

ZKUŠENOSTI S PŘÍMÝM PRŮKAZEM CHLAMYDIA TRACHOMATIS Z UROGENITÁLNÍCH VÝTĚRŮ A Z MOČI METODOU PCR

MUDr. Zuzana Medková

Laboratoře BIO-PLUS, spol. s r. o., Imunologické oddělení, Brno

V příspěvku jsou prezentovány zkušenosti s molekulárně-biologickou diagnostikou *Chlamydia trachomatis* z uretrálních a cervikálních výtěrů a moči metodou polymerázové řetězové reakce (PCR, Cobas Amplicor). Práce poukazuje na nutnost zohlednění možné přítomnosti inhibitorů testu ve vyšetřovaném vzorku, podává přehled o zjištěné frekvenci inhibicí v obou druzích klinického materiálu a variantu jejich eliminace skladováním preparovaných vzorků. Uvádí rovněž procentuální zastoupení pozitivních osob v souboru (vztahené k věku a diagnóze). Zjištěné údaje jsou v souladu s mezinárodně prezentovanými daty a potvrzují častý výskyt infekce *Chlamydia trachomatis* v našich podmínkách, zejména u mladých lidí obou pohlaví.

Úvod

Gramnegativní, intracelulárně patogenní bakterie *C. trachomatis* (sérotypy D – K), původce především očních a urogenitálních infekcí, patří v současné době mezi nejčastější etiologické agens sexuálně přenosných chorob. Urogenitální infekce způsobené tímto mikroorganizmem představují významný celosvětový epidemiologický, medicínský a společensko-ekonomický problém, který se nevyhnutelně ani vyspělým zemím s vysokým zdravotnickým standardem. Podle WHO vzniká každoročně přibližně 500 milionů nových případů sexuálně přenosných onemocnění, přičemž asi 90 milionů těchto infekcí je připisováno *C. trachomatis* (22). Procento výskytu významně souvisí s věkem sledované populace a způsobem sexuálního chování (14, 16). Na základě těchto kritérií jsou nejvíce ohroženou skupinou mladí lidé obou pohlaví, podle různých autorů ve věkovém rozmezí 15–30 let (16). V této populační skupině hrozí vysoké riziko nerozpoznání nákazy, a tedy její další šíření či vznik chronických komplikací. Urogenitální chlamydiové infekce mohou probíhat pod obrazem tzv. postgonokokové uretritidy, kdy vzhledem k častému paralelnímu výskytu *C. trachomatis* a *Neisseria gonorrhoeae* u téhož pacienta klinické obtíže přetrvávají i po mikrobiologické identifikaci a eliminaci gonokoka penicilinovou léčbou (3). Přibližně dvě třetiny infekcí *C. trachomatis* u žen a podle recentních údajů přinejmenším stejné množství nákaz u mužů probíhá v úvodní akutní nekomplikované fázi bezpříznakově (6, 9, 13, 14, 16). Ke klinické manifestaci tak zpravidla dochází až v důsledku dlouhodobé alterace tkání a orgánů. Hlavním patogenetickým mechanismem je chronický, často vzestupný fibroproduktivní zánět mužského i ženského urogenitálu, vedoucí v případě protražovaného průběhu ke vzniku srůstů, deformací a neprůchodnosti vývodných močopohlavních cest s následným vznikem poruch reprodukce. U žen dochází k abortům, mimoděložnímu těhotenství, nástupu chronických pánevních bolestí (9, 12, 16, 18, 20); obě pohlaví jsou rovněž vystavena riziku systémového rozšíření infekce na serózní blány a další tkáně (tabulka 1) (2, 4, 5, 7, 9, 15). Infekce *C. trachomatis* je přenosná i vertikálně – z pozitivní matky na plod. Dochází k tomu zpravidla

při porodu, kdy je popisována až 65 % pravděpodobnost nákazy dítěte. Onemocnění se pak nejčastěji manifestuje jako akutní inkluzní konjunktivitida, méně jako atypická pneumonie či serózní mezotitis (9, 16). Byla popsána i disseminovaná infekce novorozence pod obrazem horečky, generalizované lymfadenopatie, makulopapulózní vyrážky a hydrocefalu, u dítěte zde byla prokázána přítomnost DNA *C. trachomatis* v moči a mozkomíšním moku (16). Práce z posledních let dokládají i možnost intrauterinní nákazy plodu s následným abortem, předčasným porodem či narozením dítěte s nízkou porodní hmotností (16). Přítomnost ženské endocervikální chlamydiové infekce je v současné době některými autory považována za jeden z nezávislých rizikových faktorů pro vznik karcinomu děložního hrdla ze skvamózních buněk. Asociace je sérotypově specifická s nejvyšší mírou rizika pro sérotyp G, riziko však vzrůstá i v případě výskytu protilátek proti většímu počtu sérotypů, a tedy vyššímu počtu infekcí prodělaných během života (1).

Chronické chlamydiové infekce a jejich následky jsou terapeuticky významně hůře zvládnutelné, včasná diagnóza akutní infekce je tedy jednou ze základních podmínek efektivní léčebné intervence (makrolidová a tetracyklinová antibiotika).

Preventibilita nákazy proto představuje jednu z nejdůležitějších oblastí výzkumu zaměřeného na *C. trachomatis*. Významná je prevence primární (zábrana přenosu agens na zdravou osobu) i sekundární (předcházení přechodu již vzniklé akutní infekce do chronicity). Výroba účinné široce použitelné očkovací látky zůstává problémem, jedinou možností efektivní prevence je v současné době cílené vyhledávání a léčba akutně infikovaných jedinců obou pohlaví. Vyhledávání těchto převážně asymptomatických infek-

Tabulka 1. Projevy infekce *Chlamydia trachomatis* v dospělosti – přehled

Muži	Ženy
uretritida	cervicitida
prostatitida	endometritida
epididymitida	salpingitida
proktitida	periadnexitida
perihepatitida:	uretritida
artritida:	perihepatitida:
Fitz–Hugh–Curtisův syndrom	Fitz–Hugh–Curtisův syndrom
Reiterův syndrom	infekční artritida
infekční artritida	reaktivní postinfekční artritida
reaktivní postinfekční artritida	(Reiterův syndrom zřídka)
konjunktivitida	konjunktivitida
	proktitida

cí spojené s testováním sexuálních partnerů nakažených osob a léčbou všech pozitivních případů v rámci screeningových programů dle řady prací významně redukovalo výskyt onemocnění (16). Předmětem diskuze zůstává přesné vymezení kritérií výběru populačních skupin, u nichž by byl screening ze zdravotního i ekonomického hlediska nejprínosnější (10, 14, 21). Např. tým britských odborníků pověřený řešením této problematiky doporučil na základě rozsáhlé epidemiologické analýzy ke screeningu následující skupiny (14):

- Osoby trpící příznaky chlamydiové infekce
 - ženy se zánětlivým pánevním onemocněním
 - muži s nespecifickou uretritidou
 - kojenci se zánětem spojivek a jejich rodiče
 - pacienti s STD (sexually transmitted diseases)
 - ženy před umělým ukončením těhotenství
 - sexuální partneři infikovaných osob.
- Asymptomatické osoby
 - asymptomatické sexuálně aktivní ženy do 25 let (zejména adolescentní)
 - asymptomatické ženy nad 25 let věku mající nového sexuálního partnera či dva a více partnerů za rok
 - všechny pozitivní případy by měly být předány do ambulancí genitourinární medicíny za účelem dohledání a léčby asymptomatických případů u mužů.

Významná promořenost populace infekcí *C. trachomatis* byla opakovaně prokázána již dříve prostřednictvím klasických detekčních postupů, donedávna považovaných za zlatý diagnostický standard (přímý mikroskopický průkaz *C. trachomatis* po tkáňové kultivaci s následným klasickým barvením či imunofluorescenčním značením). Vysoké nároky chlamydií na transportní a kultivační podmínky však omezují senzitivitu těchto testů na 60–80%. Citlivost alternativních diagnostických metod (detekce chlamydiových antigenů, průkaz specifického neamplifikovaného úseku nukleové kyseliny) se rovněž pohybuje v rozmezí 50–80%. Teprve následně vyvinuté a do běžné praxe aplikované molekulárně-biologické amplifikační testy se senzitivitou 95–98% upozornily na alarmující závažnost situace. V důsledku vysoké diagnostické výtěžnosti (specifická, senzitivita, standardizace) jsou nyní tyto metody v mezinárodním měřítku jednoznačně preferovány (16). U nás jsou nejužívanější polymerázová řetězová reakce (PCR; manuální systém AmpliCobas CT/NG nebo poloautomatizovaný systém Cobas AmpliCobas CT/NG,

Roche) a ligázová řetězová reakce (LCR; Abbot LCx CT/NG). Vysoká senzitivita obou metod umožňuje testovat i moč, výhodou PCR systémů Roche je detekce případné inhibice průběhu testu. Neodhalení tohoto problému s sebou nese riziko chybné interpretace výsledku vyšetření ve smyslu nesprávné negativity. Mezi nejčastější inhibitory amplifikace patří škrobový pudr a talek (rukavice), hem (vzorky s příměsí krve), heparin, lidský choriongonadotropin (těhotné), krystaly, nitrity, fosfáty a další látky. Riziko vzniku inhibice závisí na konkrétní metodě, typu inhibitoru, jeho koncentraci ve vzorku etc. Procento inhibic v rámci PCR a LCR se podle různých autorů pohybuje mezi 1–5%, v případě detekce inhibice je možno ji některými postupy eliminovat – filtrace, skladování v lednici, ředění, zamražení vzorku obsahujícího inhibitory (8, 11, 17, 19).

Vlastní práce

Naše laboratoř užívá metodu PCR již tři roky (v posledních dvou letech poloautomatický systém Cobas AmpliCobas; fy Roche). Prezentovaná práce přináší přehled výsledků a zkušeností získaných během jednoho roku testování (období červen 2000 – červen 2001).

V souboru bylo 372 žen (věk: rozmezí 15–82 let, průměr 35 let; 250 močí, 122 výtěrů), 377 mužů (věk: rozmezí 14–87 let, průměr 39 let; 319 močí, 58 výtěrů), vzorky byly zaslány do laboratoře ze spádových gynekologických a urologických pracovišť.

Cíl:

- Prezentovat zkušenosti
 - a) s výskytem inhibitorů PCR
 - b) s možností jejich eliminace skladováním preparovaného vzorku.
- Na základě procentuálního výskytu pozitivních vzorků v definovaných věkových skupinách dále rozdělených dle pohlaví a druhu testovaného klinického materiálu stanovit vhodný věk, klinický materiál a diagnózu pro efektivní testování.

Metodika:

1. Provedení testu dle návodu výrobce; preparované vzorky byly amplifikovány a testovány a) za 24 hodin b) za 48 hodin po preparaci a skladování při teplotě 2–8 °C. Nehodnotitelné (inhibované) vzorky byly v obou případech retestovány za 7 dní po první amplifikaci. Pro oba druhy klinického materiálu bylo zjištěno procento inhibic v rámci postupů a) i b) a jeho další změny po retestování za 7 dní.

2. Získaná data byla pro obě pohlaví rozdělena do pětiletých věkových intervalů, v nichž bylo zjištěno procentuál-

Tabulka 2. Výskyt inhibice PCR v urogenitálních výtěrech a močích ve vztahu k pohlaví a intervalu mezi preparací vzorku a amplifikací

		Amplifikace za 24 hodin				Retestováno za 7 dní				Amplifikace za 48 hodin				Retestováno za 7 dní				
		inhibice				+	-	/	G+	inhibice				+	-	/	G+	
ženy	M 118	1 (0,9%)					1			M 132	1 (0,8%)					1		
	V 68	10 (14,7%)					5	5		V 54	3 (5,5%)					3		
muži	M 164	3 (1,8%)					1	1	1	M 155	4 (2,6%)							4
	V 35	12 (34,3%)					1	7	3	1	V 23	3 (13%)					1	2

M moč, + pozitivní *C. trachomatis*, / inhibice, V výtěr, – negativní *C. trachomatis*, G+ pozitivní *N. gonorrhoeae*

ni zastoupení pozitivních vzorků zvlášť pro muže a ženy; u obou pohlaví zvlášť pro moče a výtěry.

Výsledky:

1. Procento inhibicí PCR pro 24 hodinový interval preprace-amplifikace bylo pro obě pohlaví řádově vyšší ve výtěrech oproti močím; k jeho snížení došlo po dalším sedmidenním skladování preparovaného vzorku v rámci obou pohlaví i druhu materiálu, ale podstatně více ve výtěrech. Pro 48hodinový interval preprace-amplifikace byl oproti prvnímu způsobu testování počet inhibicí u moči nepatrně nižší pro obě pohlaví, u výtěrů pak ve srovnání s 24hodinovým intervalem poklesl téměř o třetinu a při retestování byla inhibice zcela eliminována v případě vzorku ženské moči a mužských výtěrů (tabulka 2).

2. Nejvyšší procento pozitivních vzorků bylo detekováno ve věkovém rozmezí 15–30 let, a to pro obě pohlaví (tabulka 3). Zastoupení diagnóz v rámci celého souboru ilu-

struje graf 1. Nejfrekventovanějšími diagnózami v rámci pozitivních vzorků byly u mužů záněty vývodných cest močopohlavních včetně akutní prostatitis, u žen záněty děložního hrdla, subchronická a chronická vaginitis; u obou pohlaví to byly neurčené STD a akutní cystitis. Pozitivní vzorky se vyskytly i u 11 % zdravých těhotných (n=19), a ve dvojnásobné míře (20 %) u těhotných s anamnézou neplodnosti (n=5) (tabulka 4).

Závěr

Zjištěná data potvrzují vysoký výskyt infekce *C. trachomatis* i v našich podmínkách. Rizikovou věkovou skupinu představují muži i ženy s urogenitálními obtížemi ve věku 15–30 let. Zastoupení asymptomatických infekcí nebylo možno v rámci souboru hodnotit (na základě mezinárodních údajů i námi prokazaného vysokého procenta pozitivity u osob s klinickou symptomatologií však lze jejich čas-

Tabulka 3. Procento pozitivity *C.trachomatis* dle věkových skupin ve vztahu k pohlaví a druhu klinického materiálu (věkový interval 15 – 70 let; skupiny po 5 letech)

věková skupina	n	Muži celkem			n	+	V	n	ženy celkem			n	+	V
		M	V						M	V				
< 15	1	1												
15 – 19	12	8	4	2	1 (13%)	1 (25%)	13	8	5	2	2 (25%)			
20 – 24	49	38	11	9	6 (16%)	3 (27%)	82	49	33	5	3 (6%)	2 (6%)		
25 – 29	57	51	6	9	8 (16%)	1 (17%)	76	37	39	6	3 (8%)	3 (8%)		
30 – 34	44	38	6	3	3 (8%)		44	27	17	3	2 (7%)	1 (6%)		
35 – 39	39	28	11	1		1 (9%)	35	23	12					
40 – 44	47	39	8	1	1 (3%)		30	22	8	1	1 (5%)			
45 – 49	33	29	4	1		1 (25%)	35	30	5	1			1 (20%)	
50 – 54	36	33	3				19	19		1	1 (5%)			
55 – 59	17	14	3				10	10						
60 – 64	11	11					10	8	2					
65 – 69	13	11	2				7	6	1					
≥ 70	18	18					11	11						
total	377	319	58	26	19 (6%)	7 (12%)	372	250	122	19	12 (5%)	7 (6%)		

Tabulka 4. Přehled diagnóz u pozitivních osob

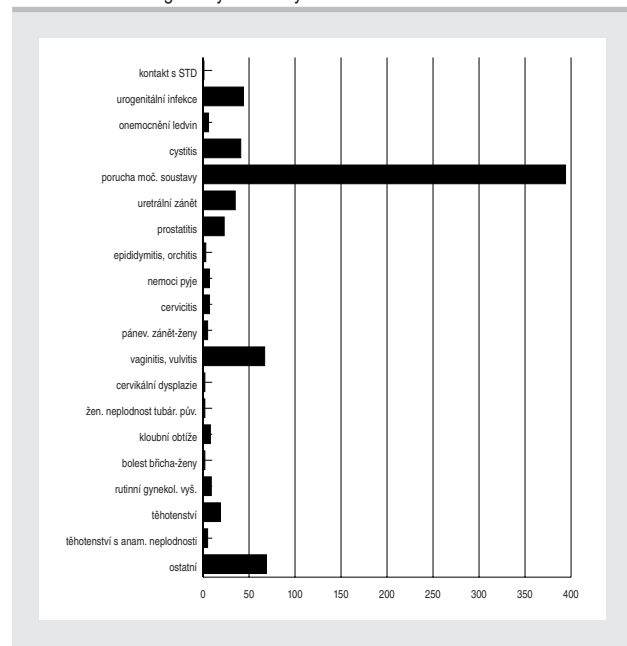
diagnóza	Celkem vyšetřeno	Pozitivní					
		Muži			Ženy		
		M	V	total	M	V	total
Gonokoková infekce,NS	3		1	1 (33%)			
Neurčená STD	10	1	1	2 (20%)		1	1 (10%)
Chlamydiová infekce, NS	1		1	1(100%)			
Jiné a neurčené infekční onemocnění	11	2		2 (18%)			
Akutní cystitis	55	4		4 (7%)	4		4 (7%)
Absces urethry	7	1	1	2 (29%)			
Nespecifická urethritis	11	2	1	3 (27%)			
Uretrální syndrom	11	1	1	2 (18%)			
Inf. moč.soustavy neurč.lokalizace	46	1		1 (2%)			
Porucha močové soustavy,NS	344	6	1	7 (2%)	5		5 (1%)
Akutní prostatitis	13	1		1 (8%)			
Zánětlivá onemocnění dělož. hrdla	7					1	1 (14%)
Vaginitis akutní	29					1	1 (3%)
Vaginitis subchronická a chronická	33				1		23 (9%)
Kontakt s STD	1				1		1(100%)
Dohled nad normální graviditou	19					2	2 (11%)
Dohl.nad graviditou s anam.neplodnosti	5				1		1 (20%)

tý výskyt předpokládat). Nelze podcenit ani vyšetřování těhotných žen a sexuálních kontaktů osob trpících STD. Testování metodou PCR (Cobas AmpliCor) představuje optimální způsob detekce infekce; u mužů je z důvodu častější přítomnosti inhibitorů ve výtěrech výhodnější testovat moč. U výtěrů lze výskyt inhibitorů testu snížit především správným postupem při odběru; v případě jejich přítomnosti v odebraném materiálu počet inhibicí skladováním při teplotě 2–8 °C klesá.

Literatura

1. Anttila T, Saikku P, Koskela P, et al. Serotypes of *Chlamydia trachomatis* and Risk for Development of Cervical Squamous Cell Carcinoma. *JAMA* 2001; 285: 47–51.
2. Bas S, Griffais R, Kvien TK, et al. Amplification of plasmid and chromosome chlamydia DNA in synovial fluid of patients with reactive arthritis and undifferentiated seronegative oligoarthritis. *Arthritis&Rheumatism* 1995; 38: 1005–1013.
3. Bednář M, Fraňková V, Schindler J, et al. *Lékařská mikrobiologie*. Praha, Marvil 1996.
4. Hopkinson N. Sexually-acquired reactive arthritis. *Hosp Med* 2001; 62 (2): 83–85.
5. Kohler J, Jendro MC. Bedeutung der persistenz von *Chlamydia trachomatis* im Gelenk für die Pathogenese der Chlamydien-induzierten Arthritis unter Berücksichtigung der therapeutischen Implikationen. *Akt Rheumatol* 1997; 22: 170–175.
6. Korych B. Chlamydie a jimi vyvolané infekce. *Remedia-klin Mikrobiol* 1998; 2 (3): 72–75.
7. Lammes FB. Diagnostic image(7). FitzHugh-Curtis syndrome due to *Chlamydia trachomatis* infection. *Ned Tijdschr Geneesk* 2000; 144 (42): 2010.
8. Mahony J, Chong S, Jang D, et al. Urine Specimens from Pregnant and Non-pregnant Women Inhibitory to Amplification of *Chlamydia trachomatis* Nucleic Acid by PCR, LCR, and TMA: Identification of Urinary Substances Associated with Inhibition and Removal of Inhibitory Activity. *J Clin Microbiol* 1998; 36 (11): 3122–3126.
9. Mandell GE, Douglas P, Bennett JE, et al. *Principles and Practice of Infection Diseases*. Churchill, Livingstone 1995.
10. Mardh PA, Novikova N. *Chlamydia trachomatis* infections-a major concern for reproductive health. Where do we stand regarding epidemiology, pathogenesis, diagnosis and therapy. *Eur J Contracept Reprod Health Care* 2001; 6 (2): 115–126.
11. Notomi T, Ikeda Y, Okadome A, et al. The inhibitory effect of phosphate on the LCR for detecting *Chlamydia trachomatis*. *J Clin Pathol* 1998; 51 (4): 306–308.
12. Ostaszewska I, Zdrodowska-Stefanow B, Darewicz B, et al. Role of *Chlamydia trachomatis* in epididymitis. Part II: Clinical diagnosis. *Med Sci Monit* 2000; 6(6): 1119–1121.
13. Peeling Rosanna W, Brunham RC. *Chlamydiae* as pathogens. *Emerg Infect Dis* 1996; 2: 307–319.
14. Pimenta J, Catchpole M, Gray M, et al. Screening for genital chlamydial infection. *BMJ* 2000; 321: 629–631.

Graf 1. Přehled diagnóz vyšetřovaných osob



15. Pospíšil L. Chlamydie – stále nová překvapení. *Časopis lékařů českých* 1999; 138 (15): 451–455.
16. Proceedings Fourth Meeting of The European Society for Chlamydia Research. Helsinki: Universitas Helsinkiensis 2000.
17. Rar VA, Maksimova TG, Morozova OV, et al. The use of internal controls of different lengths in the detection *Chlamydia trachomatis* DNA by the PCR method. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol* 1999; 4: 78–81.
18. Řezáčová J, Mašata J, Sodja I. *Chlamydia trachomatis* – riziko ohrožení reprodukční schopnosti žen. *Časopis lékařů českých* 1998; 137 (20): 619–623.
19. Sary A, Tomazic-Allen S, Choueiri B, et al. Comparison of DNA amplification methods for the detection of *Chlamydia trachomatis* in first-void urine from asymptomatic military recruits. *Sex Transm Dis* 1996; 23 (2): 97–102.
20. Šulová A, Strmisková J, Pilka L, Věžník Z, Pospíšil L. Přímý a nepřímý průkaz chlamydií u neplodných manželských párů zařazených do programu asistované reprodukce. *Čes Gynek* 1997; 62 (3): 134–137.
21. Teran S, Walsh C, Irwin KL. *Chlamydia trachomatis* infection in women: bad news, good news, and next steps in prevention. *J Am Med Womens Assoc* 2001; 56 (3): 100–104.
22. World Health Organization (WHO): Global prevalence and incidence of selected curable sexually transmitted diseases: overview and estimates. Geneva: WHO, 1996.