

Suvremena laboratorijska dijagnostika genitalnih klamidijskih infekcija – naša iskustva

(Modern Laboratory Diagnosis of Genital Chlamydia Infections – Our Experiences)

Tomislav Rukavina

Mikrobiološki odjel, Nastavni zavod za javno zdravstvo Primorsko-goranske županije, Krešimirova 52a, 51 000 Rijeka

Zavod za mikrobiologiju i parazitologiju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, Braće Branchetta 20, 51 000 Rijeka

Ključne riječi: Chlamydia trachomatis, genitalne infekcije, laboratorijska dijagnostika

Chlamydia trachomatis je obligatna intracelularna bakterija koja se smatra jednim od najznačajnijih uzročnika spolno prenosivih infekcija. Bakterijski serovari D – K najznačajniji su uzročnici negonokoknih uretritisa i epididimitisa u muškaraca, dok u žena uzrokuju cervicitis, urethritis, endometritis, salpingitis i perihepatitis (1,2). Posljedica salpingitisa može biti stvaranje tubalnih ožiljaka što u konačnici može rezultirati infertilitetom i ektopičnom trudnoćom. Pored navedenog klamidija može inducirati i Reiterov sindrom te proktitis i konjunktivitis i u muškaraca i u žena. Infekcija se tijekom poroda može prenijeti na novorođenče iz inficiranog porođajnog kanala te uzrokovati novorođenačku upalu pluća (3) kao i niz drugih infektivnih manifestacija.

Laboratorijska dijagnostika genitalnih klamidijskih infekcija primarno se temelji na izravnim metodama dokaza samog uzročnika. U ove metode ubrajamo kultivaciju koja se i danas smatra «zlatnim standardom» laboratorijske dijagnostike te metode dokaza klamidijskih antigena ili nukleinskih kiselina.

Najstarija metoda za dokaz klamidijskih antigena je metoda izravne imunofluorescence. U novije vrijeme sve je prisutnija dijagnostika temeljena na različitim modifikacijama izravnih imunoenzimskih postupaka. Spomenute su metode utemeljene na upotrebi specifičnih monoklonskih protutijela koja se vezuju za antigene na bakterijskoj stanici. Razlika između imunofluorescence i imunoenzimskih metoda je u načinu vizualizacije stvorenih kompleksa antigen-protutijelo. Kod imunofluorescentne metode rabi se obilježavanje fluorescentnom bojom, a kod imunoenzimskih obilježavanje enzimima čija se aktivnost vizualizira dodatkom adekvatnih supstrata. Kod izravne imunofluorescentne pretrage konačna dijagnostika se temelji na mikroskopiji pripremljenih preparata pod fluorescentnim mikroskopom. Ovakav način dijagnostike vremenski je prilično zahtjevan, zamoran, a rezultati su uveliko ovisni o subjektivnoj procjeni ispitivača što su osnovne zamjerke metodi. Imunoenzimске metode se pak očitavaju pomoću optičkih uređaja koji istovremeno mogu obrađivati veći broj uzoraka što olakšava i ubrzava rad u rutinskoj dijagnostici, a rezultati nisu podložni subjektivnim procjenama ispitivača .

Metode za dokaz nukleinskih kiselina možemo podijeliti u dvije kategorije. Prvu kategoriju čine metode hibridizacije, a drugu amplifikacije nukleinskih kiselina. Obje se skupine pretraga temelje na dokazu specifičnog slijeda nukleotida u sklopu genoma bakterije. Razlika među ovim pretragama je u tome što kod hibridizacije dokazujemo onu količinu genetskog materijala bakterije koja je prisutna u uzorku, dok kod amplifikacije umnažamo genetski materijal bakterije iz uzorka molekularnim metodama što olakšava detekciju u slučaju malog broja kopija genoma (bakterija) u uzorku.

Dijagnostika je genitalnih klamidijskih infekcija u Nastavnom zavodu za javno zdravstvo Primorsko-goranske županije dugi niz godina bila utemeljena na izravnom dokazu klamidija imunofluorescentnom metodom. Kako je broj uzoraka iz godine u godinu bio sve veći ovakav način dijagnostike je postajao sve manje prihvatljiv za rutinski rad u laboratoriju. Pored toga, zbog značaja preciznosti dijagnostičkog postupka, smatrali smo da je nužno smanjiti mogućnost utjecaja subjektivne interpretacije ispitivača na rezultat pretrage. Zbog toga smo se odlučili na uvođenje dodatne dijagnostičke metode kako bi se pouzdanost laboratorijskih nalaza povećala. Stoga smo tijekom 2004. godine uveli u dijagnostiku automatizirani sustav za detekciju klamidijskih antigena iz cervikalnih i uretralnih uzoraka (VIDAS Chlamydia; bioMérieux, Francuska). Sustav je utemeljen na imunoenzimskoj tehnici i omogućuje istovremenu obradu većeg broja uzoraka. Tijekom dvije i pol godine koliko je sustav uključen u dijagnostiku ukupno je obrađeno više od 5 700 cervikalnih i

uretralnih uzoraka. Uvođenje spomenute tehnike je prije svega rezultiralo pojednostavljenom organizacijom laboratorijskog rada. S druge strane, bitno je skraćeno i vrijeme potrebno za obradu pristiglih uzoraka i izdavanje nalaza. Međutim, najvažnije od svega, mišljenja smo da je povećana pouzdanost laboratorijskih nalaza. Naime, udio pozitivnih nalaza za cijelo promatrano razdoblje iznosi 2,85% od ukupno pregledanih uzoraka. U usporedbi s rezultatima iz ranijeg razdoblja, kada je korištena isključivo imunofluorescentna tehnika, ova je proporcija bitno smanjena. Međutim, prema našem iskustvu, i ova tehnika dijagnostike ima svojih nedostataka. Najveća zamjerka tehnici je ta da ne postoji adekvatna mogućnost procjene kvalitete uzorkovanog materijala za razliku od imunofluorescentne metode u kojoj se kvaliteta uzorka lako procjenjuje temeljem mikroskopskog pregleda preparata i određivanja prisustva epitelnih stanica u uzorku.

U želji da kontinuirano unaprjeđujemo dijagnostiku klamidijских tehnika tijekom 2006. godine u laboratorijsku dijagnostiku uveli smo i molekularnu metodu dijagnostike utemeljenu na lančanoj reakciji polimeraze (*Chlamydia trachomatis* 330/700 IC; Sacace Biotechnologies, Italija). Tijekom ove godine molekularnom metodom smo ukupno obradili 534 uzoraka cervikalnih i uretralnih obrisaka. Koristeći literaturne podatke organizaciju rada smo utemeljili na obradi «puliranih» uzoraka obrisaka cerviksa i uretre (4). Pri tome su pojedinačni uzorci grupirani u skupine od po pet uzoraka koji su istovremeno obrađivani. Analiza vremena potrebnog za svakodnevnu obradu pristiglih uzoraka, uvođenje molekularne tehnike pokazalo se po tom pitanju gotovo identično zahtjevima koje pred laboratorij postavlja imunoenzimski pretraga. Prema našoj procjeni, a i prema literaturnim podacima, najveći doprinos uvođenja molekularne tehnike je povećanje osjetljivosti pretrage, kao i vrlo visoka specifičnost iste. Naši preliminarni rezultati pokazali su da je udio pozitivnih nalaza među obrađenim uzorcima bio veći u usporedbi s imunoenzimski obrađenim uzorcima i to na razini od 3,74%. Iako je količina do sada obrađenih uzoraka još uvijek premala za egzaktnu usporedbu, mišljenja smo da je ovaj udio pozitiviteta mnogo bliži stvarnom broju uzoraka s pozitivnim nalazom klamidija. Prema našim dosadašnjim iskustvima jedini nedostatak molekularnom testiranju predstavlja prisustvo inhibicije u jednom dijelu analiziranih uzoraka što iziskuje ponavljanje pretrage, a katkad i potrebu za ponovnim uzorkovanjem.

Literatura:

1. Schachter J. Chlamydial infections. *N Engl J Med.* 1978; 298:428, 490, 540
2. Stamm WE, Koutsky LA, Benedetti JK, Jourden JL, Brunham RC, Holmes KK. *Chlamydia trachomatis* urethral infections in men. Prevalence, risk factors, and clinical manifestations. *Ann Intern Med.* 1984; 100:47-51
3. Beem MO, Saxon EM. Respiratory-tract colonization and a distinctive pneumonia syndrome in infants infected with *Chlamydia trachomatis*. *N Engl J Med.* 1977; 296:306-10
4. Morre SA, van Dijk R, Meijer CJ, van den Brule AJ, Kjaer SK, Munk C. Pooling Cervical Swabs for detection of *Chlamydia trachomatis* by PCR: Sensitivity, dilution, inhibition, and cost-saving aspects. *J Clin Microbiol.* 2001; 39:2375-6

Tomislav Rukavina, dr.med., izvanredni profesor, znanstveni savjetnik

Telefon: 051 358 777

Fax: 051 213 948

E-mail: tomir@medri.hr