

БЪЛГАРСКО НАУЧНО ДРУЖЕСТВО ПО АКУШЕРСТВО И ГИНЕКОЛОГИЯ
BULGARIAN SCIENTIFIC SOCIETY OF OBSTETRICS AND GYNECOLOGY

АКУШЕРСТВО И ГИНЕКОЛОГИЯ

OBSTETRICS AND GYNECOLOGY

The official journal of the Bulgarian Scientific Society
of Obstetrics and Gynecology



Volume 54
ISSN 0324-0959

8'2015

НЯКОИ АСПЕКТИ ПРИ ДИАГНОСТИКАТА НА УРОГЕНИТАЛНИТЕ ИНФЕКЦИИ ПРИЧИНЕНИ ОТ CHLAMYDIA TRACHOMATIS

Ковачев Е¹, И. Бакърджиев², Г. Пехливанов³, Н. Колев¹, Е. Груева⁴, С. Анжел²

¹Катедра по Акушерство и гинекология, Медицински Университет, Варна

²Медицински колеж, Медицински Университет, Варна

³Катедра по Дерматология и венерология, Медицински Университет, София

⁴МБАЛ „Медика Русе“ ООД, Русе

Резюме

За доказване на хламидия са проведени следните тестове: Ензимен Имунологичен тест (EIA), Ензимно - свързани флуоресцентни тестове (ELFA), Полимераза - верижна реакция (PCR) - за доказване на *Chlamydia Trachomatis*, *Neisseria Gonorrhoeae*, *Mycoplasma Genitalium* и *Ureaplasma Urealyticum*. Изследвани са 486 пациенти на възраст между 18 и 62 години, диагностицирани с уретрит, епидидимит, простатит, цервицит, ендцервицит, тазово-възпалителна болест и стерилитет. При съпоставяне на PCR и EIA са установени съществени различия по отношение на положителния резултат ($p < 0.001$), докато между PCR и ELFA такива почти липсват ($p > 0.1$). EIA е метод, който дава по-висок процент на неспецифични положителни реакции, докато резултатите, получени с ELFA са много близки до тези, получени чрез PCR. Усъвършенстването и налагането на стандартизирани методи за диагностика и оценка е от съществено значение не само за пациента и лекуващият го лекар, но и за здравеопазването, фармакологичните компании и обществото като цяло.

Ключови думи: Хламидия, EIA, ELFA, PCR

SOME DIAGNOSTIC ASPECTS OF CHLAMYDIA TRACHOMATIS UROGENITAL INFECTIONS

Kovachev E.¹, I. Bakardzhiev², G. Pehlivanov³, N. Kolev¹, E. Grueva⁴, S. Anzhe²

¹Department of Obstetrics and Gynecology, Medical University of Varna, Bulgaria

²Medical College, Medical University of Varna, Bulgaria

³Department of Dermatology and Venereology, Medical University of Sofia, Bulgaria

⁴MBAL "Medica Ruse", Ruse

Abstract

The following tests were used to make the diagnosis of *Chlamydia Trachomatis*: Enzyme Immunoassay (EIA), Enzyme-Linked Fluorescent Assay (ELFA), Polymerase Chain Reaction DNA amplification for *Chlamydia Trachomatis*, *Neisseria Gonorrhoeae*, *Mycoplasma Genitalium* and *Ureaplasma Urealyticum*. The subject of this study were 486 outpatients between the ages of 17 and 62, diagnosed with urethritis, epididymitis, prostatitis, cervicitis, endocervicitis, pelvic inflammatory disease and sterility. Comparison PCR and EIA showed statistically significant difference between the positive results obtained by the two methods ($p < 0.001$). Comparing PCR and ELFA on the other hand, did not show any statistically significant difference ($p > 0.1$). EIA is the method that gives a higher percentage of nonspecific positive reactions, while the results obtained with ELFA are much closer to the ones obtained by PCR. According to contemporary evidence based medicine, the development of unified standart methods for diagnosis and evaluation is of vital importance, not only for the patient and the treating physician but also concerns for the healthcare system, the general public and the pharmaceutical companies as well.

Key words: *Chlamydia trachomatis*, EIA, ELFA, PCR

Въведение:

Chlamydia trachomatis (серотипове - A-C, D-K, L1-L3) е причинител на широка група заболявания: уретрит, епидидимит, цервицит, салпингит, ендометрит, конюнктивит, кератит, синдром на Райтер, Венерически лимфогранулом, тазово-

възпалителна болест и неонатална пневмония [6].

Инфекция и имунен отговор:

Chlamydia е облигантен вътреклетъчен микроорганизъм, който се развива в еукариотни клетки, има собствена метаболитна система, но не е способен да произвежда

Описаните промени в имунитета обуславят по-голямата чувствителност на бременните към определени инфекции, особено към действието на липополизахаридите, които активират вроденият имунен отговор.

Chlamydia trachomatis притежава липополизахариден антиген, който обаче е идентичен за всички грам-негативни и някои грам-позитивни бактерии, следователно тестовете с които се доказва са неспецифични за хламидийна инфекция. През последните години сме свидетели на все по-широкото използване на серологични тестове в България, което доведе до свърхдиагностика на хламидийната инфекция.

Цел:

Целта на изследването е да установи корелацията между съществуващите методи за диагностика на урогениталната инфекция с *Chlamydia trachomatis*.

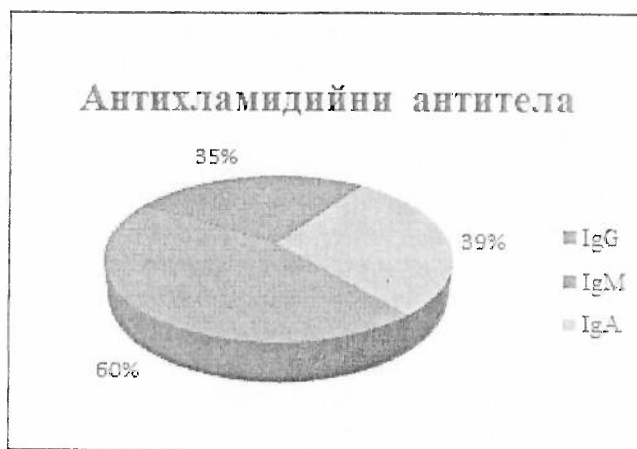
Материали и методи:

За периода 01.06.2013-01.06.2015г. са изследвани 486 пациенти на възраст между 18 и 62 години, диагностицирани с уретрит, епидидимит, простатит, цервицит, ендцервицит, тазово-възпалителна болест и стерилитет. Проведени са прегледи и изследвания в: Катедра по Акушерство и гинекология към МУ-Варна; Клиника по дерматология и венерология към Александровска университетска болница -София, Медицински колеж към МУ Варна, МБАЛ „Медика Русе“ ООД, Русе. За доказване на хламидия са проведени следните тестове: Ензимен Имунологичен тест (EIA), Ензимно - свързани флуоресцентни тестове (ELFA), Полимеразо - верижна реакция (PCR) - за откриване на *Chlamydia Trachomatis*, *Neisseria Gonorrhoeae*, *Mycoplasma Genitalium* и *Ureaplasma Urealiticum*. [17,19,21]. ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). е основен имуноензимен метод в клиничната имунология. EIA методът, който е аналогичен на ELISA се базира на индиректна имуноензимна реакция за доказване на липополизахаридите по мембраната на елементарните телца, които се улавят с моноклонални или поликлонални антитела с добавен към тях ензимен субстрат, който да оцвети пробата. Използван е ImmunoComb СТ (Organics) - това е бърз количествен метод за определяне на антитела в човешки серум или плазма. ELFA е качествен метод за определяне на хламидиен антиген. Въпреки, че клетъчните култури все още се смятат за златен стандарт, методите с които се установяват антитела са по-лесни за изпълнение и се използват в повечето клинични лаборатории[11]. Използван е и VIDAS bio Merieux за уретрални и цервикални

проби. Този метод се основава на имуноанализ последван от флуоресцентна детекция. PCR (ДНК амплификация): установява и мултиплицира специфична част от ДНК на микроорганизма, като дори минимални количества са достатъчни. Проведен е и следният тест: Amplicor, *Chlamydia Trachomatis*, *Neisseria Gonorrhoeae* HoffimanLa Roche and Sacace Biotechnologies (*Chlamydia Trachomatis*, *Neisseria Gonorrhoeae* и *Ureaplasma Urealiticum*). Тестът се състои от три стъпки: ДНК екстракция, амплификация и детекция. На сутринта са събрани следните биологични проби: урина от пациенти с уретрит, простатен секрет и цервикален секрет[9,10,16]. Всички проби се събират, съхраняват и използват съгласно указанията. Резултатите са интерпретирани спрямо установените правила. Проби с унищожени бактерии повече от 0,8 за *Chlamydia trachomatis* са взети за положителни, докато за *Neisseria gonorrhoeae* нивото е повече от 2,0 (Ampiclor). Граничните резултати са повторени. В случай на неубедителен резултат са взети нови проби. Представен е статистически анализ на резултатите на Windows EXCEL и SPSS.

Резултати:

Анализът на получените данни показва следното разпределение на антихламидийните антитела: IgA 39% (n=189), IgM 35% (n=170), IgG 60% (n=292). (фиг. 1)



фиг. 1 Разпределение на антихламидийните антитела.

За да бъдат сравнени резултатите на 182 позитивирани проби с EIA, е тествана същата група с ELFA. Само 15% се оказват положителни и при двата теста, което доказва липсата на специфичност на EIA антихламидийният тест. За да бъде повишена специфичността и чувствителността на резултатите с 91 от субектите е проведен PCR тест чрез приложението на микрохбридизационна техника. Само 9,2 от резултатите са положителни

Книгопис:

1. Anagnius C, Lore B, Jensen JS. *Mycoplasma genitalium*: prevalence, clinical significance and transmission. *SexTransmInfect.* 2005 Dec; 81(6):458-62. doi: 10.1136/sti.2004.012062 CrossRef [PubMed]
2. Baggiolini, M., B. Dewald, and B. Moser. 1994. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines — CXC and CC chemokines. *Adv. Immunol.* 55:97–179.
3. Black, C.M. Current methods of laboratory and diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 1997 Jan; 10(1): 160-184. [PubMed]
4. Craven CM, Morgan T, Ward K. Decidual spiral artery remodelling begins before cellular interaction with cytotrophoblasts. *Placenta* 19(4), 241–252 (1998).
5. Johnson RM. Murine oviduct epithelial cell cytokine response to *Chlamydia muridarum* infection include interleukin-12-p70 secretion. *Infect Immun* (2004) 72:3951–60. doi:10.1128/IAI.72.7.3951-3960.2004
6. Hanna J, Goldman-Wohl D, Hamani Y et al. Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal–maternal interface. *Nat. Med.* 12(9), 1065–1074 (2006).
7. King A. Uterine leukocytes and decidualization. *Hum. Reprod. Update* 6(1), 28–36 (2000).
8. Mitchell, S. A., S. R. Shukla, R. N. Thin. aetiology of non-gonococcal urethritis: A possible relation to other infections. *Int. J. STD & AIDS.* 1990 Nov;1(6):429-431. [PubMed]
9. Modarress KJ, Cullen AP, Jaffurs WJ Sr, Troutman GL, Mousavi N, Hubbard RA, et al. Detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in swab specimens by the Hybrid Capture II and PACE 2 nucleic acid probe tests. - *Sex. Transm. Dis.* 1999 May;26(5):303-308. [PubMed]
10. Moncada, J., J. Schachter, G. Bolan, Engelman J, Howard L, Mushahwar I, et al. Confirmatory assay increase specificity of the Chlamydiazyme test for *Chlamydia trachomatis* infection of the cervix. - *J. Clin. Microbiol.*, 1990 Aug;28(8):1770-1773. [PubMed]
11. Ouzounova V, J. Haralambieva, J. Jankov, D. Petrov, I. Mitov. Prevalence of *Chlamydia Trachomatis* infections in symptomatic patients in Bulgaria. *Journal if IMAB*, 2004 10(1):11-14. DOI: 10.5272/jimab.2004101.11CrossRef
12. Petrova E., B. Dimitrov. Serological monitoring of patients with sexually transmitted *Chlamydia* infections. *Dermatol. and Venereol. Bulg.* 1994, No 2-3, 20-23
13. Rabenau, H.F., E. Kohler, M. Peters, H.W. Doerr, B. Weber. Low correlation of serology with detection of *Chlamydia trachomatis* by ligase chain reaction and antigen EIA. *Infection.* 2000 Mar-Apr;28(2):97-102. doi:10.1007/s150100050054 CrossRef [PubMed]
14. Storz, J. 1988. Overview of animal diseases induced by chlamydial infections. In *Microbiology of Chlamydia*. A.L. Barron, editor. CRC Press, Boca Raton, FL. 167–192.
15. Tchoudomirova K, Nuhov P, Tchapanova A. Prevalence, epidemiological and clinical correlates of genital *Chlamydia trachomatis* infection. *J Eur Acad Dermatol Veneerol.* 1998 Nov;11(3):214-20. [PubMed]
16. Tchoudomirova K., A. Tchapanova, F. Nouchov. Detection of *Chlamydia trachomatis* in first-void urine from men and women as an alternative to swabs. *Folia Med (Plovdiv)*, 39, 1997, No 4, 30-36. [PubMed]
17. Thejls H., J. Gnarpe, H. Gnarpe, P. G. Larsson, J. J. Platz-Christensen, L. Ostergaard, A. Victor. Expanded gold standart in the diagnosis of *Chlamydia trachomatis* in low prevalence population: diagnostic efficacy of tissue culture, direct immunoassay, PCR and serology. *Genitourin. Men.*, 70, 1994, No 5, 300-303.
18. Trundley A, Moffett A. Human uterine leukocytes and pregnancy. *Tissue Antigens* 63(1), 1–12 (2004).
19. Van Dyck E, Ieven M, Pattyn S, Van Damme L, Laga M. Detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* by enzyme immunoassay, culture, and three nucleic acid amplification tests. *J. Clin. Microbiol.* 2001 May;39(5):1751-1756. doi:10.1128/JCM.39.5.1751-1756.2001CrossRef [PubMed]
20. Veenstra van Nieuwenhoven AL, Bouman A, Moes H et al. Endotoxin-induced cytokine production of monocytes of third-trimester pregnant women compared with women in the follicular phase of the menstrual cycle. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 188(4), 1073–1077 (2003).
21. Verkooyen RP, Peeters MF, van Rijsoort-Vos JH, van der Meijden WI, Mouton JW. Sensitivity and specificity of three new commercially available *Chlamydia trachomatis* tests. - *Int. J. STD AIDS.* 2002 Dec; 13 Suppl. 2:23-25. doi:10.1258/095646202762226119 CrossRef [PubMed]
22. Vivier E, Raulet DH, Moretta A, Caligiuri MA, Zitvogel L, Lanier LL, et al. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science* (2011) 331:44–9. doi:10.1126/science.1198687
24. Williams PJ, Searle RF, Robson SC, Innes BA, Bulmer JN. Decidual leucocyte populations in early to late gestation normal human pregnancy. *J. Reprod. Immunol.* 82(1), 24–31 (2009).