

Klasyfikacja bakterii z uwzględnieniem reklasyfikacji rodziny Chlamydiaceae

KRZYSZTOF NIEMCZUK*, MARIAN TRUSZCZYŃSKI

*Zakład Chorób Bydła i Owiec, Zakład Mikrobiologii Państwowego Instytutu Weterynaryjnego, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Niemczuk K., Truszczyński M.

Bacteria classification, taking into account Chlamydiaceae re-classification

Summary

The paper presents basic data on bacteria classification based on modern molecular methods. It discusses progress in current Chlamydia classification and the changes it which have developed over the last 10 years. Despite numerous achievements, further investigations need to be made into the development of a reliable serological test for diagnosing infections in animals caused by pathogenic Chlamydia.

Keywords: reclassification of bacteria, Chlamydia, Chlamydomphila

Postęp w zakresie taksonomii bakterii

Klasyfikacja drobnoustrojów, w tym bakterii, ma nie tylko znaczenie w tworzeniu doskonalszych systemów taksonomicznych, lecz również wartość praktyczną w diagnostyce laboratoryjnej chorób zakaźnych. Z tego względu uzasadnione jest zapoznanie się z najnowszymi danymi, stanowiącymi podstawę klasyfikacji drobnoustrojów w ogólności, a następnie skoncentrowanie się bardziej szczegółowo, na klasyfikacji chlamydii. Skłaniają ku temu również niejasności co do wiarygodności wyników laboratoryjnego rozpoznawania chlamydioz zwierząt (4, 19, 30).

Klasyfikacja bakterii pierwotnie oparta była na podobieństwie cech fenotypowych, tj. morfologicznych, biochemicznych i antygenowych oraz chorobotwórczości dla zwierząt laboratoryjnych (15, 17, 19, 20, 26). W latach sześćdziesiątych oprócz cech fenotypowych do klasyfikacji bakterii wprowadzono badanie kwasów nukleinowych (2, 12, 15, 30). Taksonomicznie ważną okazała się zawartość guaniny i cytozyny (G+C) w DNA. Jest to wyrażona w procentach ilość guaniny i cytozyny w stosunku do wszystkich zasad azotowych: $(\text{guanina} + \text{cytozyna}) / (\text{guanina} + \text{cytozyna} + \text{tymina} + \text{adenina}) \times 100\%$. W rezultacie uzyskuje się wartości w zakresie od 25 do 75%. Podobne wartości tego wskaźnika dwóch porównywanych szczepów nie muszą świadczyć o bliskim pokrewieństwie taksonomicznym, natomiast wartości znacznie od siebie odbiegające wskazują na brak pokrewieństwa (3, 14, 16).

W kolejnych latach wykorzystano doskonalsze techniki, umożliwiające dokładniejsze badanie kwasów nukleinowych, a także elementów komórki bakteryjnej jak białka, rybosomy czy enzymy (np. polimerazy DNA). Rozwinięto też badania genetyczne, związane z wymianą genów chromosomalnych (DNA nukleoidu) i pozachromosomalnych (3, 9). Wykazane wymienionymi metodami podobieństwa porównywano z ich podobieństwem

fenotypowym. Okazało się, że na ogół podobieństwa bakterii uzyskane na podstawie określenia względnej zawartości zasad: guaniny (G) i cytozyny (C), wyrażonej w procentach (G+C w %) w wysokim stopniu korelują z podobieństwem fenotypowym dla tej samej grupy taksonomicznej szczepów kwalifikowanych do gatunku lub rodzaju (9, 10, 14).

Inną metodą opartą o techniki molekularne, wykorzystywaną w klasyfikacji drobnoustrojów, jest analiza genu 16S i 23S rRNA. Szczególnie gen 16S rRNA jest bardzo dogodny do klasyfikacji, ponieważ występuje we wszystkich bakteriach i posiada zarówno sekwencje nukleotydowe w wysokim stopniu konserwatywne (stabilne), jak i sekwencje bardziej zmienne. Ta druga cecha pozwala na klasyfikację zarówno na najniższym, jak i najwyższym poziomie taksonomicznym. Porównując u różnych szczepów bakteryjnych sekwencje w wysokim stopniu konserwatywne, można stwierdzić różnice taksonomiczne na poziomie wyższych jednostek taksonomicznych, natomiast porównując regiony bardziej zmienne ocenia się rozbieżności na poziomie gatunków lub szczepów. Geny 16S i 23S RNA trawi się do krótkich oligonukleotydów, w których łatwo jest ustalić sekwencję zasad. Pokrewieństwo filogenetyczne jest proporcjonalne do liczby sekwencji oligonukleotydów występującej u obu porównywanych gatunków. Ponieważ sekwencja rybosomalnego RNA jest zachowana podczas ewolucji, taka analiza może wykryć pokrewieństwo nawet między odległymi gatunkami wg obecnej taksonomii. Metoda ta jest szczególnie przydatna w przypadku klasyfikowania szczepów nietypowych biochemicznie, mających nietypowe profile enzymatyczne oraz kiedy zawodzą tradycyjne metody dochodzenia epidemiologicznego (2, 15, 16, 30).

Amplifikacja odcinka polimorficznego znajdującego się między sekwencjami 16S i 23S jest szybką, nowoczesną metodą pozwalającą na wykazanie różnic taksonomicznych oraz związków ewolucyjnych pomiędzy

bakteriami, a także odgrywa obecnie podstawową rolę w diagnostyce laboratoryjnej. Analiza produktów amplifikacji całkowicie definiuje filogenetyczne relacje pomiędzy badanymi mikroorganizmami, wypierając tradycyjne metody identyfikacji oparte m.in. o testy biochemiczne, serotypowanie, fagotypowanie, analizę profilu enzymatycznego (2, 3, 14-16, 28).

Ciągły postęp dokonujący się w badaniach taksonomicznych doprowadził do zasadniczych zmian i szeregu weryfikacji poszczególnych grup taksonomicznych w systematyce bakterii. W niektórych przypadkach, uznane przy zastosowaniu klasycznych metod, gatunki drobnoustrojów należące do określonych grup, są przenoszone do innych ze względu na brak pokrewieństwa kwasu dezoksyrybonukleinowego (DNA). Takie postępowanie wiąże się nie tylko z innym zaszeregowaniem, ale niekiedy także z koniecznością zmian nazw drobnoustrojów. To z kolei jest niekiedy przyczyną nieporozumień. Jednak oparcie się na wynikach badań genomu bakterii doprowadza do tworzenia bardziej trwałego systemu taksonomicznego niż miało to miejsce, kiedy opierano się na cechach fenotypowych (15, 16, 30).

W konkluzji można stwierdzić, iż podstawą zmian w systematyce i taksonomii są następujące wyznaczniki klasyfikacyjne: procent hemologii całkowitego DNA, procentowa zawartość cytozyny i guaniny w DNA oraz sekwencja nukleotydów genów 16S i 23S w rRNA (2, 20, 27). Dane te uwzględniono już w Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (dodruk wydania VIII t. I – Bakterie Gram-ujemne z 1984 r. i w t. II – Bakterie Gram-dodatnie z 1986 r.). Natomiast ostatnie, IX wydanie tej publikacji z 1994 r., opiera się na danych związanych z identyfikacją bakterii, a nie ich taksonomią. Wprowadzone nowe nazwy i zmiany w klasyfikacji bakterii uważa się za obowiązujące od daty publikacji w International Journal of Systematic Bacteriology (14, 15, 16).

Taksonomia i identyfikacja chlamydii, z uwzględnieniem reklasyfikacji rodziny *Chlamydiaceae*

Taksonomia rzędu *Chlamydiales*, do którego należy rodzina *Chlamydiaceae* ulegała w czasie ostatnich kilkudziesięciu lat częstym zmianom. W związku z wynikami badań ostatnich lat wskazane jest przedstawienie aktualnego poglądu na klasyfikację drobnoustrojów z rodziny *Chlamydiaceae* (15, 16, 17).

W Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, w wydaniu VI, z 1948 r. wyodrębniono rząd *Rickettsiales*, obejmujący trzy rodziny: *Rickettsiaceae*, *Bartonellaceae* i *Chlamydozoaceae*. Do rzędu tego zaliczono drobnoustroje nieprzesączalne, rozwijające się wewnątrzkomórkowo lub w ścisłym kontakcie z komórką gospodarza.

W kolejnym VII wydaniu podręcznika Bergey'a z 1957 r. wyodrębniono klasę *Microtobiotes*, obejmującą drobnoustroje pasożytujące wewnątrzkomórkowo. W obrębie tej klasy znalazły się dwa rzędy: *Virales* i *Rickettsiales*. Wyodrębnienie dwóch rzędów zostało dokonane na podstawie różnic właściwości biologicznych, a

zwłaszcza odmiennego sposobu rozmnażania się tych dwóch grup drobnoustrojów. Zgodnie z tym VII wydaniem Bergey'a rząd *Rickettsiales* zawierał cztery rodziny: *Rickettsiaceae*, *Chlamydiaceae*, *Bartonellaceae* i *Anaplasmataceae*. Należy zauważyć, że właśnie w tym wydaniu Bergey'a, charakterystyczny dla tej grupy drobnoustrojów sposób rozmnażania, który zostanie omówiony w dalszej części artykułu, został wykorzystany jako kryterium taksonomiczne.

W następnym, VIII wydaniu Bergey's Manual of Determinative Bacteriology z 1974 r., zniesiono klasę *Microtobiotes*, a wyodrębniono grupę drobnoustrojów, której nadano wspólną nazwę riketsje (18 grupa *Rickettsias*, 13, 33).

Kolejna zmiana w klasyfikacji riketsji, umieszczona we wznowionym w 1984 r. wydaniu VIII, polegała na wyodrębnieniu dwóch rzędów: *Rickettsiales* i *Chlamydiales*. W obrębie tego drugiego wyodrębniono rodzinę *Chlamydiaceae*, a w jej ramach rodzaj *Chlamydia*. W tym rodzaju wyróżniono dwa gatunki: *C. trachomatis* i *C. psittaci* (13, 20, 33).

Według ostatniego IX wydania Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (1994), w rodzaju *Chlamydia* ustanowiono cztery gatunki: *C. trachomatis*, *C. psittaci*, *C. pneumoniae* i *C. pecorum* (22, 24, 25).

W 1999 r. na łamach International Journal of Systematic Bacteriology ukazał się artykuł (15), w którym na podstawie przeprowadzonej filogenetycznej analizy genów 16S i 23S rRNA dokonano gruntownej reklasyfikacji chlamydii. Utrzymuje ona w rodzinie *Chlamydiaceae*, obecnie znane szczepy, posiadające większą niż 90% identyczność 16S rRNA, a oddziela inne, podobne do chlamydii organizmy posiadające mniejszą niż 80% identyczność 16S rRNA, grupując je w nowe rodziny: *Parachlamydiaceae*, *Simkaniaceae*, *Waddliaceae* (17, 22). Z chlamydii, które uprzednio opisywano (1, 17, 20, 26) jako *Candidatus Parachlamydia acanthamoebae* utworzono rodzinę *Parachlamydiaceae*. W tym nowym ujęciu (15) drobnoustroje z rodziny *Chlamydiaceae* są podzielone na dwa rodzaje: *Chlamydia* i *Chlamydophila*. Do rodzaju *Chlamydia* zostały zaliczone *C. trachomatis*, *C. muridarum* i *C. suis*, natomiast do rodzaju *Chlamydophila* włączono: *C. abortus*, *C. psittaci*, *C. cavae*, *C. felis*, *C. pecorum* i *C. pneumoniae*. Szczegółowe dane na temat aktualnej klasyfikacji rodziny *Chlamydiaceae* przedstawia ryc. 1.

Omówione zasadnicze zmiany w klasyfikacji i nazewnictwie drobnoustrojów należących do rodziny *Chlamydiaceae*, mimo że były opublikowane na łamach International Journal of Systematic Bacteriology (15) oraz można je znaleźć na internetowych stronach Bergey's Manual Trust 2000, spotkały się z poważną krytyką zamieszczoną w liście otwartym do wydawnictwa wymienionego czasopisma. List ten został także udostępniony na stronach internetowych. Szereg imiennie podpisanych badaczy, głównie z Chlamydia Research Laboratory University of California, San Francisco, uznało że najnowsza reklasyfikacja chlamydii jest zbyt śmiała i opar-

ta na zbyt małych różnicach sekwencji genów 16S i 23S rRNA. Ponadto podkreślają oni, że niektóre nowe gatunki zawierają zdecydowanie za mało izolatów aby mogły być w pełni wiarygodne. Istotną wydaje się być uwaga autorów listu, dotycząca samego genu 16S rRNA. Uważają oni bowiem, że mimo zgodności poglądów wśród mikrobiologów zajmujących się taksonomią, iż gen 16S rRNA jest jak najbardziej przydatny do badań ewolucyjnych, to w przypadku wyboru tego genu do różnicowania na szczepy takiej zgodności już nie ma. W takim przypadku sugerują raczej konieczność użycia genów rodzajowo specyficznych. Ponadto zarzucają autorom reklasyfikacji, że zbyt arbitralnie zdefiniowali, iż homologia DNA wyższa niż 90% jest wystarczająca do zaliczania badanych szczepów do jednego rodzaju.

Cykl rozwojowy, właściwości morfologiczne i zawartość kwasów nukleinowych u chlamydii

Chlamydie charakteryzują się unikalnym, niespotykanym u innych drobnoustrojów cyklem rozwojowym, który został opisany po raz pierwszy przez Bedsona i Blanda (6), a następnie potwierdzony kolejno przez innych autorów (1, 7, 11, 25, 29, 31) (ryc. 2). Charakteryzują go dwie postaci morfologiczne: zakaźne ciało elementarne (elementary body – EB) zdolne do bytowania pozakomórkowego i ciało siatkowate (reticulate body – RB), które stanowi wyłącznie wewnątrzkomórkową niezakaźną formę chlamydii. Badania przy użyciu mikroskopu elektronowego wykazały, że ciała elementarne wiążą specyficzne receptory komórki gospodarza i wnikają do komórki atakowanej na drodze endocytozy. Uważa się, że za proces ten odpowiedzialne jest głównie immunogenne białko błony zewnętrznej (major outer membrane protein – MOMP, 5, 7, 21).

Ciała elementarne są dojrzałymi komórkami bakterieryjnymi. Mają one kształt sferyczny. W obrazie, widocznym w mikroskopie elektronowym rozróżnia się jaśniejszą warstwę zewnętrzną oraz ciemniejszą wewnętrzną – stanowiącą błonę, która otacza cytoplazmę. Szczególną cechą ciałek elementarnych jest zdolność do zakażenia i wzrostu w makrofagach po dostaniu się do organizmu gospodarza. Dzięki nim drobnoustroje mogą rozprzestrzeniać się w całym organizmie. Komórki te barwią się na purpurowo, natomiast wspomniane wcześniej ciała siatkowate na niebiesko, przy zastosowaniu barwienia metodą Giemsa (12, 24). Istotną wydaje się być zawartość kwasów nukleinowych u poszczególnych form rozwojowych. Elementarne ciała mają mniej więcej równe ilości DNA i RNA, natomiast w ciałkach siatkowatych

- *Chlamydiaceae*
 - *Chlamydia*
 - *Chlamydia trachomatis*
 - *Chlamydia muridarum*
 - *Chlamydia suis*
 - *Chlamydia sp.*
 - *Chlamydophila*
 - *Chlamydophila abortus*
 - *Chlamydophila psittaci*
 - *Chlamydophila caviae*
 - *Chlamydophila felis*
 - *Chlamydophila pecorum*
 - *Chlamydophila pneumoniae*
- *Parachlamydiaceae*
 - *Neochlamydia*
 - *Neochlamydia bartmannellae*
 - *Parachlamydia*
 - *Parachlamydia acanthamoebae*
 - **Niesklasyfikowane *parachlamydiaceae***
 - *Simkaniaceae*
 - *Simkania*
 - *Simkania negevensis*
 - *Waddaliaceae*
 - *Waddlia*
 - *Waddlia chondrophila*

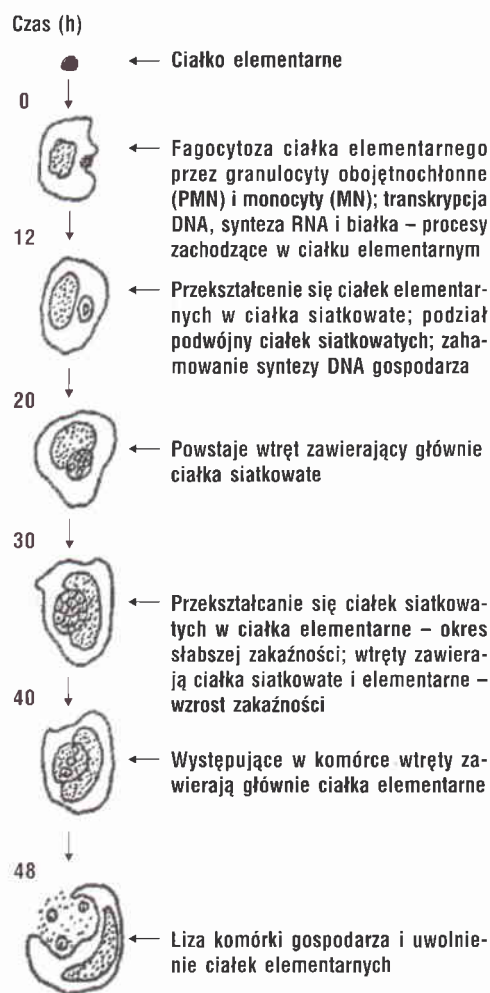
Ryc. 1. Aktualna taksonomia drobnoustrojów z rodziny *Chlamydiaceae* (wg 15)

RNA występuje w trzy do czterokrotnie większej ilości niż DNA. Zawartość DNA jest wielkością stałą, podczas gdy RNA różni się ilościowo w zależności od stadium rozwojowego chlamydii (15, 28). Kolisty genom chlamydii jest stosunkowo mały. Jego masa cząsteczkowa w przypadku *C. trachomatis* wynosi $0,66 \times 10^8$ a u *C. psittaci* – $9,5 \times 10^8$, co stanowi, dla porównania, około jednej czwartej informacji genetycznej *E. coli* (15, 16, 28, 32).

Badanie oczyszczonych zawiesin chlamydii, wolnych od domieszek materiału komórkowego gospodarza wykazuje, że ich ściana komórkowa przypomina ścianę komórkową bakterii gram-ujemnych. Charakteryzuje się ona dużą zawartością lipidów. Jest sztywna, ale nie zawiera typowego dla bakterii peptydoglikanu. Prawdopodobnie w jej skład wchodzi substancja, w której elementem wiążącym są tetrapeptydy. W odróżnieniu od innych bakterii gram-ujemnych u chlamydii nie wykryto kwasu N-acetolo muraminowego. Lizozym nie uszkadza ściany komórkowej chlamydii (3, 12, 15).

Właściwości antygenowe

Z przedstawionej charakterystyki ogólnej wynika, iż przedstawiciele rodzaju *Chlamydia* i *Chlamydophila* posiadają cechy charakterystyczne wyłącznie dla tej grupy drobnoustrojów (np. cykl rozwojowy) oraz właściwości zbliżone do bakterii z jednej, a do wirusów z drugiej strony.



Ryc. 2. Cykl rozwojowy drobnoustrojów z rodziny *Chlamydiaceae*

U przedstawicieli rodziny *Chlamydiaceae* rozróżnia się dwa podstawowe typy antygenów: antygeny grupowo-swoiste i antygeny gatunkowo-swoiste.

Antygen grupowo-swoisty jest wspólny dla wszystkich przedstawicieli rodzaju *Chlamydia* i *Chlamydophila*. Występuje on w ścianie komórkowej. Wykazano go u wszystkich form cyklu rozwojowego, lecz największe jego stężenie obserwuje się kilka godzin przed pojawieniem się form zakaźnych (5, 12, 24). Antygen ten stanowi oporny na ogrzewanie kompleks lipoproteinowo-węglowodanowy (LPS) połączony z kwasem 2-keto-3-deoksyoktonowym jako dominującą komponentą immunologiczną (6, 12, 27). Antygen LPS cechuje się trzema aktywnymi immunologicznie epitopami, z których tylko jeden jest swoisty dla chlamydii, natomiast dwa pozostałe reagują krzyżowo z lipoporysacharydami niektórych bakterii, np. *Acinetobacter calcoaceticus* (4, 7, 18), co jest niekiedy przyczyną wyników fałszywie dodatnich w dotychczas stosowanych metodach serologicznych, np. w odczynie wiązania dopełniacza (OWD). Z kolei niektóre testy ELISA, zawierające przeciwciała monoklonalne dla swoistych epitopów LPS chlamydii, dają możliwość wyeliminowania odczynów krzyżowych z bakteriami gram-ujemnymi (3, 27).

Antygeny gatunkowo-swoiste zostały wykryte przy użyciu nieaktywowanych termicznie zawiesin chlamydii i surowic odpornościowych, z których wyadsorbowano przeciwciała grupowo-swoiste gotowanymi zawiesinami tych drobnoustrojów. Antygeny te występują również w rozpuszczalnych w ługach frakcjach drobnoustrojów poddanych uprzednio działaniu ultradźwięków (7, 12). Za antygeny gatunkowo-swoiste uważane są niektóre immunogenne białka błon komórkowych, np. MOMP, o masie cząsteczkowej 45 kDa, a także inne niezdefiniowane białka, jednak o znanej masie cząsteczkowej: 32 i 16-19 kDa. Są one wspólne dla określonej liczby szczepów chlamydii i można je wykryć głównie techniką immunofluorescencji, zwłaszcza przy zastosowaniu przeciwciał monoklonalnych (7, 21, 30).

Stwierdzono również swoiste gatunkowo pod względem antygenowym toksyny ściśle związane z formą zakaźną chlamydii, występujące u człowieka i u drobiu (12). Wykazano, że podczas cyklu rozwojowego chlamydii pojawia się także rozpuszczalna, bardzo nietrwała hemaglutynina o swoistości typowej dla krwinek kurzych, mysich, owczych, bydłych oraz ludzkich (7, 23).

W podsumowaniu przedstawionych danych na temat właściwości przedstawicieli rodziny *Chlamydiaceae* należy stwierdzić, że zagadnienie to, mimo osiągniętego postępu, wymaga dalszych badań. Uzgodnić należy wspomniane niejasności dotyczące klasyfikacji i związanej z nią taksonomii tych drobnoustrojów. Natomiast z lekarskiego punktu widzenia nadal niezbędne jest uwiarygodnienie wyników diagnostyki laboratoryjnej chlamydzioz. Chodzi o jasność – czy ma się do czynienia z procesem chorobowym, wywołanym przez określone gatunki lub szczepy patogennych chlamydii, czy też wyłącznie z fałszywie dodatnimi wynikami badań serologicznych.

Piśmiennictwo

1. Amann R., Springer N., Schönhuber W., Ludwig W., Schmid E. N., Müller K. D., Michel R.: Obligate intracellular bacterial parasites of acanthamoebae related to *Chlamydia* spp. Appl. Environ. Microbiol. 1997, 63, 115-121.
2. An Q., Olive D. M.: Molecular cloning and nucleic acid sequencing of *Chlamydia trachomatis* 16S rRNA genes from patient samples lacking the cryptic plasmid. Mol. Cell. Probes 1994, 8, 429-435.
3. Anderson I. E., Baxter S. L., Dunbar S., Rae A. G., Philips H. L., Clarkson M. J., Herring A. J.: Analyses of the genomes of chlamydial isolates from ruminants and pigs support the adoption of the new species *Chlamydia pecorum*. Int. J. Syst. Bacteriol. 1996, 46, 245-251.
4. Anon.: Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines, Office International des Epizooties, Paris 2000.
5. Baehr W., Zhang Y. X., Joseph T., Su H., Nano F. E., Everett K. D., Caldwell H. D.: Mapping antigenic domains expressed by *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein genes. Proc. Natl. Acad. Sci. 1998, 85, 4000-4004.
6. Bedson S. P., Bland J. O.: Morphological study of the psittacosis virus with a description of the developmental cycle. Brit. J. Exp. Path. 1932, 71, 461-468.
7. Brown W. J., Rockey D. D.: Identification of an antigen localized to an apparent septum within dividing chlamydiae. Infect. Immun. 2000, 68, 708-715.
8. Brunham R. C., Peeling R. W.: *Chlamydia trachomatis* antigens: role in immunity and pathogenesis. Infect. Agents Dis. 1994, 3, 218-233.
9. Campbell L. A., Kou C. C., Grayston J. T.: Characterization of the new *Chlamydia* agent, Twar, as a unique organism by restriction endonuclease analysis and DNA-DNA hybridization. J. Clin. Microbiol. 1987, 25, 191-196.
10. Carter M. W., Al-Mahdawi S. A. H., Giles I. G., Treharne J. D., Ward M. E., Clarke I. N.: Nucleotide sequence and taxonomic value of the major outer membrane protein gene of *Chlamydia*. J. Gen. Microbiol. 1991, 137, 465-475.
11. Chantal J., Bessiere M. H., Le Guennou B., Magnaval J. F., Dorchie P.: Serologic screening of certain zoonoses in the abattoir personnel in Djibouti. Bull. Soc. Pathol. Exot. 1996, 89, 353-357.
12. Creclun J. L., McCullough S. J.: Evaluation of strain-specific primer sequences from an abortifacient strain of ovine *Chlamydophila abortus* (*Chlamydia psittaci*) for the detection of EAE by PCR. FEMS Microbiol. Lett. 2000, 190, 103-108.
13. Deptula W., Szenfeld J.: *Chlamydia* i chlamydziozy u ludzi i zwierząt – znaczenie i rozpoznawanie. PTNW, Gorzów Wlkp. 25. 02. 1986, s.3-13.
14. Entrican G., Buxton D., Longbottom D.: Chlamydial infection in sheep: immune control versus fetal pathology. J. R. Soc. Med. 2001, 94, 273-277.
15. Everett K. D. E., Bush R. M., Anderson A. A.: Emended description of the order Chlamydiales, proposal of Parachlamydiaceae fam. nov. and Simkaniaceae fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family Chlamydiaceae, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. Int. J. Syst. Bacteriol. 1999, 49, 415-440.
16. Everett K. D. E., Hornung L. J., Andersen A. A.: Rapid detection of the Chlamydiaceae and other families in the order Chlamydiales: three PCR test. Int. J. Syst. Bacteriol. 1999, 37, 575-580.
17. Fritsche T. S., Horn M., Wagner M., Herwig R. P., Schleifer K. H., Gautom R. K.: Phylogenetic diversity among geographically dispersed Chlamydiales endosymbionts recovered from clinical and environmental isolates of *Acanthamoeba* spp. Appl. Environ. Microbiol. 2000, 66, 2613-2619.
18. Fu F., Baumann M., Kosma P., Brade L., Brade H.: A synthetic glycoconjugate representing the genus-specific epitope of chlamydial lipopolysaccharide exhibits the same specificity as its natural counterpart. Infect. Immun. 1992, 60, 1314-1321.
19. Gupta R. S.: Protein phylogenies and signature sequences: A reappraisal of evolutionary relationships among archaeobacteria, eubacteria, and eukaryotes. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 1998, 62, 1435-1491.
20. Gupta R. S.: The natural evolutionary relationships among prokaryotes. Crit. Rev. Microbiol. 2000, 26, 111-131.
21. Herring A. J.: Typing *Chlamydia psittaci* – a review of methods and recent findings. Br. Vet. J. 1993, 149, 455-459.
22. Herrmann B., Ruhnman R., Bergström S., Bonnedahl J., Olsen B.: *Chlamydophila abortus* in a Brown Skua (*Catharacta antarctica lonnbergi*) from a Subantarctic Island. Appl. Environ. Microbiol. 2000, 66, 3654-3656.
23. Johnson F. W. A., Clarkson M. J., Spencer W. N.: Direct isolation of the agent of enzootic abortion of ewes (*Chlamydia psittaci*) in cell cultures. Vet. Rec. 1988, 113, 413-414.
24. Johnson F. W. A.: Chlamydiae. Br. Vet. J. 1983, 139, 93-101.
25. Johnson W. B., Chair A. C. V. P. M.: Compendium of measures to control *Chlamydia psittaci* infection among humans (Psittacosis) and pet birds (Avian Chlamydiae). Morb. Mortal. Wkly Rep. 2000, 49, 1-17.
26. Peeling R. W., Brunham R. C.: Chlamydiae as pathogens: new species and new issues. Emerg. Infect. Dis. 1996, 2, 307-319.
27. Persson K., Haidl S.: Evaluation of a commercial test for antibodies to the chlamydial lipopolysaccharide (Medac) for serodiagnosis of acute infections by *Chlamydia pneumoniae* (Twar) and *Chlamydia psittaci*. Act. Pathol. Microbiol. Immunol. Scan. 2000, 108, 131-138.
28. Petterson B., Andersson A., Leitner T., Olsvik O., Uhlen M., Storey C., Black C. M.: Evolutionary relationships among members of the genus *Chlamydia* based on 16S ribosomal DNA analysis. J. Bacteriol. 1997, 179, 4195-4205.
29. Rodolakis A., Sallinas J., Papp J.: Recent advances on ovine chlamydial abortion. Vet. Res. 1998, 29, 275-288.
30. Sachse K., Gallini P.: Molekularbiologische Nachweismethoden ausgewählter Zoonoseerreger. Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin – BGVV Heft 2000, 2, 29-41.
31. Salti-Montesanto V., Tsoli E., Papavassiliou P., Psarrou E., Markey B. K., Jones G. E., Vretou E.: Diagnosis of ovine enzootic abortion, using a competitive Elisa based on monoclonal antibodies against variable segments 1 and 2 of the major outer membrane protein of *Chlamydia psittaci* serotype 1. Am. J. Vet. Res. 1997, 58, 228-235.
32. Stephens R. S.: Molecular genetics of *Chlamydia*. W: *Chlamydial Infections*. Cambridge University Press, Cambridge 1990, s.63-72.
33. Wojciechowska S., Frygin C.: Riketsje. PWRiL, Warszawa 1979, s.16-18.