

původní práce

PRŮKAZ *CHLAMYDIA TRACHOMATIS* V MOČI A MOČOVÉ TRUBICI

CHLAMYDIA TRACHOMATIS DETECTION BY PCR IN URINE AND URETHRAL SWAB

Michaela Matoušková¹,
Miroslav Hanuš¹, Vlasta Králová¹,
Eva Francisci-Procházková², Jan Řehák³

¹Urocentrum Praha

²Aliatros, laboratoř molekulárně biologických metod, Praha

³SC&C, s.r.o., Praha

Došlo: 20. 8. 2008

Přijato: 13. 10. 2008

Kontaktní adresa

Michaela Matoušková, MD

Urocentrum Praha

Karlovo náměstí 3, 120 00 Praha 2

e-mail: matouskova@urocentrum.cz

Souhrn

Matoušková M, Hanuš M, Králová V, Francisci-Procházková E, Řehák J. Průkaz *Chlamydia trachomatis* v moči a močové trubici

Cíl:

Cílem práce je porovnání validity a ekonomické relevance vyšetření PCR u vzorků moče a uretrálního sekretu.

Metody a výsledky:

Infekce vyvolané *Chlamydia trachomatis* mají v naší populaci vysokou prevalenci. Přesná data v České republice nejsou známa, protože onemocnění nepodléhá povinnému hlášení. Onemocnění má obvykle asymptomatický či oligosymptomatický průběh. Průkaz infekce je technicky i ekonomicky náročný. S citlivostí metody narůstá významně cena, kterou zdravotní pojiš-

ťovna za stanovení diagnózy hradí. K nejvhodnějším a nejcitlivějším metodikám patří amplifikační metody PCR a LCR. Kromě ceny je jejich použití limitováno i frekvenčním omezením.

Závěr:

Restrikce vyšetření významně zvyšuje pravděpodobnost opominutí správné diagnózy se závažnými zdravotními důsledky a dopadem na kvalitu života partnerů.

Klíčová slova:

Chlamydia trachomatis, metodiky průkazu, PCR detekce.

Summary

Matoušková M, Hanuš M, Králová V, Francisci-Procházková E, Řehák J. *Chlamydia trachomatis* detection by PCR in urine and urethral swab

Aim:

The aim of the present paper is a comparison between the validity and the economic relevance of the PCR examination in samples of urine and urethral secretion.

Methods and results:

Infections provoked by *Chlamydia trachomatis* have a high prevalence in our population. Precise data concerning the Czech Republic are not known because the disease is not obligatorily reportable. The disease usually has an asymptomatic or an oligosymptomatic course. The detection of the infection is technically as well as economically demanding. Along with more sensitive methods, there is a significant increase of cost covered by the insurance company for

determining the diagnosis. The PCR and LCR amplification approaches belong to the most convenient and most sensitive methodologies. Apart from the price, their application is also limited by a frequency restriction.

Conclusion:

Restriction of both examinations (urine and urethral swabs) leads to high probability of missing the correct diagnosis. So that negative impact on QL of patients and their health status can be expected.

Key words:

Chlamydia trachomatis, methodology of detection, PCR detection.

ÚVOD

Infekce vyvolané *Chlamydia trachomatis* ve světě přesahují 90 milionů případů ročně. Prevalenční data v České republice nejsou známa, protože onemocnění nepodléhá povinnému hlášení.

Onemocnění obvykle probíhá s minimem obtíží u obou pohlaví (1). Na urologická pracoviště přicházejí méně často pacienti s akutní chlamydiózou. Mnohem častější jsou prodloužené formy infekcí, na které nasedají bakteriální infekce (tab. 1, 2). Nemocní uvádějí typické

příznaky recidivujících infekcí dolních močových cest. Klinický obraz sdružené infekce dolních močových cest zahrnuje postižení jak močových cest, tak i rodidel. Chlamydiová infekce je prakticky ve 100 % etiologickým agens při vzniku tubární sterility. Nezřídka přicházejí nemocní z revmatologie s podezřením na Reiterův syndrom a pozitivním HLA B27. V těchto případech bývá průkaz *Chlamydia trachomatis* v urogenitální oblasti značně obtížný.

K detekci využíváme různě citlivé metody stanovení. K nejcitlivějším, ale i k nejdražším řadíme amplifikační metody – polymerázovou řetězovou reakcí (PCR) a vazbu na ligandy (LCR). Podle platného číselníku má pacient nárok na dvě vyšetření za půl roku bez ohledu na typ vyšetření.

Ke stanovení *Chlamydia trachomatis* vyšetřujeme materiál získaný abrazí (stěrem) z močové trubice a vzorek čerstvé moče. Nezbytný je dostatečný odstup, minimálně dvouhodinový, od předchozí mikce. Pokud je to technicky možné, je nejvhodnější vyšetření ranní močí. Součástí diagnostického postupu je kultura vyšetření uretrálního (u mužů) nebo vaginálního stěru a mikrobiologické vyšetření moče (obr. 1). U indikovaných pacientů doplňujeme stanovení STI (sexually transmitted infections) o vyšetření HPV (human papilloma virus), RRR k vyloučení lues a detekci HIV.

MATERIÁL A METODA

Ke stanovení *Chlamydia trachomatis* vyšetřujeme uretrální stěr a moč po předchozím, alespoň dvouhodinovém odstupu od předcházející mikce. K detekci *Chlamydia trachomatis* používáme metodiky PCR.

V letech 2006 a 2007 jsme vyšetřili 1381 vzorků u chlamydia naivních pacientů, nejčastěji v rámci detekce patogenní flóry u recidivujících infekcí močových cest a při vyšetření sexuálních partnerů. Obvyklý klinický nález u obou pohlaví byl oligo- či spíše asymptomatický. Pouze u žen s recidivujícími infekty se cyklicky při akutizaci obtíží klinický nález zhoršil při bakteriální kolonizaci dolních močových cest a při bakteriální vaginóze.

U všech nemocných je součástí diagnostiky STI mikrobiologické vyšetření moči, vaginálního sekretu u žen a uretrálního u mužů, dále vyšetření ureaplazmat (tab. 2). Podle klinických nálezů doplňujeme i vyšetření ke

Tab. 1. Klinické obrazy při infekci *Chlamydia trachomatis*

Chlamydia trachomatis – klinické nálezy	
ženy	• cervicitidy, salpingitidy, uretrální syndrom, endometritida • GEU, sterilita (fibroprodukcí) • vertikální přenos na plod
muži	• uretritidy, uretrální syndrom, konjunktivitidy
společné	• Reiterův syndrom (navíc často dermatitida) • Fitz-Hugh-Curtisův syndrom (perihepatitida s infiltrací kapsuly jater)

Tab. 2. Výskyt chlamydiových infekcí v souboru (zdroj dat Urocentrum Praha)

Výskyt chlamydiových infekcí	
chlamydie samostatně	9 %
chlamydie + „běžná“ uroinfekce	83 %
chlamydie + ureaplazmata	2 %
chlamydie + ureaplazmata + „běžný“ uropatogen	6 %



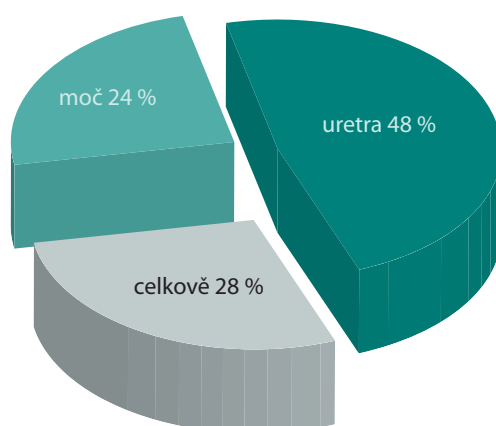
Obr. 1.
Odběrové sady ke stanovení STI

stanovení HPV infekce, kultivační vyšetření ejakulátu, prostatického sekretu a další. Doplnková vyšetření však dále prodražují cenu diagnostiky.

VÝSLEDKY

Z celkového počtu 1381 vzorků bylo 19 % pozitivních, tj. u 268 pacientů. Z nich bylo 123 žen a 145 mužů. Všichni nemocní byli bez příznaků nebo pouze s minimálními symptomy, upomínajícími recidivující infekce močových cest.

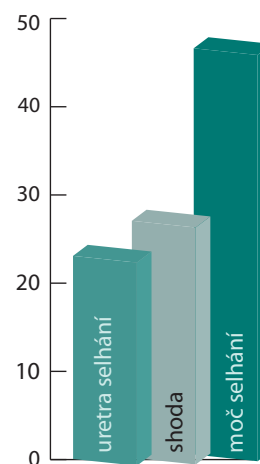
Graf 1. Výskyt *Chlamydia trachomatis* v uretrálním stěru, v moči a obou vzorcích



Pozitivní nález v močové trubici jsme zjistili u 75,8 % nemocných, pozitivní nález v moči jsme detekovali v pouze 52,4 %. Oproti očekávaným 40 % pozitivním nálezům při kombinaci obou typů vyšetření jsme prokázali chlamydiovou infekci u pouhých 28,2 % (tab. 3, graf 1) ($= 0,524 \times 0,758 \times 100$). Záchyt v uretře je signifikantně vyšší proti záchytu v moči ($p = 0,000$) (graf 2) při použití testu shodnosti dvou kategorií.

Srovnáním obou metod detekce, tedy uretrálního stěru a vyšetření vzorku moče, dojdeme k poměru selhání moč vs. uretra 2 : 1. V grafu 3 jsou zobrazeny pouze pozitivní nálezy v obou vyšetřovaných materiálech.

Graf 2. Shoda a selhání detekce *Chlamydia trachomatis*



Tab. 3. Současná pozitivní identifikace *Chlamydia trachomatis* v moči a uretrě

Současná pozitivní identifikace onemocnění				
		uretra		celkem
		negativní	pozitivní	
moč	negativní	–	47,6 %	47,6 %
	pozitivní	24,2 %	28,2 %	52,4 %
celkem		24,2 %	75,8 %	100 %

Senzitivita PCR vyšetření moče a uretrálního sekretu je rozdílná. V našem souboru dosahuje 76 % při vyšetření uretrálního sekretu (v literatuře 75–100 %) a 52 % při vyšetření moče, kde se literárně pohybujeme mezi 50 až 95 %. Mezi metodami je jen nízká ekvivalence, která dosahuje pouhých 28 %.

Pravděpodobný odhad dolní hranice selhání při současném použití obou metod ($= 0,476 \cdot 0,242$ v %) dosahuje 12 %.

DISKUSE

K průkazu infekce vyvolané *Chlamydia trachomatis* můžeme dojít několika postupy: kultivací patogenních intracelulárních bakterií, imunofluorescencí (IF), immunoesejí enzymu (EIA), přímou DNA hybridizací a polymerázovou řetězovou reakcí (PCR) amplifikací specifických cílových sekvencí DNA. Uvedené metodiky mají rozdílnou senzitivitu a specifitu vyšetření. Senzitivita kultivace a EIA se pohybuje mezi 80–90 %. PCR techniky mají senzitivitu minimálně stejnou, ale ve srovnání s kultivací spíše vyšší a významně vyšší opro-

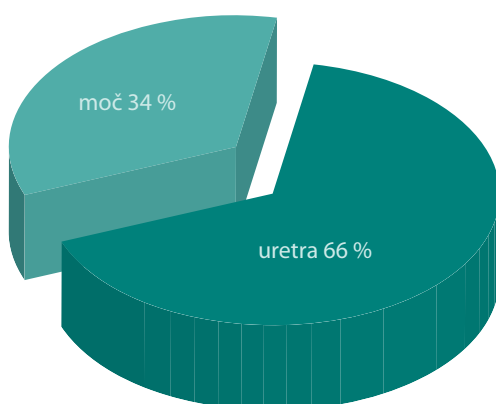
ti immunoesejím. Obě tyto techniky bývaly považovány za „zlatý standard“ v diagnostice chlamydiových infekcí.

Metodika PCR patří k nejcitlivějším metodám detekce patogenů, ale i například nádorových markerů. Pro detekci *Chlamydia trachomatis* mohou být použity k amplifikaci různé cílové sekvence DNA, včetně kryptogenních plazmidů, membránových proteinů (MOMP – major outer membrane protein) nebo úseky rRNA. Na použití primerů závisí, zda je polymerázová řetězová reakce založena na detekci plazmidů, nebo chromozomů. Metodiky amplifikace různých PCR esejí jsou v podstatě ekvivalentní. V našem souboru je využíván nested PCR Serovars s primery PCTM3 + SERO2A (2). Všechny techniky PCR jsou citlivější ve srovnání s kultivací tam, kde je nízká úroveň replikace v důsledku malého počtu mikroorganismů, při neutralizaci mikroorganismu sIgA a konečně při ztrátě viability způsobené nesprávným skladováním a transportem. Kultivační průkaz chlamydií je prováděn v České republice pouze primárkou E. Žampachovou v Českých Budějovicích a je tedy dostupný spíše regionálně.

Vyšetření prvního vzorku moče vede ve srovnání s vyšetřením materiálu, získaného stěry, k nejnižšímu zachytu chlamydií (3). Ke zlepšení detekce *Chlamydia trachomatis* z uretrálních či cervikálních stěrů s vyšší senzitivitou jsou i nadále ověřovány další upravené techniky PCR (4). Obdobně jsou také hledány cesty ke zlepšení detekce chlamydiové infekce z prvního vzorku moče (5).

Nejnoveji lze prokazovat jedním souborným testem PCR, tzv. mPCR (multiplePCR) více patogenů (6, 7). Technika umožňuje simultánní průkaz STI a uropatogenů, spolu s *Mycoplasma genitalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Corynebacterium* spp. a *Pseudomonas aeruginosa*. Lee (6) prokazuje jeden a více patogenů v 10–80 % vzorků získaných od pacientů s STD nebo chronickou prostatitidou. Senzitivita eseje umožňuje detekovat koncentraci patogenní DNA v rozmezí 0,018–1,899 pg/μl. Zřejmou výhodou je, i přes vyšší cenu, omezení počtu nepříjemných stěrů potřebných k průkazu patogenní flóry.

Pro screening pak budou vhodné testy, které současně detekují *Chlamydia pneumoniae* a *Chlamydia trachomatis* (8). Test dosahuje senzitivitu až 89 % a umožňuje vyšetření různého typu materiálu, ať již jde o urogenitální stěry, moč, periferní krev či bronchoalveolární laváž. Tato vyšetření využívají stanovení druhově specifických protilátek, tedy společných pro všech-

Graf 3. Pozitivní nálezy v moči a uretrálním stěru

ny chlamydie. V klinické praxi je pak nezbytné odlišit, a to především u vzorků z krve, o jaký druh chlamydiové infekce se jedná (laboratorně pomocí rodově specifických protilátek, tedy konkrétních pro určitý typ chlamydie).

ZÁVĚR

Naším cílem bylo porovnání validity vyšetření a ekonomické relevance. Šlo o zjištění, zda by omezení počtu vyšetření nebo jejich redukce na vyšetření moče, eventuálně v kombinaci s další levnější metodou, vedlo ke snížení nákladnosti stanovení diagnózy onemocnění. Pokud použijeme u chronických infekcí citlivou diagnostiku pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR), nemůžeme redukovat vyšetření na pouhou analýzu moči nebo pouze na vyšetření uretrálního sekretu. Pro zachování senzitivity nelze omezit počet vy-

šetření. Chyba metody pak při použití obou testů dosáhla v našem souboru 12%. Analýzou našeho souboru docházíme k závěru, že detekce chlamydií PCR metodou vzorků moči i uretrálních stěrů je pro náležitý průkaz patogenu nezbytná. Vyšetření pouze jednoho vzorku sníží významně pravděpodobnost průkazu patogenu.

K restrikci finanční náročnosti musí vést spíše racionální vyhledávání pacientek či pacientů než omezení počtu vyšetření u indikovaných případů. Tedy těch nemocných, kteří zásadně profitují z průkazu chlamydiové infekce a následné příslušné léčby. Proto bychom měli primárně věnovat pozornost případům, kde má diagnostika a náležitá léčba chlamydiové infekce zásadní význam (např. ženy v IVF programu, mladé dívky ve fertilním věku apod.). Použití amplifikačních metod PCR významně přispívá k prevenci ektopické gravidity, k léčbě zánětů malé pánve a tubární sterility jako zřejmého faktoru při infertilitě páru.

LITERATURA

1. **Wagenlehner FME, Weidner W, Naber KG.** Chlamydia infection in urology. *World J Urol* 2006; 24: 2–12.
2. **Lan J, Ossewaarde JM, Walboomers JMM, Meijer CJLM, van der Brule ACJ.** Improved PCR sensitivity for direct genotyping of *Chlamydia trachomatis* serovars by using a nested PCR. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 528–530.
3. **Mahony JB, Luinstra KE, Sellors JW, Chernesky MA.** Comparison of plasmid – and chromosome – based polymerase chain reaction assays for detection *Chlamydia trachomatis* nucleic acids. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 1753–1758.
4. **Biros E, Bodnár J, Biros I, Borisova E, Mojzis J, Hrivnak M, Klimčáková L, Findlay I, Mirossay A, Mirossay L.** Nucleic acid amplification technique for detection of *Chlamydia trachomatis* infection from clinical urogenital swabs. *Folia Microbiol (Praha)* 2007; 52(4): 437–442.
5. **Wisniewski CA, White JA, Michel CE, Mahilum-Tapay L, Magbunua JP, Nadala EC Jr, Barber PJ, Goh BT, Lee HH.** Optimal method of collection of first-void urine for diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infection in men. *J Clin Microbiol* 2008; 46(4): 1466–1469.
6. **Lee SR, Chung JM, Kim YG.** Rapid one step detection of pathogenic bacteria in urine with sexually transmitted disease (STD) and prostatitis patient by multiplex PCR assay (mPCR). *J Microbiol* 2007; 45(5): 453–459.
7. **O'Farrel N, Morison L, Moodley P, Pillat K, Vanmali T, Quigley M, Strum AW.** Genital ulcers and concomitants complaints in men attending a sexually transmitted infections management. *Sex Transm Dis* 2008; 3 (of print).
8. **Roubalová K.** A simultaneous detection of *Chlamydia pneumoniae* and *Chlamydia trachomatis* DNA by real-time PCR. *Epidemiol Microbiol Immunol* 2007; 56(4): 166–173.