 2003, 21–23)

Klamydiolla on kaksi muotoa, solunulkoinen infektoiva muoto elementary body (EB) ja solunsisäinen suurempi muoto reticulate body (RB). Kuvassa 2 havainnollistetaan klamydiabakteerin lisääntymiskierto. Lisääntyminen tapahtuu syklissä, joka alkaa klamydian ollessa sen 0,3 μ m kokoisessa EB-muodossa, eli infektiomuodossa. Bakteerin tarttuessa solun pinnalla oleviin proteiineihin, jonka jälkeen solu endosytosoi sen sisäänsä. Normaalisti endosytoosin avulla solun sisälle kulkevat aineet tuhoetaan lysosomien avulla niiden ollessa endosomin sisällä. Klamydian EB-partikkeli kuitenkin osaa muuttaa rakkulan pintaa omalla proteiinillaan, jolloin se estää lysosomien toiminnan. (Reunala ym. 2003, 21–23)

Päästyään solun sisään muuttuu EB-partikkeli suurempaan, 1 μ m kokoiseen ja metabolisesti aktiiviseen RB-muotoon. RB-partikkelin soluseinät ovat heikot ja hyvin läpäisevät, joten se jää endosomin sisään ja imee isäntäsolulta energiaa, sekä ravinteita. Bakteeri alkaa lisääntyä jakaantumalla ja erittää samalla omia proteiinejaan, joilla se pystyy muuntamaan isäntäsolun aineenvaihduntaa ja mm. estämään solun ohjelmoitunutta solukuolemaa eli apoptoosia. Tämän ansioista solun aineenvaihdunta hidastuu ja klamydian RB-muodossa olevat uudet bakteerit muuttuvat takaisin infektiiviseen EB-muotoon. Lisääntymiskierron lopussa saattaa isäntäsolun sisällä olla satojatuhansia EB-bakteereja, jotka vapautuvat solun sisältä solun kuollessa ja hajotessa. Tämä tapahtuu noin 48-70 tunnin kuluttua lisääntymiskierron alusta. RB-muodot saattavat myös jäädä muuttumatta EB-muotoon esimerkiksi gammainterferonin, tiettyjen antibioottien tai raudanpuutteen vaikutuksesta, mikä saattaa edistää klamydia infektion pitkittymistä, mikä on niille tyypillistä. Tällöin *C. trachomatis* ekspressoisi erityisesti stressiproteiineja (mm. HSP60). (Hedman ym. 2010, 287–289; Reunala ym. 2003, 21–23)



KUVA 2. Klamydian lisääntymiskierron vaiheet isäntäsolussa (Reunala ym. 2003, 22)

3.3 Klamydia-infektion käynnistämä immuunivaste

Tartunnan saatuaan elimistö alkaa puolustautua infektiota vastaan luonnollisen eli väestöväestön ja hankinnaisen eli soluvälitteisen immuunivasteen avulla. On havaittu, että jopa puolella potilaista klamydia-infektio menee itsestään ohi noin vuoden kuluessa tartunnasta, jolloin soluvälitteinen immunitetti on hitaasti alkanut kehittyä. Niillä henkilöillä, joilla hoitamaton tulehdus ei itsestään lähde pois, bakteerin pitkäaikainen tai toistuva oleskelu elimistössä saattaa aiheuttaa kudonvaurioita stimuloimalla jatkuvasti välittäjäaineiden eli sytokiinien synteesiä. Kudonvaurioiden vakavuusasteen on havaittu riippuvan henkilön perintötekijöistä. (Hedman ym. 2010, 292–293; Öhman 2012, 18-30)

Ensisijainen vaste klamydiainfektiolle tapahtuu muutamassa päivässä tartunnasta, kun limakalvoille alkaa kerääntyä neutrofiileja ja monosyytteja, sekä hieman myöhemmin T-soluja. Antigeeni-spesifiset naivit T-solut aktivoituvat ja erilaistuvat imusolmukkeissa vaikuttaja-T-soluiksi. Tämän jälkeen T-solut pyrkivät poistamaan antigeenit elimistöstä ja jäävät vahtimaan infektiota. (Hedman ym. 2010, 292–293)

3.3.1 Luonnollinen immuuniteetti

Sukupuolielinten limakalvo tarjoaa ensimmäisen suojan mikrobeja vastaan. Jos kuitenkin tuntematon mikrobi pääsee limakalvosta läpi, alkaa solussa mikrobista vapautuvat toksiinit käynnistävät elimistön puolustusreaktion. Hankitusimmuuniteetissa oleellisia ovat makrofageja muistuttavat Langerhasin solut, joita esiintyy imusolmukkeissa, limakalvoilla ja iholla. Ne toimivat elimistöön tunkeutunutta bakteeria vastaan makrofagin tavoin ja ne ovat ensimmäinen puolustuskeino taudinaiheuttajaa vastaan klamydian tapauksessa limakalvoilla. Langerhasin solut toimivat ns. antigeeniä esittelevinä soluina. Ne pyydystävät bakteerista aiheutuvia antigeenejä lonkeromaisilla ulokkeillaan ja tuhoavat ne. Verrattuna makrofagiin Langerhasin solut syövät vähän antigeeniä. (Solunetti. 2006b, hakupäivä 3.6.2013; Tiilikainen ym. 1997, 14–264)

Tämän jälkeen makrofageista alkaa erittyä tulehduksen välittäjäaineita eli proinflammatorisia sytokiineja, kuten IL-1, IL-6, IL-8 ja TNF (tumor necrosis factor = tuumorinekroositekijät = TNF- α ja TNF- β , molempien tehtäviin kuuluu puolustusjärjestelmän aktivointi). Kuvasta 2 voidaan nähdä eri sytokiinien vaikutukset elimistössä. Näillä sytokiineilla on puoleensavetäviä ominaisuuksia, eli ne houkuttelevat ja ohjaavat immuunipuolustukseen osallistuvia soluja tulehduspaikalle. Sytokiineista kemokiinit houkuttelevat neutrofiileja ja monosyyttejä tulehduspaikalle. Neutrofiilien lisäksi EB-muotoisia *C. trachomatis* -bakteereja pystyvät tuhoamaan myös NK-solut eli luonnolliset tappajasolut. NK-solut tuottavat IFN- γ (gammainterferoni), joka kiihdyttää immuunireaktiota ja samalla edesauttaa elimistöä taistelussa *C. trachomatis* -infektiota vastaan. (Salmi ym. 2003, 781–798; Tiilikainen ym. 1997, 14–264)

Neutrofiileihin verrattuna makrofagit pysyttelevät tulehdusalueella pitempään ja kudoksissa olevat makrofagit ovat pitkäikäisiä. Ne pystyvät jakautumaan myös tulehdusalueella. Makrofagit pystyvät tuhoamaan klamydian infektoituneista soluista, mutta klamydia voi mahdollisesti selviytyä ja alkaa kopiaitua makrofagin sisällä. Tämä vaihtelee klamydiatyypin ja serotyypin välillä. Tiilikainen ym. 1997, 14–264; Öhman 2012, 18)

Makrofageilla on keskeinen rooli synnynnäisessä eli luonnollisessa ja hankitusimmuuniteetissa. Makrofagit aktivoivat ja säätelevät hankitun immuuniteetin syntymistä tuottamalla IL-12 ja IL-10 sytokiineja. Ne esittelevät antigeenejä T-soluille, jolloin syntyy yhteys synnynnäiselle ja hankitulle immuuniteetille. (Tiilikainen ym. 1997, 14–264)

<div style="display: flex; flex-direction: column; gap: 5px;"> <div> keskeinen tekijä vasteen säätelyssä</div> <div> osallistuu vasteen säätelyyn</div> <div> ei merkitystä (tai merkitys vähäinen tai epävarma)</div> </div>	vaikutus solutasolla			systeemiset vaikutukset			tautiryhmät, joissa merkitystä				
	vasta-aineentuotanto	solväititteiset vasteet	hematopoieesi	kuume	tulehdusreaktiot	septinen sokki	bakteeri-infektiot	virusinfektiot	autoimmuunitaudit	tuumoripuolustus	allergia
IL-1 (interleukiini 1)											
IL-2											
IL-3											
IL-4											
IL-5											
IL-6											
IL-7											
IL-8											
IL-9											
IL-10											
IL-11											
IL-12											
IL-13											
IFN- α (alfainterferoni)											
IFN- β											
IFN- γ											
TNF- α (tuomornekroositekijä)											
TNF- β (=LT, lymfotoksiini)											
GM-CSF (granulosyytti-makrofagi-hematopoieettinen kasvutekijä)											
G-CSF											
M-CSF											
TGF- β (transformoiva kasvutekijä beeta)											
erytropoietiini											
SF (ns. Steelintekijä)											
LIF (leukemiasoluja estävä tekijä)											
IL-1RA (IL-1-reseptoriantagonisti)											
MIP-1 (makrofagien tulehdustekijä)											
MCP-1 (monosyyttien kemotaktinen tekijä)											
RANTES (lymfosyyttien kemotakt. tekijä)											

KUVA 3. Sytokiinit ja niiden vaikutukset solutasolla, systeemissä, sekä eri tautiryhmissä. (Tiilikainen ym. 1997, 22)

3.3.2 Hankittu immunitetti

Hankittu immunitetti reagoi antigeeniin luonnollista immunitettia hitaammin, joten niiden toiminta täydentää toisiaan. Immunitettitoiminta perustuu T- ja B-soluihin ja niiden pinnalla olevien reseptorien kykyyn tunnistaa antigeenejä. Molemmat solut aktivoituvat klamydiainfektiossa, mutta T-solulla on tärkeämpi rooli infektion hävittämiseen johtavissa toiminnoissa. Koe-eläintutkimuksissa on todistettu hiirillä, että juuri T-solut tuhoavat infektion. T-

solut pystyvät tuhoamaan vain sellaisia antigeenejä, jotka ovat kiinnittyneenä elimistön omiin proteiineihin. Näitä proteiineja kutsutaan MHC-molekyyleiksi, niitä tunnetaan kaksi pääluokkaa, MHC I ja MHC II. T-solujen pintarakenteesta riippuen se voi liittyä joko MHC I tai MHC II-molekyyleihin. Pintarakenteiden avulla T-solut voidaan jakaa CD-alaluokkiin (cluster of differentiation), CD4⁺- sekä CD8⁺T-solut. CD8⁺-positiivisten solujen tehtävä on tuhota kehon omia soluja, jossa taudinaiheuttaja on. Joskus kuitenkin solun sisällä oleva taudinaiheuttaja on infektiivisessä tilassa koko ajan, tällöin CD4⁺-positiiviset solut käynnistävät muiden solujen puolustusjärjestelmän. Suuret CD4⁺-positiiviset solut tuottavat myös sytokiineja. (Tiilikainen ym. 1997, 56)

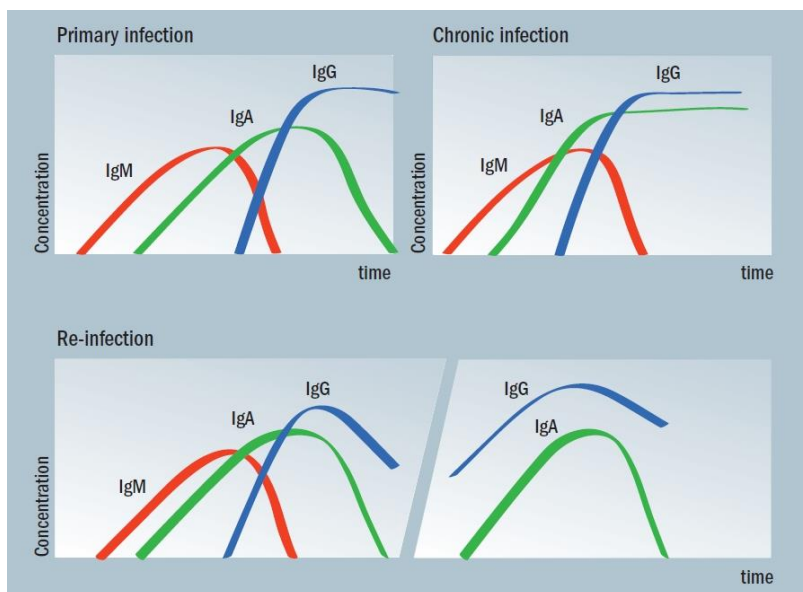
B-solujen tehtävä on tuottaa immunoglobuliineja eli vasta-aineita, jotka neutralisoivat *C. trachomatis* -bakteerin tarttumista kohdesolun pintaan. Immunoglobuliinit ovat elimistön immuunijärjestelmään kuuluvia proteiineja, joiden avulla elimistö tunnistaa elimistölle vieraita organismeja, kuten taudinaiheuttajia. Vasta-aine sitoutuu elimistölle vieraiden molekyylien tai solujen pintarakenteisiin eli antigeeneihin ja tuhoaa ne fagosytosiin tai komplementtijärjestelmän avulla. (Huovinen ym. 2003, 621)

Kun elimistö kohtaa antigeenin ensimmäistä kertaa, puhutaan ns. primääri infektiosta. Sen aikana kehittyvät IgM-vasta-aineet. IgM-vasta-aineita ei normaalisti tavata infektion uusiutuessa, ja niiden osoittaminen laboratoriokokeissa onkin diagnostisesti varma merkki tuoreesta infektiosta. IgA luokan vasta-aineet kehittyvät vähitellen akuutin vaiheen jälkeen, mutta IgA luokan vasta-aineilla ei ole varsinaista diagnostista merkitystä. Erityisesti *C. pneumoniae* infektion yhteydessä IgA-luokan pysyvästi koholla olevia vasta-ainetasoja on pidetty merkinä jatkuvasta eli kroonisesta infektiosta, vaikka nykytutkimus ei olekaan tätä käsitystä vahvistanut.

Primääri-infektion aikana kehittyvät myös IgG-luokan vasta-aineet. IgG-luokan vasta-aineiden läsnäolo analysoitavissa seeruminäytteessä on diagnostisesti varma osoitus sairastetusta infektiosta. Jotta voitaisiin sanoa, onko infektio vastikään sairastettu vai jo aiemmin sairastettu, tarvitaan ns. pariseeruminäyte, jotka on otettu noin 2 viikon välein. Tuoreen infektion merkinä on tällöin IgG-vasta-ainetasojen tason vähintään 4-kertainen nousu ensimmäisen ja toisen näytteen välillä. Myöhemmässä vaiheessa IgG-vasta-aineiden nelinkertainen tai suurempi nousu on merkki uusiutuvasta infektiosta. (Yhtyneet Medix laboratoriot 2013b, hakupäivä 15.6.2013)

Klamydiainfektiossa vasta-ainetasojen nousun vaiheet tunnetaan hyvin ja eri Ig-vasta-aineluokkien tasojen perusteella pystytään päättelemään infektion tila melko luotettavasti.

Rajanteko vasta-ainetasoille ei kuitenkaan ole täysin selvää ja yksilöllistä vaihtelevuutta on havaittu. Kuvasta 3 nähdään klamydia-infektion aiheuttaman vasta-ainetasojen nousu. IgG-, IgM- ja IgA-luokan vasta-aineita muodostuu klamydiabakteerin antigeenejä vastaan.



KUVA 4. Klamydia-infektion aiheuttama vasta-ainetasojen nousu. (Testline Clinical Diagnostics, haettu 10.3.2014)

4 KLIININEN TAUDINKUVA JA OIREET

Klamydiainfektio on usein oireeton, mutta siihen johtavia syitä ei tunneta. Oireet ilmaantuvat noin 10–14 vuorokauden kuluttua tartunnasta tai jopa viikkoja myöhemmin. Tartunnan ja oireiden alkamisen välistä aikaa on vaikea tarkkaan arvioida, koska tartunnan saanut henkilö on yleensä tietämätön tartunnan ajankohdasta. Klamydiainfektio ilmenee naisilla, miehillä ja vastasyntyneillä erilaisina genitaal- ja silmätulehduksina. (Hedman ym. 2012, 293–294)

Naisilla klamydiainfektion yleisin ilmenemismuoto on kohdunkaulan tulehdus eli servisiitti. Oireisen kohdunkaulan tulehduksen oireita ovat alavatsakivut, lisääntynyt tai epänormaali valkovuoto, sekä yhdynnänjälkeinen verenvuoto. Sen kliinisiä tuntomerkkejä ovat samea tai kellertävä kohdunkaulan lima, verenvuotoherkkyys ja kohdunsuun turvotus. Klamydia aiheuttaa usein samanaikaisesti myös uretriittia eli virtsaputken tulehdusta, jonka oireita ovat tihentynyt virtsaamistarve ja kirvely virtsatessa. (Paavonen ym. 2011, hakupäivä 12.7.2013; Hedman ym. 2010, 293–294)

Hoitamattomana klamydiaservisiitti voi levitä naisella sisäsynnyttimiin aiheuttaen endometriittiä eli kohdun limakalvon tulehdusta sekä salpingiittiä eli munajohtimen tulehdusta. Oireita molemmissa ovat usein vähäinen lämpöily ja alavatsakivut. Hedelmättömyydestä tai heikosta hedelmällisyydestä noin viidesosa johtuu munanjohtimen vaurioista, joka on seurausta pitkään tai toistuvasti esiintyvistä salpingiitista. Klamydiaendometriitti voi aiheuttaa myös välivuotoa. Näistä käytetäänkin oireyhtymädiagnoosina sisäsynnytintulehdusta (pelvic inflammatory disease, PID). Lievät ja ajoissa havaitut PID tapaukset hoidetaan avohoidossa. Joskus tulehdus voi kuitenkin edetä kohdun sivuelimiin ja aiheuttaa tulehdusta myös munasarjoissa (ooforiitti), märkäpesäkkeitä pikkulantiossa (pelveoperitoniitti), sekä aiheuttaa lantion alueella vatsakalvotulehdusta. (Hedman ym. 2012, 293–294; Reunala ym. 2003, 24–25)

Klamydia aiheuttaa miehillä useammin oireita kuin naisella. Tavallisin ilmenemismuoto on uretriitti eli virtsaputkentulehdus, jonka oireita ovat virtsaputken kirvely sekä usein aamuisin esiintyvä vaaleanharmaa tai hieman kellertävä limavuoto. Jos klamydiauretriittia ei hoideta, voi harvinaisena komplikaationa seurata epididymiitti eli lisäkivestulehdus. Tulehduksen aiheuttaa bakteeri, joka on levinnyt siemenjohdinta pitkin kivekseen. Oireita ovat aluksi toispuoleinen turvotus ja aristus lisäkiveksen kohdalla. Myöhemmin koko kirvespussissa on tulehduksen oireita

kuten turvotus, punoitus ja kuumotus. Lisäksi tulehdukseen liittyy virtsaamisoireita, kuten kipua, tihentynyttä virtsaamistarvetta ja kirvelyä. (Terveysportti 2013b, haettu 18.7.2013)

Äidin hoitamaton klamydiainfektio voi tarttua lapseen synnytyksen yhteydessä synnytyskanavasta, aiheuttaen vastasyntyneelle sidekalvotulehdusta tai keuhkokuumetta. Jopa 50–75% vastasyntyneistä saa sidekalvotulehduksen äidin ollessa infektion kantaja. Oireina ovat silmien rähmiminen ja luomien turvotus. Hoitamattoman sidekalvotulehduksen vaikeampi komplikaatio on keuhkokuume, joka alkaa vähitellen 3-12 viikon iässä. Oireina ovat keuhkokuumeessa hakkaava yskä, hengenahdistus ja nenän tukkoisuus. Myös rintakehän röntgenkuvassa näkyy keuhkokuumeen kliininen löydös. (Terveyskirjasto 2013, haettu 18.7.2013; Öhman 2010, 18–19; Hedman ym. 2012, 293–294)

5 DIAGNOSTIIKKA JA TUTKIMINEN

Klamydiainfektion diagnoosia ei koskaan tehdä oireiden tai kliinisen kuvan perusteella, vaan se vaatii aina mikrobiologisen vahvistuksen. Tartunnan mahdollisuutta epäiltäessä on myös otettava huomioon klamydian oireettomuus tai oireiden niukkuus. Sukupuolitauditestit ja näytteenotto ovat luotettavat vasta tietyn ajankohdan jälkeen. Klamydiainfektion kohdalla aikaisin arvioitu luotettava näytteenottoajankohta on viisi vuorokautta altistuksen jälkeen. (Kurki ym. 2010, 97–99)

Klamydian osoitusmenetelmiä ovat suorat bakteerin osoittamismenetelmät ja vasta-aine-analyysiin perustuvat epäsuorat menetelmät. Suorista menetelmistä vanhin on viljely, jota käytettiin ennen klamydiainfektion diagnostiikassa. Nykyisin on siirrytty nopeampiin menetelmiin, kuten nukleiinihappomonistustesti ja antigeenin osoitus. Nukleiinihappomonistustestiä käytetään rutiinidiagnostiikassa. Epäsuoria menetelmiä on esimerkiksi paljon tutkimuskäytössä oleva vasta-ainemääritys. (Hedman ym. 2012, 290–292)

5.1 Nukleiinihappomonistus

Nukleiinihappomonistustestiä (NAAT) käytetään nykyisin ensisijaisesti *C. trachomatis* -infektion diagnostiikassa. Laboratorion tutkimuslyhenteenä testille on –ChtrNhO. Testi on bakteeriviljelyä herkempi, nopeampi ja helpompi. Lisäksi usein näytteiden kuljetuksen aikana tapahtuva bakteerien inaktivaatio ei haittaa nukleiinihappomonistustestin onnistumista. Tämän vuoksi testillä voidaan saada positiivisia tuloksia hyvin varhain tartunnan jälkeen. Menetelmä on luotettava myös hoidon onnistumisen seurannassa, koska se havaitsee myös limakalvoille jääneitä klamydian nukleiinihappopätkiä. (Kurki ym. 2010, 93–106; Reunala ym. 2003, 26–29)

Näytteeksi NAAT-testiin sopii alkuvirtsan- tai limakalvonäyte. Virtsanäyte on usein potilaalle helpompi ja miellyttävämpi. Alkuvirtsanäytettä varten potilaan tulee olla virtsaamatta vähintään 2 tuntia, eikä alapesua saa suorittaa. Näytettä kerätään ensimmäiset 10–30 ml puhtaaseen keräysastiaan. Lopun virtsan voi laskea vessanpönttöön. Näyte säilyy huoneenlämmössä kaksi vuorokautta. (Yhtyneet Medix laboratoriot 2014a, hakupäivä 6.3.2014)

Limakalvonäyte otetaan sieltä, missä tulehduksen epäillä olevan tai missä kliinisiä tuntomerkkejä havaitaan. Näytteenotto- kuljetus- ja säilytysvälineinä toimivat hyvin valmiit kitit

esim. Abbott Multi-Collect Specimen Collection Kit. Näytettä ottaessa tulee pyyhkiä pinnalla oleva erite pois. Yleensä naiselta näyte otetaan kohdunkaulasta, virtsaputkesta tai emättimen limakalvolta hankaamalla. Näyte otetaan pyörittämällä näytteenottotikkua 10–30 sekuntia kohdunkaulassa tai 2-3 sekuntia virtsaputkesta tai emättimen limakalvolta. Miehillä yleinen näytteenottopaikka on virtsaputki, jolloin miehen tulee olla virtsaamatta 1 tunnin ajan ennen näytteenottoa. Tikku työnnetään 2-4cm syvyyteen virtsaputkeen ja pyöritetään 2-3 sekuntia. Silmän sidekalvolta näyte otetaan pyyhkäisemällä näytteenottotikulla sidekalvoa. Peräsuolesta tai nielusta näyte otetaan hankaamalla limakalvoa 2-3 sekuntia. (Yhtyneet Medix laboratoriot 2014a, hakupäivä 6.3.2014)

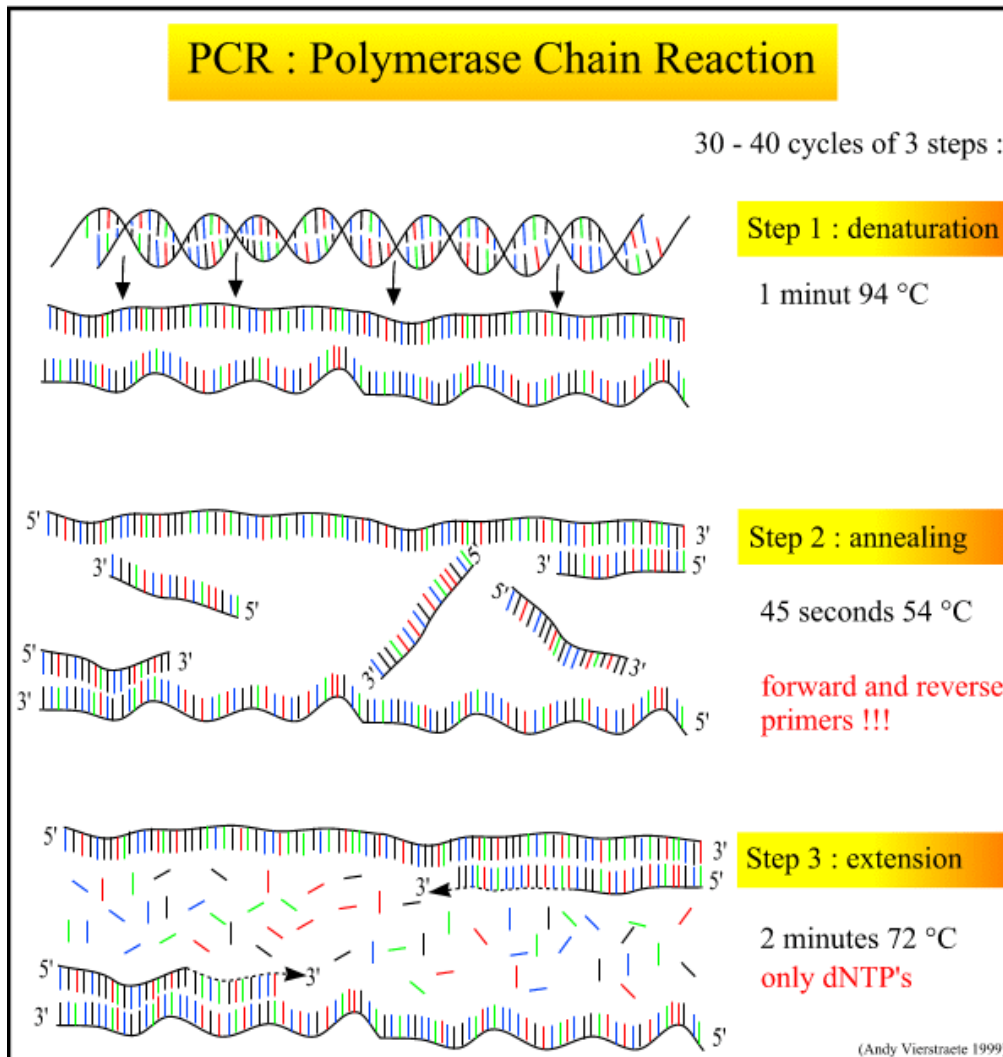
NAAT-testi perustuu *C. trachomatis* – bakteerin plasmidin, MOMP-proteiinin geenin, tai ribosomaalisen RNA:n monistamiseen. MOMP-proteiiniin perustuvassa menetelmässä voidaan erottaa eri klamydialajit toisistaan. Testeissä käytetään kaupallisesti valmistettuja kittejä. Yleisimmät testien tekoon käytetyt laitteet perustuvat yleensä polymeerasiketjureaktioon eli PCR. (Kansanterveyslaitos. 2007, hakupäivä 15.6.2013)

Polymeerasiketjureaktio eli PCR on kolmivaiheinen reaktio, joka on nopea ja helppo menetelmä monistaa DNA:ta. Lähtömateriaaleina voi toimia esimerkiksi kudokset, veri, solut, sylki, maanäyte jne. Reaktioon tarvitaan monistettava DNA eli templaatti-DNA, alukkeet, polymeerasienstyymi, deoksinukleotidit eli dNTP:t, puskuriliuosta ja kationi-ioneja. (Suominen ym. 2010, 153–155, 162–164)

Monistettavan DNA:n sekvenssi on tunnettava ainakin alueen reunoilta, jotta alukkeet voivat sitoutua niihin. Alukkeet, eli oligonukleotidit ovat synteettisesti valmistettuja noin 15–40 emäksen mittaisia DNA-jaksoja, jotka ovat komplementaarisia templaatti-DNA:lle. Reaktiossa käytetyt polymeerasientsyymit ovat hyvin lämpöä kestäviä. Niitä useita erilaisia, joiden ominaisuudet eroavat toisistaan. Yleisimpiä käytettyjä polymeeraaseja ovat Taq ja Pfu. Puskurin tehtävä reaktiossa on saada aikaan reaktiolle optimiolosuhteet ja stabiloida polymeerasientsyymi. Reaktioliuoksen ioni-konsentraatio taas vaikuttaa mm. reaktion tarkkuuteen. (Suominen ym. 2010, 153–155, 162–164)

DNA:n monistuminen on syklissä tapahtuva kolmivaiheinen reaktio. Reaktio esitetään kuvassa 4. Reaktioon kuuluu denaturaatiovaihe, jossa reaktioseoksen lämpötila nostetaan yleensä noin 95 °C asteeseen, riippuen käytetystä entsyymistä. Tällöin tapahtuu DNA:n denaturoituminen, eli DNA:n kaksi juostetta irtoavat toisistaan. Seuraavassa annealing -vaiheessa lämpötila lasketaan

alukkeille sopivaksi, alukkeista riippuen 55–72°C asteen välille. Lämpötilan laskiessa alukkeet kiinnittyvät emäspariutumisen vaikutuksesta templaatti-DNA:n. Viimeisessä vaiheessa, ekstensio- eli synteisvaiheessa lämpötila nostetaan polymeerasiintymistä riippuen noin 72 °C, jolloin DNA-polymeerasi alkaa syntetisoida uutta ketjua templaatti-DNA:n mallin mukaisesti liittämällä reaktioseoksessa vapaina olevia nukleotideja (dNTP) alukseen 5' päästä 3' päätä kohti. Tätä sykliä toistetaan haluttu määrä. Yleisesti 35:tä sykliä pidetään korkeimpana määränä, jolloin reaktion toimii vielä optimaalisesti. (Suominen ym. 2010, 153–155, 162–164)



KUVA 5. Polymeerasiketjureaktio. (Andy Vierstraete, haettu 20.1.2014)

5.2 Viljely

Soluviljelyä (–ChtrVi) on perinteinen *C. trachomatis*-infektion diagnostinen osoitusmenetelmä. Viljely on tarkka ja herkkä menetelmä, mutta sillä on heikkouksia. Viljelyyn tarvitaan eläviä

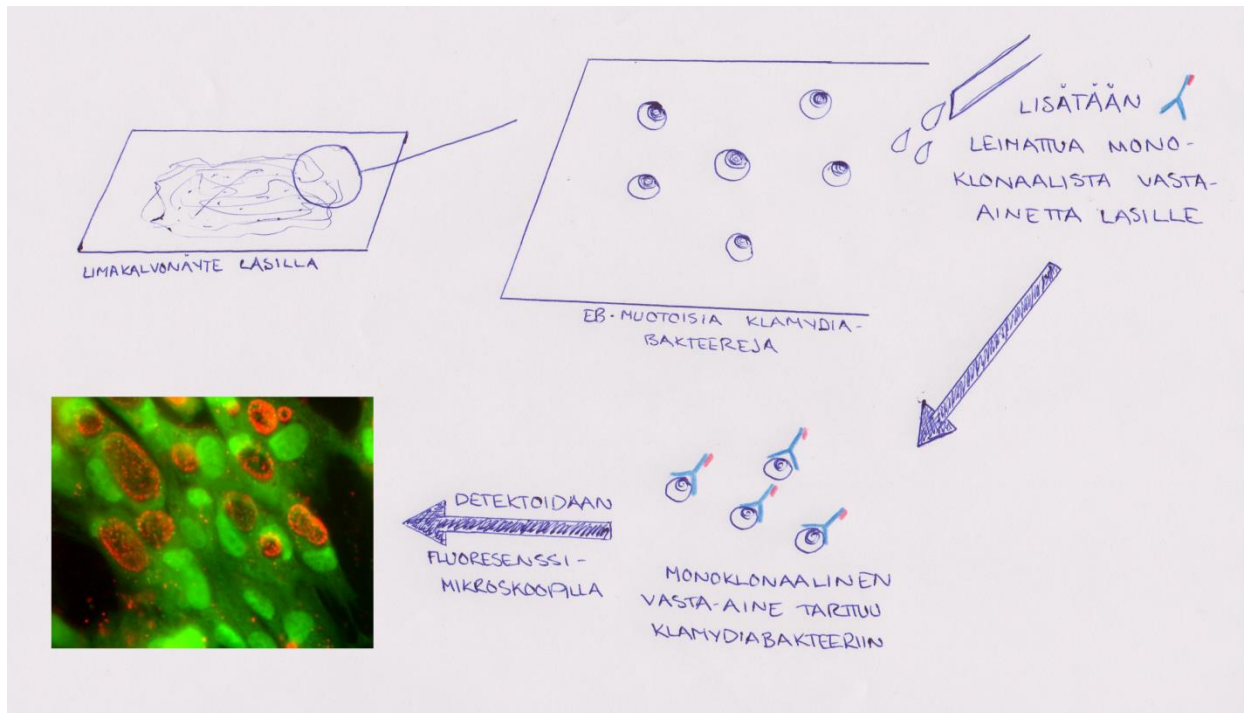
bakteereja, joten se vaatii tarkan ja oikeaoppisen kuljetuksen ja säilytyksen. Tuloksien saamiseen menee vähintään 3-5 vuorokautta, joten menetelmä on rutiinikäyttöön hidas. Nykyisin viljelyä käytetään lähinnä lääkeherkkyyksien ja epidemiologian selvittämiseen. Myös jotkin laboratoriot tekevät viljelyä epäiltäessä esimerkiksi LGV-infektiota. Näytteenä toimii limakalvonäyte ja LGV-infektiossa imusolmukemärkä. (Hedman ym. 2010, 291)

Lääkeherkkyys- ja epidemiologiatapauksissa näyte otetaan genitaalialueen limakalvolta pyörittämällä darcontikkua kohdunkaulan kanavassa, virtsaputkessa tai peräsuolella. Kaikki kontaminaatio liman, eritteen ja ulosteen kanssa tulee välttää. Silmästä näyte otetaan alaluomen sisäpinnalta pyyhkäisten. Näytetikku työnnetään bakteerikuljetusputkeen. LGV-infektioepäilyissä näytteenä on kerätty ilmusolmukemärkä. Näytteiden lähettämisessä tulee huomioida paketointi, koska elävät bakteerit eivät kestä jäätymistä. (Huslab. 2013, hakupäivä 15.6.2013)

5.3 Antigeenit

Mikäli klamydia-bakteeria on infektiolueella runsaasti, voidaan ne todeta suoraan näytteestä fluoresenssivärykseen (-ChtrAg) ja mikroskopointiin perustuvalla antigeenien tunnistusmenetelmällä. Menetelmä ei ole enää rutiinikäytössä. Menetelmässä näytteestä tehty sivelyvalmiste värjätään fluoresoivilla monoklonaalisilla vasta-aineilla ja mikroskopoinnilla tunnistetaan epiteelisoluissa olevat yksittäiset klamydiapartikkelit tai klamydian kasvurakkulat ns. inkluusiot. (Hedman ym. 2010, 291)

Antigeenin osoituksessa leimatut monoklonaaliset vasta-aineet sitoutuvat klamydia-bakteerin EB-muodon pinnalla olevaan MOMP:n. Fluoresoivat leiman ansiosta klamydia inkluusiot voidaan detektoida fluoresenssimikroskoopissa, kuten kuvassa 6 on esitetty. Koska monoklonaaliset vasta-aineet sitoutuvat MOMP:n, voidaan menetelmällä tunnistaa eri serotyyppejä. Jotkin laboratoriot suosittelevat klamydian antigeenin osoitusmenetelmän käyttöä tapauksissa, joissa näytettä saadaan vähän, esim. silmän sidekalvolta. Tällöin vanupuikolla otetusta näytteestä saadut epiteelisolut siirretään rengaslasin näytesyvennykseen kiertämällä tikkua. Näyte otetaan rikastusputkeen ilmakeivataan, kiinnitetään asetonilla ja värjätään. (Hedman ym. 2010, 291, Nordlab 2014a, hakupäivä 15.6.2013)



KUVA 6. Antigeenin osoitusmenetelmän kaavamainen esitys.

5.4 Vasta-aineet

Klamydia.spesifisten vasta-aineiden määrittystä käytetään nykyään lähinnä tutkimuksiin, joissa selvitetään klamydia-infektion liittyvien komplikaatioiden esiintymistä tai halutaan tutkia infektion esiintymistä väestössä. Vasta-aineita mittaavia spesifisiä menetelmiä on useita, joista tunnetuimpia ovat mikroimmunofluoresenssitesti (microimmunofluorescence test, MIF) ja entsyymi-immunologinen testi (EIA). (Yhtyneet Medix laboratoriot 2013b, hakupäivä 15.6.2013; Karinen 2006, 28–29)

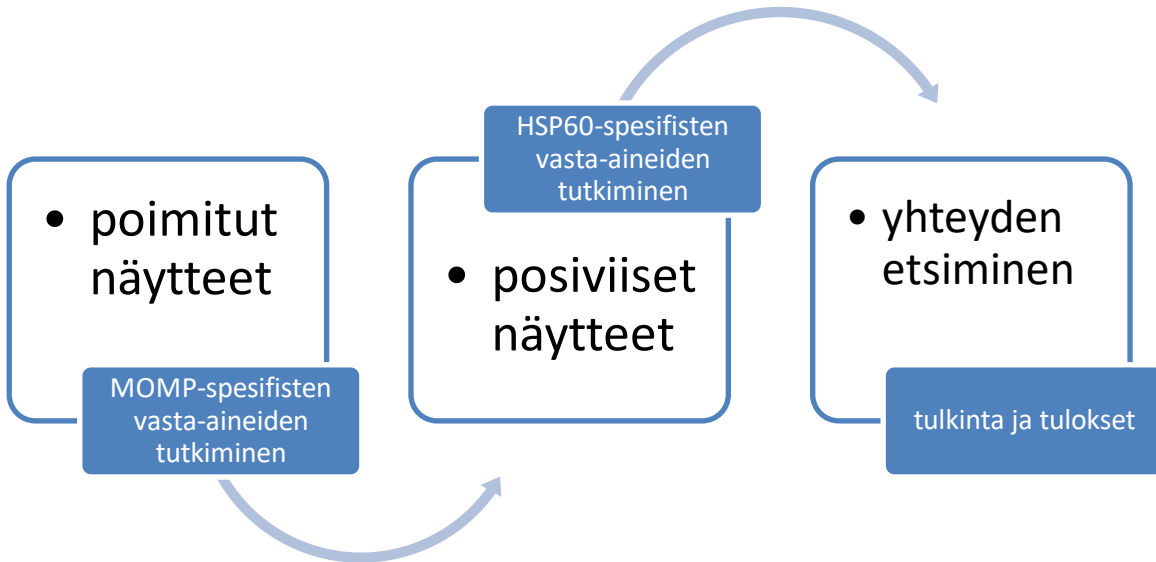
MIF-itesti (S-ChtrAbG ja S-ChtrAbM) on alun perin kehitetty klamydian serotyypin määrittämiseen. MIF-testissä mitataan vasta-aineita klamydian EB-muodon antigeenejä vastaan ja testillä voidaan erotella hyvin eri klamydian immunotyypeille ja lajeille spesifisiä vasta-aineita toisistaan. Sillä voidaan mitata erikseen IgM- ja IgG-luokan vasta-aineita, joten menetelmä soveltuu hyvin erottelmaan uudet infektiot vanhoista tai uusiutuneista. Oikein suoritettuna ja kokeneen laboratoriohenkilökunnan tulkitsemana MIF-menetelmä on tarkka ja herkkä laboratoriokoe klamydiainfektion diagnostiikkaan ja tutkimiseen. (Karinén 2006, 28–29)

EIA-menetelmä on nykyään ehdottomasti eniten käytetty menetelmä klamydia spesifisten vasta-aineiden todentamisessa (S-ChtrAb). EIA-testin suosioon on vaikuttanut sen helppous ja

tarkkuus, sekä mahdollisuus automaatioon. Kuten kaikki muutkin vasta-ainetestit, myös EIA-testi perustuu antigeeni-vasta-ainereaktioihin, jotka voidaan toteuttaa joko epäsuorana tai suorana menetelmänä. Yleisimmin käytetyssä EIA-testissä käytetään kahta vasta-ainetta. Ensimmäinen vasta-aine ottaa kiinni klamydian antigeenejä näytteestä. Toinen vasta-aine on näytekupin pohjalla oleva entsyymileimattu vasta-aine. Tämä vasta-aine havaitsee ja tunnistaa siihen sitoutuneen antigeenin tyypillisesti värireaktiolla. Värireaktio mitataan spektrofotometrillä. Kaupallisesti myynnissä olevissa kiteissä käytetään reaktioissa klamydian EB-muodon antigeeniä vasta-aineet havaitsemiseen. Nykyisin on myös kehitetty MOMP:n perustuva EIA-menetelmä, jolla voidaan havaita myös eri klamydian immunotyyppejä. Vaikka MIF-testiä pidetään edelleen 'kultaisena standardina' klamydia vasta-aineiden tutkimisessa, on EIA-menetelmä alkanut syrjäyttämään sitä. (Pasternack 1997, 76–82; Karinen 2006, 29)

6. TUTKIMUKSEN AINEISTO JA TOTEUTTAMINEN

Opinnäytetyössä tehtävä tutkimus toteutettiin useassa osassa. Kuviossa 3 on käyty läpi tutkimuksen eri vaiheet.



KUVIO 3. Opinnäytetyön tutkimuksen toteutus kaaviomallina.

6.1 Tutkimusjoukko ja aineiston hankinta

Opinnäytetyön tutkimuksen aineistona on Terveys 2000 tutkimukseen osallistuneet naiset ja miehet, jotka raportoivat aiemmin sairastaneensa klamydia-infektion tai kärsineet tahattomasta lapsettomuudesta. Verrokkiaineistona samanikäiset ja samaa sukupuolta olevat henkilöt, joilla ei ole yllämainittuja ongelmia.

Terveys 2000 on valtakunnallinen THL:n toteuttama tutkimus, joka toteutettiin syksyn 2000 ja kevään 2001 välisenä aikana. Sen tavoitteena on tutkia työkykyisen ja iäkkään väestön terveyttä ja toimintakykyä. Tutkimus 2000 toteutettiin vapaaehtoisten osallistujien avulla ja heitä osallistui 10 000. Heille tehtiin kyselyitä eri aihealueista mm. yleisestä terveydentilasta ja toimintakyvystä. Tämän jälkeen heille tehtiin terveydentarkastus, jonka yhteydessä tässä opinnäytetyössä käytetyt näytteet otettiin. (Terveys 2001, hakupäivä 25.4.2014)

6.2 Tutkimusmetodologia

Tutkimus on laadultaan kvantitatiivinen eli määrällinen tutkimus, jonka tarkoituksen on kerätä numeerisia tuloksia. Kvantitatiiviselle tutkimukselle on tyypillistä, että sen aikana tehdään paljon mittauksia, tässä tapauksessa 1464. Mittauksissa saatuja tuloksia käsitellään tilastollisin menetelmin, yksittäisillä tuloksilla ei ole väliä, vaan keskitytään suurempaan määrään tuloksia. (Hirsjärvi ym. 2007, 139–140)

6.3. Tutkimuksen laboratoriotyön toteutus

Tutkimuksessa hyödynnetään Terveys 2000 kyselyaineistoa, THL:n ylläpitämää syntyneiden lasten rekisteriä ja raskaudenaikaista infektiöseulontarekisteriä, ja T2000 seeruminäytteet, joista analysoidaan *C. trachomatis* MOMP- ja HSP60-spesifiset IgG-vasta-aineet. Tutkittaviin tapauksiin valittiin kaikki T2000 kyselyyn osallistuneet henkilöt, jotka olivat vastanneet kysymykseen, jossa kysyttiin aiemmin sairastetusta klamydia-infektiosta. Koska T2000-aineistossa ei tehty terveystarkastuksia tai otettu seeruminäytteitä alle 30 vuotiailta, rajattiin tässä työssä tutkittavien näytteenottohetkellä ollut ikä 30–60 vuoteen.

C. trachomatis-bakteerin MOMP pinta-antigeenia vastaan muodostuneet IgG vasta-aineet analysoitiin kaupallisella entsyymi-immunologisella (EIA)-menetelmällä (Ani Labsystems Ltd Oy) valmistajan ohjeen mukaan. Kaikista MOMP_ spesifisiä vasta-aineita sisältävistä näytteistä analysoitiin lisäksi klamydian 60 kDa:n lämpöshokkiproteiinia (HSP-60) vastaan muodostuneet vasta-aineet kaupallisella EIA-kitillä (Merdac diagnostican cHSP60-IgG-ELISA Medac). HSP60 vasta-aineet ristireagoivat eri klamydia lajien kesken, mutta niiden todentamista pidetään kroonisen klamydia-infektion markkerina.

6.4. Tilastolliset menetelmät

Tutkimusaineisto analysoitiin SPSS 21.0 Windows-ohjelmalla (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) huomioimatta otos- ja otantakokoja. Tässä opinnäytetyössä tulokset edustavat kysymyksiin vastanneita henkilöitä.

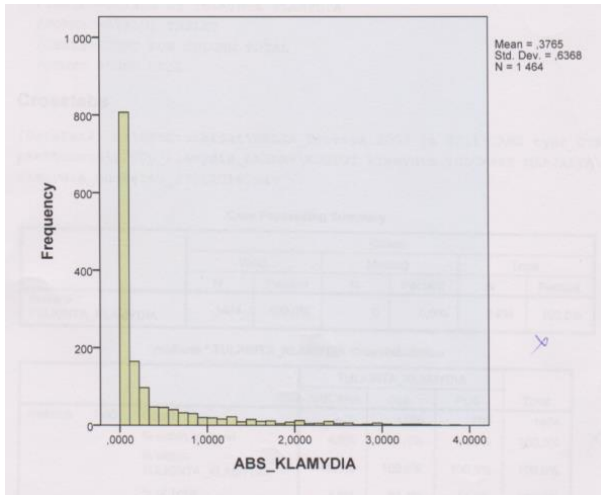
7. TULOKSET JA JOHTOPÄÄTELMÄT

Klamydia-spesifisten MOMP-vasta-aineiden analyysiin sisällytettiin yhteensä 1464 näytettä, joista 516 miehiltä ja 948 naista. Klamydia-infektiokysymykseen vastanneista miehistä 88 (19,6 %) ja naisista 116 (13,7 %) ilmoitti sairastaneensa klamydia-infektion jossakin vaiheessa elämäänsä. Aineistossa oli lisäksi 163 miestä ja 358 naista, jotka olivat kärsineen lapsettomuusongelmista. Verrokkiaineistona oli 265 miestä ja 473 naista, jotka eivät oman raporttinsa mukaan olleet sairastaneet klamydiainfektiota, eikä heillä ollut lapsettomuusongelmia. Kaikkien miesten keskiarvo ikä oli $43,4 \pm 8,2$ ja naisten $45,0 \pm 4,7$ vuotta.

7.1 Klamydia-spesifiset vasta-aineet

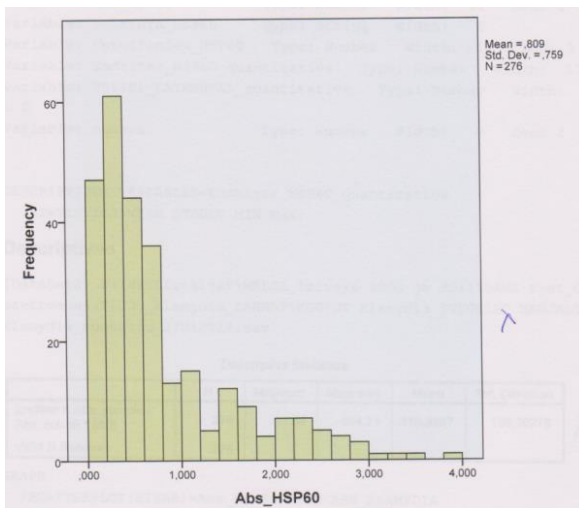
Tutkimuksen laboratoriotyö toteutettiin kahdessa osassa, joista ensimmäisessä tutkittiin MOMP-spesifisiä IgG-vasta-aineita. Reaktiotuloksen voimakkuus eli absorbanssi mitattiin spektrofotometrillä, joka antoi tulosteen absorbanssilukemasta ja lopullisen S/CO tuloksen laitteen ohjelmaan syötetyn kaavan perusteella. Laitteen antamat absorbanssilukemat, tulokset ja näytetiedot yhdistettiin Excel-ohjelmalla yhdeksi tutkimusaineistoksi, joka siirrettiin SPSS-ohjelmaan myöhempää käsittelyä varten.

Tulosten tulkinnassa käytettiin valmistajan määäämiä kittikohtaisia raja-arvoja; $S/CO < 1.0$ negatiivinen, $1.0 \leq S/CO < 1.4$ harmaa eli epäselvä, sekä $S/CO \geq 1.4$ positiivinen. Ensimmäisessä vaiheessa MOMP-spesifisille vasta-aineille positiivisia näytteitä oli 206 (14,1 %), harmaita 70 (4,8 %) ja negatiivisia 1188 (81,1 %). Kuviossa 3 esitettyssä kaaviossa havaitaan, että absorbanssitulokset ovat vinosti jakautuneita. Valta-osassa näytteitä absorbanssit ovat matalia ja vastaavat vasta-ainetasoiltaan negatiiviseksi tulkittuja tuloksia, joissa S/CO on alle 1.0.



KAAVIO 3. MOMP spesifisten vasta-aineiden absorbanssien jakauma

Laboratoriotyön toisessa vaiheessa analysoitiin HPS60-IgG-vasta-aineiden pitoisuus 276 näytteestä, jotka olivat MOMP-vasta-aine positiivisia. Mittaus ja tulosten käsittely suoritettiin samaan tapaan kuin ensimmäisessä vaiheessa. Yhteensä 129 (62,6 %) näytteistä oli positiivista ja 14 (6,8 %) oli harmaita. Kaaviossa 4 on esitetty HSP60-spesifisten vasta-aineiden jakauma. Koska kaikki tähän tutkimukseen valituista näytteistä oli MOMP-vasta-aine positiivisia, oli odotettavaa että HSP60-vasta-aine positiivisten osuus oli suurempi kuin vastaavasti kaaviossa 3, jossa lähtökohtaisesti osa tutkittavista ei ole sairastanut klamydia-infektiota eikä ole oletettavaa, että heidän joukossaan olisi usein sellaisia, joilla on vasta-aineita.



KAAVIO 4. HSP60 absorbanssien jakauma

Tulosten perusteella todetaan, että MOMP-vasta-aineita oli naisilla useammin kuin miehillä (16,5 % vrt 9,5 %; $p < 0,001$). MOMP-vasta-aine positiivisista näytteistä valtaosa oli myös HSP60 positiivisia, 74,4 % miehistä ja 82,2 % naisista. Koska HSP60-vasta-aineet tulkitaan kirjallisuuden mukaan liittyvän joko usein toistuvaan tai pitkittyneeseen klamydia-infektioon, näyttää tämän tuloksen perusteella siltä, että infektio on naisilla hiukan useammin toistuva kuin miehillä.

7.2 C. C.trachomatis –spesifisten vasta-aineet tai diagnosoitu klamydia-infektio lapsettomuuden riskitekijänä

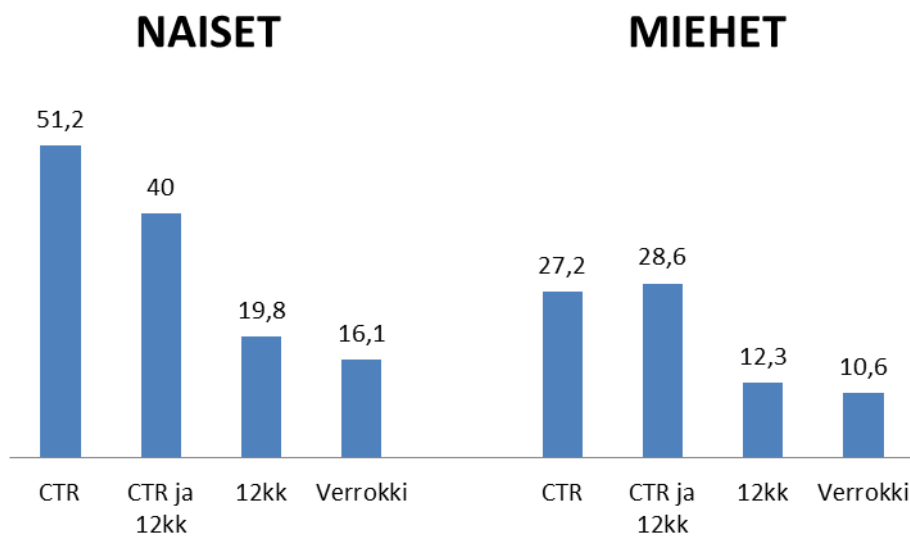
Seuraavaksi analysoitiin, miten klamydia-spesifiset MOMP-vasta-aineet erottavat klamydia-infektion sairastaneet niistä, jotka eivät oman raporttinsa mukaan ole sairastaneet tai eivät ainakaan tiedä sairastaneensa klamydia-infektiota. Sekä naiset että miehet huomioiden, merkittävästi suurempi osa tapauksista jotka olivat raportoineet (23,7 %) kuin niistä, jotka eivät raportoineet sairastaneensa klamydia-infektiota (14,1 %; $p < 0,001$) oli MOMP-vasta-aine positiivisia. Vasta-aineita oli merkittävästi useammin sekä tapausryhmän naisilla (tapaukset 26,9 % ja verrokkit 16,1 %; $p < 0,001$) että miehillä (17,5 % vrt. 10,6 % vastaavasti; $p < 0,03$).

Tämän jälkeen analyysissä huomioitiin omana ryhmänään henkilöt, jotka raportoivat kärsineensä lapsettomuusongelmista (yrittäneen hedelmöitystä > 12 kk jakson). Oletuksena oli, että ilman klamydia-historiaa lapsettomuusongelmista kärsivien joukossa on yhtä paljon MOMP- vasta-aine positiivisia kuin verrokeissa ja vähemmän kuin muissa tapausten alaryhmissä. Kuten kuvassa 7 on esitetty, MOMP-vasta-ainepositiivisia on merkittävästi enemmän tapauksilla, jotka ovat raportoineen sairastaneensa klamydia-infektion ($p < 0,001$ naisilla ja $p < 0,05$ miehillä) verrattuna verrokkiryhmään. On kuitenkin huomattava, että infektion sairastaneillakaan ei kaikilla ole ja toisaalta verrokeillakin on mitattavia määriä vasta-aineita.

Vasta-aineiden puuttuminen infektion sairastaneilta henkilöiltä on selitettävissä muun muassa sillä, että kaikki raportoidutkaan infektiot eivät välttämättä ole olleet oireisia, eikä immunologista vastetta ole muodostunut. Osa infektioista todetaan klinikoilla sattumalta oireettomilta ihmisiltä, jotka haluavat testauttaa sukupuolitaudit esimerkiksi oltuaan seksikontaktissa aiemmin tuntemattoman henkilön kanssa. Toisaalta T2000 aineiston pohjalta meillä ei ole tietoa miten pitkä aika sairastetusta infektiosta on. Vaikka immunologinen vaste olisikin tuottanut vasta-

aineita, vasta-aineiden lähtötasoista riippuu, miten pitkään niitä on seerumista mitattavissa. Ellei infektio ole uusiutunut, ne häipyvät vuosien kuluessa mittaamattomalle tasolle. (Surcel ym 1993, 458)

Verrokkien vasta-ainepositiivisten joukko selittyy sillä, että klamydia-infektio on tyypillisesti oireeton, eikä infektiota ole koskaan diagnosoitu eikä todennäköisesti hoidettu. Vasta-ainepositiivisten osuuden vertailukelpoisuus verrokkien ja tapausten kesken, jotka eivät raportoi sairastaneensa klamydia-infektiota, tukee käsitystä, että huomattavalla osalla hedelmällisyshoitoihin osallistuvista taustalla ei välttämättä ole klamydia-infektio. Yhä suuremmalla osalla hedelmöityshoitoihin osallistuvilla ongelmien taustalla on nykyään hormonaaliset tm syyt. Synnytysien nousu vaikuttaa osaltaan alentuneeseen hedelmällisyyteen sekä naisilla että miehillä. (Klementti 2010, 3129–3134, Tiitinen ym. 2006, 1533-1538)



KUVA 7. *C.trachomatis* -spesifisten vasta-aine positiivisten prosentuaalinen osuus tapausten alaryhmien (CTR historia, CTR historia ja >12 kk lapsettomuustausta ja >12 kk lapsettomuustausta ilman CTR historiaa) ja verrokkien joukossa naisilla ja miehillä.

8 POHDINTA

Tutkimuksen tavoitteena oli arvioida seerumista mitattavien klamydia-spesifisten IgG-vasta-aineiden merkitystä ja soveltuvuutta *C.trachomatis*-infektion osoittamisessa. Tulosten mukaan klamydian MOMP-proteiinille spesifisiä vasta-aineita oli noin 14,1 prosentilla kaikista tutkittavista näytteistä. Luku vastaa hyvin aiemmin raportoitua klamydia-spesifistä seroprevalenssia eli vasta-aineiden esiintyvyyttä väestössä 2000-luvun vaihteessa. (Lyytikäinen ym. 2008, 19-22)

Oman tutkimuksemme vahvuutena on se, että käytössä oli tietoa myös miesten infektiosta ja lapsettomuushistoriasta. Tässä työssä saatujen tulosten perusteella miehet sairastaisivat klamydia-infektioita useammin kuin naiset. Tulos on ristiriidassa THL:n ylläpitävän tartuntatautirekisteri tiedon kanssa jossa yli puolet ilmoitetuista klamydia-tapauksista on naisilla. Ensimmäiset klamydia-infektiot ilmaantuvat yleisimmin alle 25-vuotiailla nuorilla. Wikströmin ja työryhmän tutkimusten mukaan miesten suhteellinen osuus raportoiduista infektiosta kuitenkin nousee 30-ikävuotta lähestyttäessä, mikä osaltaan selittää itse raportoitujen klamydia-infektioiden suurempaa osuutta miehillä. Tähän tutkimukseen sisällytettyjen tutkittavien keski-ikä oli yli 40 vuotta, ja on mahdollista että naiset eivät muista tai halua muistaa sairastettua infektiota, josta voi olla jo vuosia. (Jaakola ym. 2013, 25; Wikström ym. 2012, 968-972)

Tulostemme mukaan naisilla havaittiin merkittävästi useammin klamydia-spesifisiä vasta-aineita kuin miehillä, mikä on yhtäpitävä tartuntatautirekisteritiedon kanssa. Tämän perusteella voidaan päätellä seerumin MOMP-vasta-aine määrityksen olevan luotettavampi aiemman infektion markkeri kuin itse raportoitu infektio. Päätelmää tukee myös tuloksemme, missä todettiin klamydia-spesifisen MOMP-vasta-ainetestin selvästi erottavan klamydia-infektion sairastaneet niistä, jotka eivät oman raporttinsa mukaan ole sairastaneet tai eivät ainakaan tiedä sairastaneensa klamydia-infektiota. HSP60-vasta-aineanalyysillä ei tässä tutkimuksessa saatu lisäarvoa, koska analyysieihin valittiin vain MOMP-positiiviset näytteet. HSP60-vasta-aineiden esiintyvyys korreloi MOMP-vasta-ainepositiivisuuden kanssa. HSP60-spesifisiä vasta-aineita pidetään kroonisen tai toistuvan klamydia-infektion markkerina ja niiden esiintyvyys on kirjallisuuden mukaan merkittävästi korkeampaa klamydia-infektion komplikaatioista, kuten esim lapsettomuudesta kärsivillä henkilöillä (Tiitinen ym. 2006, 1533-1538)

Opinnäytetyön teko oli mielekästä ja antoisaa, sekä sopivassa määrin haasteellista. Olen iloinen, että sain olla osana näin mielenkiintoista ja yhteiskunnallisesti tärkeää tutkimusta. Tunnen oppineeni huomattavasti itse aiheesta, mutta myös tiedon etsimisestä ja julkaisujen kriittisen lukemisesta. *C. trachomatis* oli bakteerina itselleni tuntematon, joten jouduin perehtymään aiheeseen syvällisesti, jotta sain ymmärryksen kokonaiskuvasta. Tavoitteenani oli syventää osaamistani tulevassa ammatissani klamydiainfektion diagnostiikasta ja tutkimusmenetelmistä, mikrobiologiasta sekä itse tutkimustyöstä ja uskon saavuttaneeni tavoitteet. Vaikka laboratoriotyö ja menetelmät ovat nykyään pääasiassa automatisoituja, on tulosten oikeellisuuden ja luotettavuuden arviointi kuitenkin osa vastuullista laboratoriotyötä. Koen, että tämä opinnäytetyö auttaa minua kehittämään omaa ammattitaitoani myös työn teoreettiselta pohjalta.

Opinnäytetyön laboratoriotyön suoritus onnistui hyvin. Analyysien kitteihin oli selkeät ohjeet ja analyysijä oli helppo tehdä seuraamalla niiden ohjeistusta. Myös neuvolaserologian laboratorion apulaistutkijat kantoivat kortensa kekoon ja auttoivat minua paljon. Sain heiltä hyviä ohjeita käytännön työn organisoimiseen ja toteuttamiseen.

Dosentti Heljä-Marja Surcelin opastuksella sain kokonaiskuvan klamydian aiheuttamista ongelmista seksuaaliterveydessä ja sen vaikutuksesta yhteiskuntaan. Hänen innostuksensa seksuaaliterveyden tutkimiseen ja klamydiaserologiaan sai minut pohtimaan jatkokouluttautumista samaan suuntaan. Koen ylpeyttä tekemästani työstä ja uskon että tästä opinnäytetyöstä on minulle vielä hyötyä tulevaisuudessa työelämässä.

Eettisesti opinnäytetyön tutkimus on hyväksyttävää, koska Terveys 2000 tutkimukseen osallistuminen ja näytteen antaminen on ollut vapaaehtoista. Osallistujat ovat tietoisia terveystarkastuksen tietojen, näytteiden ja kyselyiden tutkimuskäytöstä.

LÄHTEET

- ANILabsystems. 2009. Chlamydia trachomatis IgG EIA. Instructions for use. Vantaa: Ani Labsystems Ltd. Oy
- Duodecim. Terveyskirjasto. 2013. Seksitaudit raskauden aikana. Hakupäivä 18.7.2013. http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=tes00014
- GEN-PROBE. 2012. Transcription-Mediated Amplification (TMA) Technology. Hakupäivä 27.2.2014. <http://www.gen-probe.com/science/index.aspx>
- Hedman, K., Heikkinen, T., Huovinen, P., Järvinen, A., Meri, S. 2010. Mikrobiologia – Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet. Teoksessa: Vaara, M. (toim.). Helsinki: Kustannus Oy Duodecim, 287-296
- Hiltunen-Back, E. 2013. Klamydiauretriitti ja –servisiitti. Lääkärikirja Duodecim, Hakupäivä 12.7.2013
- Hirsjärvi, S., Remes, P., Sajavaara, P. 2007. Tutki ja kirjoita. 13., osin uudistettu painos. Keuruu: Otavan Kirjapaino Oy.
- Homepage of Andy Vierstraete. Hakupäivä 11.8.2013. Principle of the PCR. <http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>
- Huovinen, P., Meri, S., Peltola, H., Vaheri, A., Valtonen, V. 2003. Mikrobiologia ja infektiosairaudet. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim, 621
- Huslab. 2013. Tutkimusohjekirja. Chlamydia trachomatis, viljely. Hakupäivä 15.6.2013. http://huslab.fi/cgi-bin/ohjekirja/tt_show.exe?assay=2059&terms=chlamydia,trachomatis
- Jaakola, S., Lyytikäinen, O., Rimhanen-Finne, R., Salmenlinna, S., Savolainen-Kopra, C., Pirhonen, J., Vuopio, J., Jalava, J., Toropainen, M., Nohynek, H., Toikkanen, S., Löfl, J., Kuusi, M., Salminen, M. 2013. Tartuntataudit Suomessa. THL. Raportti: 2014_016
- Joki-Korpela P, Sahrakorpi N, Halttunen M, Surcel HM, Paavonen J, Tiitinen A. 2009. The role of Chlamydia trachomatis infection in male infertility. Fertil Steril, 1448-50
- Jolly, C., Morimoto, R. 2000. Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death. Journal of the National Cancer Institute. 92 (19), <http://groups.molbiosci.northwestern.edu/morimoto/research/Publications/JollyJCNI00.pdf>

Kansanterveyslaitos. 2007. Kansanterveys 3/2007. Alkoholi ja terveys. Tartuntataudit. Hakupäivä 15.6.2013.

<http://www.julkari.fi/bitstream/handle/10024/102117/kansanterveys307final.pdf?sequence=1>

Karinen, L. Chronic Chlamydial Infektion: Impact on Human Reproductive Health. Oulu: Oulu University Press.

Kinnunen, A. Paavonen, J. Surcel, H-M. Heat Shock Protein 60 Specific T-Cell Response in Chlamydial Infections. Scandinavian Journal of Immunology 2001;54:76-81

Klemetti, R., Hemminki, E., Gissler, M. 2010. Yli 40-vuotiaan naisen raskaus. Lääkärilehti. 39/2010

Kurki, R., Pammo, H. 2010. Tartuntataudit ja hoitotyön osaaminen. Helsinki: WSOYpro Oy, 93–106

Lyytikäinen E, Kaasila M, Koskela P, Lehtinen M, Patama T, Pukkala E, Tasanen K, Surcel HM, Paavonen J. 2008. Chlamydia trachomatis seroprevalence atlas of Finland 1983-2003. Sex Transm Infect. 19-22

Morimoto, R. 1998. Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of the heat shock factors, molecular chaperones and negative regulators. Gene & Development 12(24). <http://genesdev.cshlp.org/content/12/24/3788.full.pdf+html?sid=95c8607c-43bb-4d9c-83e5-d7588abaf3c1>

Mygind, T. 2002. Chlamydia pneumonia: PCR detection and cell-mediated immune response to infection. Denmark. Faculty of Health Sciences University of Aarhus

Nordlab. 2014a. Tutkimusohjekirja. Chlamydia trachomatis, antigeeni. Hakupäivä 15.6.2013. http://oyslab.fi/cgi-bin/ohjekirja/tt_show.exe?assay=3294&terms=chlamydia,trachomatis

Paavonen, J. 2011. Klamydiatulehdus. Lääkärikirja Duodecim, Hakupäivä 12.7.2013.

Pasternack, R. 1997. Molecular biological techniques in the diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections. Vammala: Vammalan kirjapainos Oy

Peipert, J. 2003. Genital Chlamydial Infections. The New England Journal of Medicine. 2003;349:2424-30
<http://jasoncartermd.com/resources/pdf/Genital%20Chlamydial%20Infections.pdf>

Reunala, T., Paavonen, J., Rostila, T. 2003. Sukupuolitaudit. 2. uudistettu painos. Helsinki: Kustannus Duodecim Oy, 21-31

Salmi, M. Renkonen, R. 2003. Immunologia. Valkosolun tie tulehduspaikalle. Duodecim 2003;119
<http://www.terveyskirjasto.fi/xmedia/duo/duo93536.pdf>

Solunetti. 2006a. Bakterin soluseinä. Hakupäivä 14.6.2013.
http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/bakteerien_soluseina/2/

Solunetti. 2006b. Langerhansin solut. Hakupäivä 3.6.2013.
http://www.solunetti.fi/fi/histologia/langerhansin_solut/

Terveys 2000. Tutkimuksen taustaa. Hakupäivä 25.4.2014.
<http://www.terveys2000.fi/taustaa.html>

Terveys 2011. Etusivu. Hakupäivä 25.4.2014. <http://www.terveys2011.info/index.html>

Terveysportti. 2013a. Lääkärikirja. Tietoa potilaalle: Kiveksen ja lisäkiveksen tulehdus. Sisäinen lähde. Hakupäivä 18.7.2013.

http://www.terveysportti.fi.ezp.oamk.fi:2048/dtk/ltk/koti?p_artikkeli=ykt00297&p_haku=lis%C3%A4kivistulehdus

Terveysportti. 2013a. Lääkärin käsikirja. Reaktiivinen niveltulehdus. Sisäinen lähde. Hakupäivä 18.7.2013.

[http://www.terveysportti.fi.ezp.oamk.fi:2048/dtk/ltk/koti?p_artikkeli=ykt00517&p_haku=reaktiivinen%20niveltulehdus tietoa potilaalle: reaktiivinen niveltulehdus](http://www.terveysportti.fi.ezp.oamk.fi:2048/dtk/ltk/koti?p_artikkeli=ykt00517&p_haku=reaktiivinen%20niveltulehdus+tietoa+potilaalle:reaktiivinen+niveltulehdus)

TestLine Clinical Diagnostics Ltd. 2013. Enzyme immunoassays for the diagnosis of chlamydia infections. Hakupäivä 10.3.2014. <http://www.testlinecd.com/file/1553/Chlamydie.pdf>

THL. 2014. Tartuntatautirekisteri. Tartuntatautirekisterin tilastotietokanta. Hakupäivä 28.11.2013.
https://sampo.thl.fi/sampo_prod/cgi-bin/cognos.cgi?b_action=powerPlayService&ui.action=run&TARGET=%2Fcontent%2Ffolder%5B%40name%3D%27amor_prod%27%5D%2Ffolder%5B%40name%3D%27ttr%27%5D%2Fpackage%5B%40name%3D%27amor_ttr_shp_1350_fi_prod%27%5D

Tiilikainen, A., Vaara, M. 1997. Lääketieteellinen mikrobiologia. 8. uudistettu painos. Teoksessa: Vaheri, A. (toim.). Helsinki: Kustannus Oy Duodecim, 14–264

Tiitinen A, Surcel HM, Halttunen M, Birkelund S, Bloigu A, Christiansen G, Koskela P, Morrison SG, Morrison RP, Paavonen J. 2006 Chlamydia trachomatis and chlamydial heat shock protein 60-specific antibody and cell-mediated responses predict tubal factor infertility. Hum Reprod. 1533-1538

World Health Organization. 2014. Prevention of Blindness and Visual Impairment. Causes. Priority eye diseases. Trachoma. Hakupäivä 20.1.2014.
<http://www.who.int/blindness/causes/priority/en/index2.html>

Yhtyneet Medix laboratoriot 2013b. Laboratoriokäsikirja. Chlamydia trachomatis, vasta-aineet. Hakupäivä 15.6.2013.
<http://www.yml.fi/do.xsp?viewType=productview&redirect1=%2Fdo.xsp%3FobjectType%3Dproduct%26viewType%3Dlistview%26indexLetter%3DC&objectType=product&directoryType=&productOID=69>

Yhtyneet Medix laboratoriot. 2014a. Laboratoriokäsikirja. Chlamydia trachomatis ja Neisseria gonorrhoeae, nukleiinihappo. Hakupäivä 6.3.2014.
<http://www.yhtyneetlaboratoriot.fi/do.xsp?viewType=productview&redirect1=%2Fdo.xsp%3FobjectType%3Dproduct%26viewType%3Dsearchview%26process%3Dtrue%26productkeywords%3Dchlamydia%2Btrachomatis&objectType=product&directoryType=&productOID=6>

Öhman, H. 2012. Immunogenetic risk factors of *Chlamydia*-induced tubal factor infertility. Helsinki: National Institute for Health and Welfare

IgG-VASTA-AINEIDEN MÄÄRITYS

Testissä mitataan kehon tuottamia IgG-vasta-aineita *Chlamydia trachomatis*-bakteerin MOMP:a (major outer membrane protein) vastaan ja vasta-aineiden pitoisuutta seerumissa. Testi on lajikohtainen (*C. trachomatis*) EIA-testi ja se perustuu *C. trachomatis* MOMP:sta johdettuihin synteettisiin peptideihin. Tämä mahdollistaa testin käytön lajikohtaisena seulonta- ja diagnosointimenetelmänä *C. trachomatis* -infektiossa.

Testin periaate

Testi perustuu epäsuoraan kiinteämuotoiseen entsyymi-immunologiseen menetelmään, jossa piparjuuren peroksidaasi (HRP) toimii markkerientsyyminä (merkkiaineena). Jos potilaan seerumissa on *Chlamydia trachomatis* IgG-vasta-aineita, yhdistyvät ne kuoppalevyn kaivon pohjaan kiinnitettyihin synteettisiin peptideihin. Jäljellä jäänyt kiinnittymätön IgG-vasta-aine poistetaan pesemällä ja lisätään piparjuuriperoksidaasi konjugoitu anti-humaani-IgG-vasta-aine (lampaasta). Sitoutumattoman konjugaatti pestään pois ja kromogeeniä (TMB) sisältävä väritön entsyymisubstraatti (H₂O₂) lisätään. Kromogeenin ja substraatin entsyymaattinen reaktio tuottaa värillisen lopputuotteen. Entsyymi-kromogeeni/substraatti -reaktio pysäytetään hapolla (H₂SO₄). Väriin intensiteetti on suoraan verrannollinen klamydia-bakteerin vasta-aineiden pitoisuuteen potilaan näytteessä.

Tuloksien laskukaavaa

Arb = keskiarvo absorbanssi reagenssi nollasta
Apc = keskiarvo absorbanssi positiivisesta kontrollista
As = Keskiarvo absorbanssi näytteestä
CO = Cut-off arvo absorbanssi yksiköistä

$CO = 0.6 \times (Abs - Arb)$
 $S/CO = (As - Arb) / CO$

Testikitin reagenssit ja välineet

Kitin mukana tulevat välineet ja reagenssit

- Kuoppalevy, 96 kuppainen
- Näytelaimennin 30ml, Tris-puskuroitu suolavesi, sinivärväävää reagenssia ja säilöntäainetta 0.05% Bronidox.
- Negatiivinen kontrolli 1ml, ihmisperäistä Chlamydia trachomatis vasta-ainenegatiivista seerumia ja säilöntäainetta 0.05% Bronidox
- Positiivinen kontrolli 1ml, ihmisperäistä Chlamydia trachomatis vasta-ainepositiivista seerumia ja säilöntäainetta 0.05% Bronidox
- Konjukaatti
- TMB-substraattiliuos
- Pysäytysliuos 25ml, 0.45M H₂SO₄
- Pesuliuos 100ml, sitraatti-puskuroitu suolaliuos ja säilöntäainetta 0.05% Bronidox

Testin vaiheet

Testin suorittamiseen suositellaan käytettäväksi 8-kanavaista mäntäpipettiä. Muita tarvittavia välineitä ovat

- pipetinkärjet
- kertakäyttöhansikkaat
- inkubaattori
- ajastinkello
- fotometri

Proseduuri on nelivaiheinen ja se alkaa ottamalla reagenssit ja kuoppalevyt huoneenlämpöön ennen testin aloittamista. Esilämmitä inkubaattori +37C. Sekoita 1 osa pesupuskuria 9 osaan vettä.

Vaihe 1, pipetoi 180 µl näytelaimenninta (reag. 2) jokaiseen käyttämäsi kaivoon. Pipetoi yhteen kaivoon 20 µl näytelaimenninta reagenssien nollaksi, 20 µl näytteitä, negatiivista kontrollia ja 20 µl positiivista kontrollia. Sekoita hyvin. Peitä käyttämäsi kaivot muovitarralla. Inkuboi 30min (+-3) minuuttia +37C (+-1). Pese kuopat 5 x 400 µl pesuliuosta.

Vaihe 2, Pipetoi 200 µl konjukaattia (reag. 4) jokaiseen kaivoon. Peitä kaivot muovitarralla ja inkuboi 30 (+-3) minuuttia +37C (+-1C). Pese kuopat 5 x 400 µl pesuliuosta.

Vaihe 3, lisää 200 µl TMB-substraattia (reag. 5) jokaiseen kaivoon. Inkuboi 15 (+-1) minuuttia huoneenlämmössä (+20-25C) pimeässä.

Vaihe 4, pysäytä entsyymi-substraattireaktio lisäämällä 100 µl pysäytysliuosta (reag. 6) jokaiseen kaivoon. Mittaa absorbanssi välittömästi 450nm / referenssi 620nm (590-690nm)

LÄMPÖSHOKKIPROTEIINI60-IgG-VASTA-AINEIDEN MÄÄRITYS

Testissä mitataan kehon tuottamia IgG-vasta-aineita EIA-menetelmällä klamydia spesifisiä MOMP- tai HSP60 -proteiinia vastaan ja pitoisuutta seerumissa. Testissä antigeeninä toimii Chlamydia trachomatis-spesifinen rekombinantti lämpöshokkiproteiini60 (HSP60), johon näytteen HSP60-IgG-vasta-aineet tarttuvat. Testin periaate on selitetty kuvassa 1. Tulosten tulkinnessa käytettiin valmistajan määäämiä kittikohtaisia raja-arvoja; $S/CO < 0.9$ negatiivinen, $0.9 \leq S/CO < 1.1$ harmaa eli epäselvä, sekä $S/CO \geq 1.1$ positiivinen. Tuloksien laskukaava

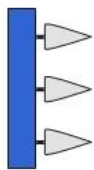
OD sample = näytteen absorbanssi

OD cut off = negatiivisten kontrollien keskiarvo + 0,350

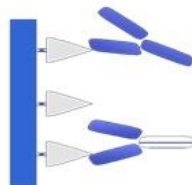
endtiter = cut off index x 55,5

CO index = OD sample / OD cut off

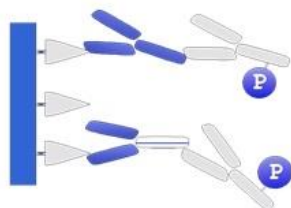
Testin periaate



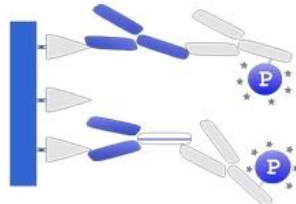
Kuoppa on päällystetty Chlamydia trachomatis-bakteerista saadulla rekombinantilla lämpöshokkiproteiini60 (HSP60).



Näytteen HSP60-vasta-aineet tarttuvat vasta-aineeseen.



Peroksidaasi-konjukoitu anti-humaani IgG-vasta-aineet sitoutuvat HSP60-vasta-aineisiin (P = peroksidaasi).



Inkuboidaan TMB-substraatin kanssa (*). Reaktio pysäytetään rikkihapolla ja värin voimakkuus mitataan fotometrillä.

KUVA 1. Testin periaate

Testin reagenssit ja välineet

Kitin mukana tulevat välineet ja reagenssit

- Kuoppalevy, 96 kuoppainen
- Negatiivinen kontrolli 1,5ml, käyttövalmis, ihmisperäistä seerumia, sisältää sinistä väriainetta, NBCS, fenolia, ProClin™ 300 ja gentamycine sulfate
- Positiivinen kontrolli 1,5ml, käyttövalmis, ihmisperäistä seerumia, sisältää sinistä väriainetta, BSA, fenolia, ProClin™ 300 ja gentamycine sulfate
- Pesupuskuri 100ml, PBS/Tween (10x), pH 7.2–7.4, sisältää ProClin™ 300
- Näytelaimennin 110ml, PBS/Tween/NBCS, pH 7.0–7.2, sininen väriaine (stained blue), sisältää ProClin™ 300
- Konjukaatti 3 x 4.5ml, käyttövalmis, päällystetty anti-ihmis IgG, HRP-conjugated, vihreä väriaine, sisältää BSA, fenolia, ProClin™ 300 ja gentamycine sulfate
- TMB-substraatti 10ml, käyttövalmis
- Pysäytysliuos, 2 x 11ml, käyttövalmis, 0.5M rikkihappo (H₂SO₄)

Testin vaiheet

Ennen testin aloittamista tulee reagenssit ottaa huoneen lämpöön. Testin suorittamiseen suositellaan käytettäväksi 8-kanavaista mäntäpipettiä. Muista tarvittavia välineitä ovat

- pipetinkärkiä
- kertakäyttöhansikkaat
- ajastinkello
- inkubaattori
- fotometri

Proseduuri nelivaiheinen ja se alkaa ottamalla reagenssit ja kuoppalevyt huoneenlämpöön ennen testin aloittamista. Esilämmitä inkubaattori +37C. Sekoita 1 osa pesupuskuria 9 osaan vettä.

1. Pipetoi 50 µl näytelaimenninta reagenssien nollaksi kahteen kaivoon, 50 µl negatiivista kontrollia kahteen kaivoon, 50 µl positiivista kontrollia kahteen kaivoon ja laimennettuja näytteitä 50 µl. Peitä kaivot muovitaralla ja inkuboi 60 (+-5) minuuttia +37C (+-1C). Pese kuopat 3 x 200 µl pesuliuosta.

2. Lisää 50 µl konjukaattia jokaiseen kaivoon. Peitä kaivot muovitarralla ja inkuboi 60 (+-5) minuuttia +37C (+-1C). Pese kuopat 3 x 200 µl pesuliuosta.
3. Lisää 50 µl TMB-substraattia jokaiseen kaivoon. Inkuboi 30 (+-2) minuuttia +37C (+-1C) pimeässä.
4. Lisää pysäytysliuosta 100 µl jokaiseen kaivoon. Mittaa absorbanssi välittömästi 450nm ja 620/650nm.