

Molekularna dijagnostika urogenitalnih infekcija uzrokovanih bakterijom *Chlamydia trachomatis* s područja Slavonije i Baranje

Bošnjak N, Bošnjak Z

Zavod za javno zdravstvo Osječko-baranjske županije

Sažetak

U Službi za mikrobiologiju Zavoda za javno zdravstvo Osječko-baranjske županije je ukupno prikupljeno i mikrobiološki obrađeno 925 uzoraka na prisutnost bakterije *Chlamydia trachomatis* (CT) obrađenih in vitro COBAS TaqMan CT testom za dijagnostiku urogenitalnih infekcija na COBAS TaqMan 48 uređaju. Obrađeno je 159 (17.2%) uzorka mokraćne, 458 (49.5%) obriska vrata maternice i 344 (37.3%) obriska mokraćovoda. Otkrivene su 23 (2.5%) urogenitalne infekcije uzrokovane CT što je dvostruko više od broja pozitivnih uzoraka (1.3 %) otkrivenih korištenjem imunofluorescentne dijagnostike. Obzirom na godišnji ulaz od 3.000 uzoraka za testiranje na CT, molekularna dijagnostika ima veliku prednost u otkrivanju asimptomatskih i simptomatskih infekcija u odnosu na imunofluorescentnu dijagnostiku.

Ključne riječi: *Chlamydia trachomatis*, CT, urogenitalne infekcije, molekularna dijagnostika

Uvod

Chlamydia trachomatis (CT) je obligatna unutarstanična Gram-negativna bakterija i jedna od vodećih uzročnika spolno prenosivih bolesti. Urogenitalne infekcije uzrokuju serovari: D, D/a, E, F, G, Ga, H, I/Ia, J i K. Moguće infekcije u žena su: uretritis, cervicitis, endometritis, salpingitis i perihepatitis. Salpingitis te posljedično stvaranje ožiljaka na jajovodima može rezultirati neplodnošću i vanmaterničnom trudnoćom. Moguće infekcije u muškaraca su: negonokokni uretritis, epididimitis i prostatitis. Osim navedenog, CT može u oba spola inducirati Reiterov sindrom, proktitis i konjuktivitis. Prolaskom kroz porođajni kanal, infekcija novorođenčeta CT može rezultirati razvojem pneumonije, konjuktivitisa iako su opisane i vaginalne, faringealne i enterične infekcije.^{1,2} Imunohistokemijskim metodama uz pomoć poliklonskih i monoklonskih protutijela na glavni protein vanjske ovojnice (MOMP engl., major outer-membrane protein) određeno je 19 serotipova CT: A, B/Ba, C, D, D/a, E, F, G, Ga, H, I/Ia, J, K, K, L1, L2, L2a i L3.³

Infekcije CT su asimptomatske u 50% muškaraca i 80% žena, te se stvarna učestalost infekcije ne može precizno odrediti.⁴

U prevenciji i kontroli klamidijskih infekcija vrlo je značajna brza i pouzdana dijagnostika, te djelotvorna terapija koja dovodi do eradikacije uzročnika. Metode potvrde urogenitalnih infekcija uzrokovanih CT su: izolacija uzročnika iz stanične kulture koja se smatra "zlatnim standardom", te metode dokazivanja klamidijskih antigena i nukleinskih kiselina imunološkim odnosno hibridizacijskim tehnikama. Danas se u svakodnevnoj rutinskoj obradi kliničkih uzoraka najčešće koriste metode izravne imunofluorescencije (DIF.,-direct immunofluorescence) i metode molekularne mikrobiologije.

Do 2007.g u ZZJZ Osječko-baranjske županije dijagnostika je bila utemeljena na izravnom dokazivanju CT imunofluorescentnom metodom. Uzorci su obrisci vrata maternice, vagine i mokraćovoda u žena, a kod muškaraca obrisci mokraćovoda. Kriterij za pozitivan nalaz u uzorcima iz urogenitalnog trakta je nalaz 10 i/ili više elementarnih tjelešaca u nanesenom uzorku. Negativan nalaz baziran je na odsustvu elementarnih tjelešaca u uzorku uz prisutnost 10-20 cilindričnih i pločastih epitelnih stanica.⁵ Metoda izravne imunofluorescencije je pogodna za dijagnostiku CT infekcije u akutnom stadiju te za procjenu kvalitete ispitanog uzorka temeljem mikroskopskog pregleda preparata i određivanja prisutnosti epitelnih stanica. Međutim, nedostatak metode je u subjektivnosti procjene pozitivnog uzorka jer isključivo ovisi o mikroskopičaru te o kvaliteti uzorkovanja. Osjetljivost navedene metode je od 50-80%.⁵ Navedenoj dijagnostici se u travnju 2007. godine pridružuje molekularna dijagnostika klamidijske infekcije nabavom instrumenta COBAS TaqMan 48, proizvođača Roche, Mannheim, Njemačka. Instrument je potpuno automatizirani sustav za umnažanje i detekciju nukleinskih kiselina koji koristi tehnologiju 5' → 3' egzozukleaznu aktivnost Taq-polimeraze tzv. fluorogenični 5' nukleazni test s certificiranim software-om na računalu s operativnim sustavom Microsoft Windows XP i ostalim certifikatima: CE, UL i CSA. COBAS TaqMan 48

instrument je isključivo namijenjen za in vitro dijagnostiku infektivnih bolesti, uključujući i urogenitalne CT infekcije. Uzorci ispitivanja su mokraća, obrisci mokraćovoda i vrata maternice.⁶ COBAS TaqMan CT test je prvi molekularni test za otkrivanje CT infekcija odobren od Američke agencije za hranu i lijekove (engl., US FDA–United States Food and Drug Administration). Osjetljivost COBAS TaqMan CT testa za određivanje CT je 98%, dok je specifičnost 100%.⁶

Cilj stručnog rada je dokazati prednosti molekularne dijagnostike asimptomatskih i simptomatskih CT infekcija u svakodnevnoj kliničkoj praksi.

Materijali i metoda

U Službi za mikrobiologiju Zavoda za javno zdravstvo Osječko-baranjske županije je ukupno prikupljeno i obrađeno 925 uzoraka na CT primjenom in vitro COBAS TaqMan CT testa za dijagnostiku urogenitalnih infekcija uzrokovanih bakterijom CT primjenom COBAS TaqMan 48 uređaja. Obrađeno je 159 (17.2%) uzorka mokraće, 458 (49.5%) obriska vrata maternice i 344 (37.3%) obriska mokraćovoda. Uzorci su sakupljeni i skladišteni prema preporuci proizvođača testa COBAS TaqMan CT testa.

COBAS TaqMan CT testom i pripadajućim testom za izolaciju nukleinskih kiselina svi su prikupljeni i pravilno skladišteni uzorci mokraće i obrisaka testirani na prisutnost CT pomoću automatiziranog sustava COBAS TaqMan 48 prema uputama proizvođača testa.⁶ Test za detekciju CT istog proizvođača umnaža specifičnim početnicama konzerviranu regiju kriptičkog plazmida prisutnog u svim bakterijskim serotipovima i time otkriva sve serotipove CT. Umnoženu regiju specifično određuju TaqMan hibridizacijske probe obilježene s dvije fluorescentne boje. To je ujedno i tehnologija u stvarnom vremenu (engl., real-time) lančane reakcije polimerazom (engl., PCR-polymerase chain reaction). Za praćenje se učinkovitosti umnažanja te za procjenu prisutnosti inhibitora PCR u ispitivanim uzorcima koristi unutrašnja kontrola što je neinfektivni rekombinantni DNA plazmid s istim vezujućim regijama za specifične početnice kao i ciljane regije kriptičkog plazmida CT. Za sprječavanje kontaminacije među uzorcima koristi se uracil-N-glikozilaza i deoksiuridin-trifosfat (dUTP). COBAS TaqMan CT test daje rezultate unutar 3 sata.⁶

Pozitivni uzorci se nakon ispitivanja alikvotiraju te skladište na temperaturi od - 80° C u ZZJZ Osijek.

Rezultati i diskusija

Od ukupno 925 uzoraka 23 (2.5%) je uzorka pozitivno na CT. Statistička obrada podataka 2007. godine pokazuje da je u Zavodu za javno zdravstvo Osječko-baranjske županije u Službi za mikrobiologiju obrađeno 50.143 urogenitalnih obrisaka. Od toga je 3.976 (7,9%) obrisaka analizirano metodom izravne imunofluorescence i pozitivno je 53 (1.3%) obrisaka. Komercijalno je dostupnim testom proizvođača BIORAD testirano 15.351 (30,6%) obrisaka na mikoplazme i 5686 (37%) obrisaka je bilo pozitivno. Na aerobnu i anaerobnu bakteriološku analizu je zaprimljeno 30.816 (61,5%) obrisaka od kojih je 8.281 (27%) bilo pozitivno.

Obzirom na mali broj pozitivnih uzoraka možemo reći da je prevalencija infekcija uzrokovanih CT na našem području niska. Od travnja 2007. do travnja 2008. godine na COBAS TaqMan 48 i COBAS TaqMan CT je ispitano 925 urogenitalnih kliničkih uzoraka i otkriveno 23 (2.5%) asimptomatske i simptomatske infekcije CT što je gotovo dvostruko više od infekcija CT dijagnosticiranih metodom izravne imunofluorescencije u 2007. godini (1,3%).

Obzirom na prosječni godišnji ulaz od 3.000 uzoraka za testiranje CT u Zavod za javno zdravstvo Osječko-baranjske županije, brza i osjetljiva molekularna dijagnostika ima veliku kliničku ulogu u otkrivanju većeg broja simptomatskih i asimptomatskih infekcija u odnosu na imunofluorescentnu dijagnostiku jer može otkriti prisutnost malog broja uzročnika u obrisku cerviksa ili u mokraći.

Literatura

1. Prescott LM, Harley JP i Klein DA. Poglavlje 21. The Bacteria: Gram-Negative Bacteria of General, Medical, or Industrial Importance. U: Prescott LM, Harley JP. Klein DA. Microbiology 2nd edition. WCB Melbourne, Australia 1993;443-4.
2. Mahony JB, Coombes BK i Chernesky MA. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, White O. Poglavlje 63. Chlamydia and Chlamydia. U: Mahony JB, Coombes BK i Chernesky MA. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, White O. Manual of Clinical Microbiology. ASM Press. Washington, DC 2002;991-8.
3. Hsu MC, Tsai PY, Chen KT, Li LH, Chiang CC, Tsai JJ, Ke LY, Chen HY, Li SH.. Genotyping of Chlamydia trachomatis from specimens in Taiwan. J. Clin. Microb. 2006;55:301-8.
4. Gaydos A C, Theodore M, Dalesio N, Wood BJ, Quinn T. Comparison of Three Nucleic Acid Amplification Tests for Detection of Chlamydia trachomatis in Urine Specimens. J. Clin.

- Microbiol. 2004;42(7):3041-5.
5. Bio-Rad Laboratories. Manual "Pathfinder Chlamydia trachomatis Direct Specimen". 2003;14-9.
- Roche Diagnostics.Manual "COBAS TaqMan CT Test".2007;16-7.

Kontakt

Dr. med. Nataša Bošnjak, specijalista mikrobiologije s parasitologijom
Franje Krežme 1, 31000 Osijek
Zavod za javno zdravstvo Osječko–baranjske županije
Telefon: 00385 31 225 766
Telefax: 00385 31 206870
E–mail: natasabo@net.hr