

*Janina Ruczkowska, Irena Choroszy-Król*

**BADANIA LABORATORYJNE  
W KIERUNKU CHLAMYDIA TRACHOMATIS;  
CZY WSKAZUJĄ ONE NA SPADEK LICZBY ZAKAŻEŃ?**

Katedra i Zakład Mikrobiologii AM we Wrocławiu  
Kierownik: prof. dr hab. med. *K. Grzybek-Hryniewicz*

*Na podstawie wyników badań z lat 1993-1996 dotyczących 2 393 pacjentów przeanalizowano częstość zakażenia chlamydiami dolnych odcinków układu moczowo-płciowego. Oceniono również przydatność metod stosowanych do badań diagnostycznych i przesiewowych.*

Chlamydia trachomatis (Ct) pozostaje ważnym patogenem dolnych odcinków układu moczowego i narządów rodnych, przenoszonym drogą płciową i wywołującym podobne do rzeżączki schorzenia i powikłania. Skuteczna kontrola epidemiologiczna zakażeń Ct jest zależna zarówno od czułości i swoistości testów rozpoznawczych oraz dostępności laboratoryjnych badań jak i jednoczesnego leczenia partnerów seksualnych (9).

W niniejszej pracy przeprowadzono analizę porównawczą dotyczącą częstości zakażeń chlamydiami u kobiet i mężczyzn w Regionie Dolnego Śląska w latach 1993-1996 w porównaniu z danymi z 7 lat ubiegłych (1986-1992) (5).

**MATERIAŁ I METODY**

**Pacjenci**

Populacja badana w latach 1993-1996 pochodziła głównie z m. Wrocławia i województwa. Z ogólnej liczby 2 393 pacjentów (1 197 kobiet i 1 196 mężczyzn), 814 (34%) miało kliniczne objawy zapalenia cewki moczowej i/lub szyjki macicy, a 1 579 (66%) nie wykazywało objawów wskazujących na zakażenie chlamydialne. Ci ostatni zgłaszali się do badania obawiając się zakażenia Ct albo ze względu na podejrzenie choroby u partnera seksualnego. Pacjenci byli w wieku od 18-69 lat. Przedmiotem badań były wymazy z cewki moczowej i szyjki macicy pobierane firmowymi wymazówkami. Do badań w kierunku Ct pacjentów objawowych zastosowano szybki odczyn immunofluorescencji bezpośredniej, natomiast do badań przesiewowych pacjentów bezobjawowych używano jednego z trzech testów immunoenzymatycznych.

## Metody badań

DFA (Direct Fluorescent Assay) z użyciem przeciwciał monoklonalnych do wykrywania ciałek elementarnych (EB) Ct w preparatach bezpośrednich materiału od chorych. Odczynnik Chlamyset (Orion Diagnostica). Mikroskop fluorescencyjny Olympus, pow. 400× i 1000×.

EIA (Enzyme Immunoassay), odczynnik Chlamydzymy (Abbott).

IMx Select Chlamydia Assay (Abbott) wykorzystujący technikę MEIA (Microparticle Enzyme Immunoassay) (4).

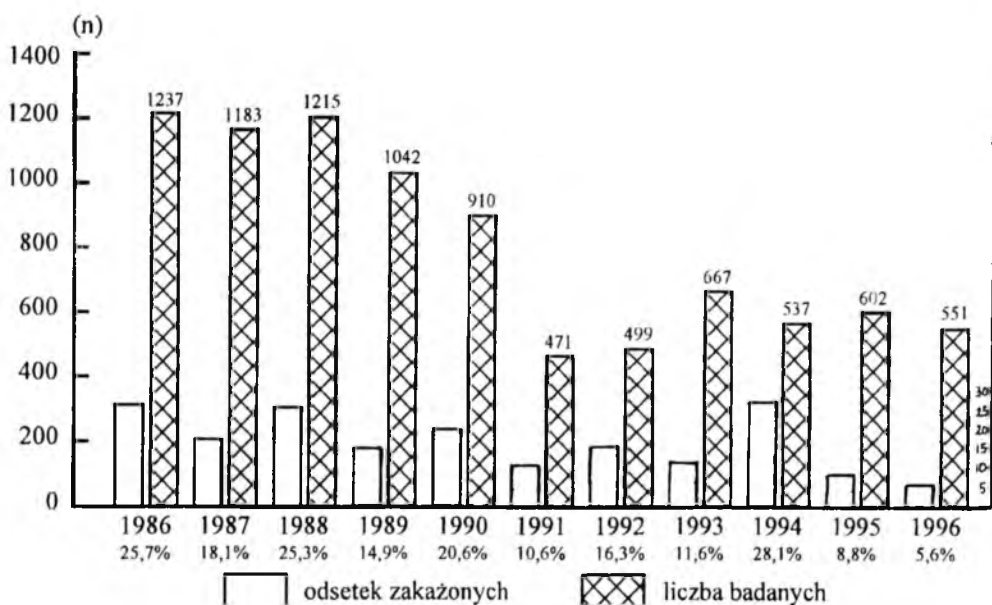
Vidas Chlamydia (bioMérieux) – metoda immunofluorescencyjno-enzymatyczna

ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay). (6)

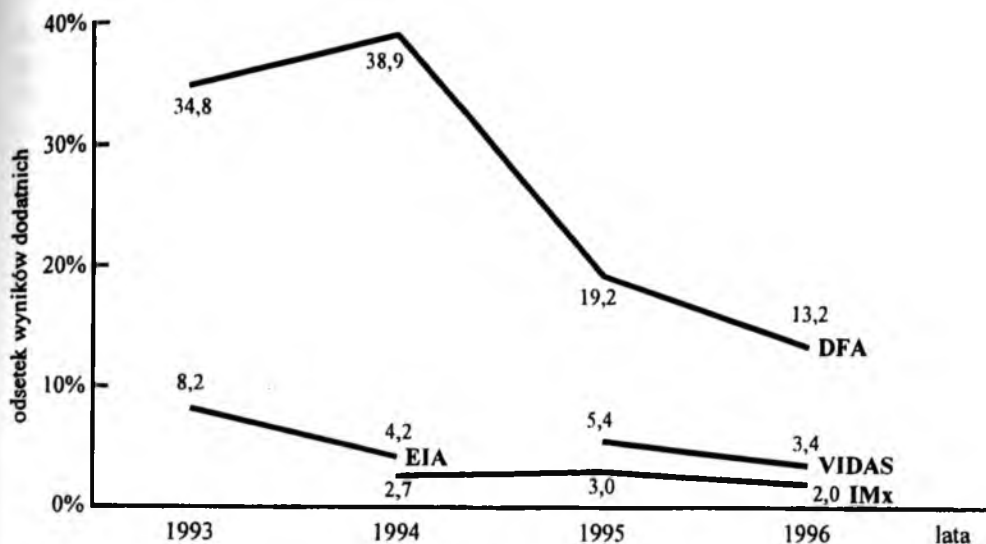
Półautomatyczne i automatyczne techniki EIA, IMx i Vidas służą do wykrywania antygenów lipopolisacharydowych chlamydii. Badania wykonano zgodnie z wymaganiami producentów odczynników i urządzeń.

## WYNIKI

Z poprzednich badań przeprowadzonych w latach 1986–1992 (5) wynika, że najwyższy odsetek zakażeń Ct obserwowano w latach 1986 (25,7%), i 1990 (20,6%). W roku 1991 zauważono tendencję spadkową tyżącą zarówno liczby pacjentów kierowanych do badań w kierunku Ct jak i odsetka (10,6%) chorych u których badaniem laboratoryjnym potwierdzono zakażenie chlamydiami. Jak wynika z danych obejmujących lata 1993–1996 (Ryc. 1) trend ten utrzymywał się w odniesieniu



Ryc. 1. Liczba badanych pacjentów i odsetek zakażonych *C. trachomatis* w latach 1993–1996 vs 1986–1992



Ryc. 2. Dodatnie wyniki badań techniką DFA, EIA, IMx i Vidas w kierunku *C. trachomatis* (1993-1996)

do liczby kierowanych do badań pacjentów, natomiast odsetek zakażonych chlamydiami, po przejściowym wzroście w latach 1992-1994 (11,6% - 28,1%) obniżył się w 1995 r. do 8,8%, a w 1996 r. do 5,6% co stanowi najniższy odsetek z notowanych w ciągu 11 lat obserwacji.

W ostatnich 4 latach w Pracowni Diagnostyki Chlamydii zaprzestano wykonywania badań metodą hodowli ze względu na konieczność stałego pasażowania hodowli tkankowej, częstej kontaminacji i długiego czasu oczekiwania na wynik badania.

Tabela I. Wyniki badań w kierunku *Chlamydia trachomatis* w latach 1993-1996

Lata	DFA <sup>1)</sup> +/n <sup>2)</sup>	EIA +/n	IMx +/n	Vidas +/n
1993	30/86	48/581	-	-
1994	154/395	6/141	1/37	-
1995	35/182	-	6/199	12/221
1996	20/151	-	4/199	7/201
Razem	239/814	54/722	11/435	19/422
+ [%]	29,4	7,5	2,5	4,5

<sup>1)</sup> objaśnienia metod używanych w badaniach w tekście na str. 2

<sup>2)</sup> liczba zakażonych/liczba badanych

Techniki DFA (odczyn Chlamyset) używano do szybkiej diagnostyki preparatów bezpośrednich sporządzonych z wymazów od pacjentów objawowych. Do badań przesiewowych używano natomiast technik immunoenzymatycznych EIA (1993-1994), IMx (1994-1996) lub ELFA-Vidas (1995-1996). W tabeli I i na rycinie 2 przedstawiono

wyniki badań tymi technikami z uwzględnieniem liczby badanych, liczby zakażonych i czasokresu badań. W grupie pacjentów objawowych (urethritis, cervicitis) wyniki dodatnie odczynu DFA stwierdzono ogółem u 239 (29,4%) spośród 814 badanych, jednak w latach 1995–1996 odsetek zakażonych był znacznie niższy (19,2 – 13,2%) niż w latach 1993–1994 (34,8 – 38,9%). U pacjentów bezobjawowych ( $n=1579$ ) odsetki wyników dodatnich były niskie i również obserwowano tendencje spadkowe w odczynie EIA (8,2 – 4,2%), IMx (2,7 – 2,0%) i Vidas (5,4 – 3,4%).

## DYSKUSJA

W krajach skandynawskich, gdzie rejestracja zakażeń chlamydialnych jest objęta przepisami, a badania są bezpłatne, odsetek wyników dodatnich (ponad 10%) obserwowany w latach 80-tych, spadł ostatnio o połowę (poniżej 5%) (9). W ogólnoeuropejskich badaniach obejmujących 24 ośrodki w 15 krajach, częstość chlamydialnych infekcji urogenitalnych oceniono na 3,9% (rozrzut od 1,0 do 7,4%). Badania dotyczyły kobiet w wieku 16–32 lat, które zabiegały o poradę w sprawie antykoncepcji lub planowania rodziny (9). W Hiszpanii, Blanco i wsp. (2) na podstawie badań 2 520 pacjentek oddziałów ginekologiczno-położniczych w Madrycie stwierdzili 10-krotny spadek zachorowań (z 6,6% w 1992 do 0,6% w 1996) pomimo (co podkreślają), stosowania coraz czulszych technik badawczych (ELISA i DFA w 1992–1994, a DNA Gen Probe i ELFA VIDAS w 1995–1996); średnia zakażeń w ciągu obserwowanych 5 lat wynosiła 1,6%. W badanej populacji autorzy ci zauważyli jednoczesny wzrost zakażeń ureaplazmami (14,3%) bez zmiany częstości zakażeń mykoplazmami (0,15%) (3). We Włoszech, na podstawie międzyośrodkowych badań obejmujących 15 656 pacjentów urologicznych, Sessa i wsp. (12) posługując się metodą EIA, ocenili częstość zakażeń Ct u kobiet i mężczyzn na 6,8% i 15,2% w grupie pacjentów objawowych, a odpowiednio na 5,0% i 6,2% w grupie osób bez objawów. Zdaniem tych autorów, poza płcią, istotne są też różnice w grupach wiekowych i w grupach o różnym rozpoznaniu i stylu życia seksualnego. Podkreślają oni, że zakażenia chlamydialne bardzo często przebiegają bezobjawowo. W Kanadzie, Toyel i wsp. (15) w grupie pacjentów bezobjawowych (472 mężczyzn i 240 kobiet) określili częstość zakażeń Ct posługując się techniką PCR, EIA oraz hodowlą, i porównując jednocześnie wyniki badania wymazów z cewki moczowej i próbek moczu (FVU – first void urine). Zakażenie chlamydiami stwierdzili z równą częstością u mężczyzn i kobiet (7,6% i 7,9%). Podkreślają, że zakażenia Ct cewki moczowej u 1/4 mężczyzn i szyjki macicy u 2/3 kobiet mogą przebiegać bezobjawowo. Technikę PCR uważają za najlepszą z używanych, gdyż czułość EIA przy badaniu wymazów z cewki moczowej mężczyzn jest niska (48%); dotyczy to zwłaszcza pacjentów bezobjawowych. W Hadze (Holandia), Craandijk i wsp. (8) stwierdzili, że wśród pacjentek ( $n=479$ ) przychodni ginekologiczno-położniczych częstość zakażeń Ct obniżyła się z 6% (1984–1990) do 3,4–3,9% w roku 1996. Badania wykonali techniką Ct-DNA (Gen Probe, Pace 2); uważają oni, że badanie moczu techniką analizy molekularnej w kierunku Ct, pozwala na uzyskanie podobnego odsetka wyników dodatnich jak badanie wymazów, a jest mniej urazowe, w porównaniu z pobieraniem materiału wymazówką czy szczoteczką.

W Austrii, gdzie prostytutki są systematycznie kontrolowane, częstość zakażeń Ct spadła z 20,4% w 1980 do 2,2% w 1989; jedynie w 1991 zanotowano niewielki wzrost do 3,3 (14).

Nie we wszystkich krajach odsetki zakażeń Ct są tak niskie. W Rosji, dane z Moskwy wskazują na spadek zakażeń z 34% w 1989 do 26% w 1990 i 20% w 1991 r. (13). Ağaçfidan i wsp. (1) donoszą, że u mężczyzn (n=300) w Istambule podających kontakty seksualne z prostytutkami, odsetek zakażonych wyniósł 12% (DFA). Quinn i wsp. (10) częstość zakażeń Ct wśród mężczyzn i kobiet-partnerów seksualnych – ocenili metodą hodowli na 8,5 – 12,5%, zaś metodą PCR na 14,2%–15,8%. Podkreślają oni duży odsetek wyników dodatnich wśród partnerów bezobjawowych (dane pochodzą z Bethesda, USA).

W naszych ostatnich 4-letnich badaniach przesiewowych obejmujących 1579 pacjentów, zaobserwowano obniżenie odsetka wyników dodatnich, kolejno w: EIA z 8,2 do 4,2%, IMx z 2,7 do 2,0% i Vidas z 5,4 do 3,4%. W tym samym okresie, również w badaniach diagnostycznych wykonanych metodą DFA, a dotyczących 814 chorych z objawami zapalenia cewki moczowej lub szyjki macicy, odsetki wyników dodatnich wynoszące początkowo 34,8 – 38,9% (1993–1994) spadły do 19,2–13,2% (1995–1996), a więc 3-krotnie. Dane te są podobne do tych cytowanych przez autorów z Europy i USA, wyższe jednak niż w krajach skandynawskich.

W praktyce dużą rolę odgrywają techniki badawcze. Do badań diagnostycznych wybraliśmy DFA z uwagi na jego czułość, swoistość, szybkość wykonania i cenę (od 1994 r. obowiązuje bowiem odpłatność badań przez pacjentów). Na wyniki odczynu DFA wpływ może mieć zarówno rodzaj przyrządu użytego do pobrania materiału (wymazówka, szczoteczka), jak i kolejność pobrań próbek, a także liczba ciałek elementarnych (EB) przyjęta za podstawę rozpoznania zakażenia (4, 7, 11). Clad i wsp. (7) wykazali, że czułość techniki DFA spada przy kolejnych wymazach (91%, 67%, 33%). Na przestrzeni lat do badań przesiewowych używaliśmy różnych testów immunoenzymatycznych, które nie należą jednak do niezawodnych. Wykrywają bowiem tylko LPS chlamydii bez różnicowania w obrębie gatunku, dają więc reakcje krzyżowe i to nie tylko w obrębie rodzaju Chlamydia; np. test IMx, jak podaje producent (firma Abbott), może dawać reakcje krzyżowe również z *Trichomonas vaginalis* i *Moraxella lacunata*. Firma Abbott wstrzymała produkcję odczynników do testu Chlamydiazyme. Testy immunoenzymatyczne w porównaniu z metodami amplifikacji kwasów nukleinowych (PCR-polymerase chain reaction i LCR-Ligase chain reaction) charakteryzuje mała czułość przy badaniu pacjentów bezobjawowych i przy zastosowaniu do badań populacji o niskim wskaźniku zachorowalności. Odczyn PCR tak obecnie zalecany do badania próbek moczu (15), również nie jest niezawodny. Wyniki mogą być niepewne przy krzyżowej kontaminacji (15) lub obecności inhibitorów reakcji w próbkach badanych (7). Ponieważ nie ma testów idealnych, Clad i wsp. (7) uważają, że kryterium uznawania przypadków za dodatnie winno się opierać na wynikach co najmniej 2–3 testów (PCR, EIA, DFA) co dotyczy zwłaszcza kobiet u których śluz szyjkowy (obecny w około 20% próbek) może hamować reakcję PCR. Ze względów ekonomicznych przy badaniach rutynowych nie jest to chyba możliwe. Dla przykładu ceny (z lipca 1997) stosowanych przez nas odczynników: DFA-18,60 zł, IMx i Vidas po 50,80 zł. Testy amplifikacji DNA (PCR, LCR) są jeszcze droższe niż testy immunoenzymatyczne (9). Naszym zdaniem, przy malej

obecnie liczbie badań w kierunku Ct, najbardziej przydatny jest test DFA, który pozwolił na wykrycie zakażeń chlamydiami u 13,2% pacjentów objawowych badanych w 1996 roku.

### WNIOSKI

1. W latach 1993–1996 odsetek zakażeń chlamydialnych obniżył się z 20% (1986–1992) do 13,5% (w roku 1996 wynosił średnio 5,6%).

2. Liczba pacjentów kierowanych do badań w latach 1991–1996 w porównaniu z poprzednim okresem (1986–1990) zmalała niemal dwukrotnie, co częściowo można tłumaczyć indywidualną odpłatnością za badanie i jego wysokim kosztem.

3. Różne odczyny immunoenzymatyczne stosowane w okresie ostatnich 4 lat do badań przesiewowych u pacjentów bezobjawowych dawały podobne wyniki (kilka procent dodatnich) zawsze z tendencją spadkową w roku 1996.

*J. Ruczkowska, I. Choroszy-Król*

### SCREENING TESTS FOR CHLAMYDIA TRACHOMATIS; DO THEY SHOW DECLINING TREND OF INFECTION?

### SUMMARY

A study on the frequency of *Chlamydia trachomatis* (Ct) urogenital infection comprised 2 393 patients (1 197 women and 1 196 men), aged 18–69 years. Urethral and cervical specimens were tested using immunofluorescent (DFA) for symptomatic and immunoenzymatic techniques (EIA, IMx, Vidas-ELFA) for asymptomatic patients. Basing on the tests results (1993–1996) chlamydiosis was diagnosed in 323 (13,5%) cases, 169 (14,1%) women and 154 (12,8%) men, aged 20–40 yrs. The percentage of positive results determined by EIA, IMx or Vidas were similar (8,2–4,2%, 3,0–2,0%, 5,4–3,4%, respectively) but lower than that by DFA test (38,9–13,2%). Over the last few years the number of patients screened for Ct, as well as the incidence of Ct infection, has decreased (5,6% in 1996). The data were compared to those from 1986–1992.

### PIŚMIENNICTWO

1. *Agāçfidan A, Önel M, Alp T*, i in. Prevalence of *Chlamydia trachomatis* among male clients of the prostitutes: evaluation with demographic and epidemiologic findings. Przedstawiono na: 8th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Lausanne, May 25–28, 1997, P-1121. – 2. *Blanco MA, Saez A, Gómez O*, i in. Evolution of the frequency of *Chlamydia trachomatis* genital infection in women during 5 years, *ibid*, P-1224. – 3. *Blanco MA, Salazar F, Gómez O*, i in. Evolution of frequency of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* in women during 5 years, *ibid*, P-1125. – 4. *Chernesky MA, Jang D, Sellors J*, i in. Detection of *Chlamydia trachomatis* antigen in male urethral swabs and urines with a Microparticle Enzyme Immunoassay. *Sex Transm Dis* 1995, 22: 55–59. – 5. *Choroszy-Król I, Ruczkowska J*. Epidemiology of chlamydial genitourinary tract infection in the Lower Silesian District of Poland (1986–1992). *Sex Transm Dis*. 1994, 21: S191. – 6. *Choroszy-Król I, Ruczkowska J, Teryks-Wotyniec D*. Vidas *Chlamydia* test vs *Chlamyset* w diag-

nostyce zakażeń *Chlamydia trachomatis*. Diagn Lab 1997, 33: 111-117. – 7. Clad A, Naudascher I, Flecken U, i in. Evidence of labile inhibitors in the detection of *Chlamydia trachomatis* in cervical specimens by polymerase chain reaction. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1996, 15: 744-747. – 8. Craandijk M, Peters C, Mutsaers J, i in. Detection of prevalence of *Chlamydia trachomatis* infections in a outpatient-department of obstetrics and gynaecology by molecular analysis of urine samples. Przedstawiono na: 8 th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Lausanne, May 25-28, 1997, P-1112. – 9. Mårdh P-A, Genç M. Is Europe ready for screening for chlamydial infections? W: Proceedings of the European Society for the Chlamydia Research, Vienna, 1996, 381-382. – 10. Quinn TC, Gaydos C, Shepherd M, i in. Epidemiologic and microbiologic correlates of *Chlamydia trachomatis* infection in sexual partnerships. JAMA 1996, 276: 1737-1742.

11. Ruczkowska J, Choroszy-Król I. Wpływ sposobu pobierania materiału do badań w kierunku *Chlamydia trachomatis* na wyniki odczynu immunofluorescencji bezpośredniej. Diagn Lab 1997, 33, 45-48. – 12. Sessa R, Latino MA, Magliano EM, i in. Epidemiology of urogenital infections caused by *Chlamydia trachomatis* and outline of characteristic features of patients at risk. J Med Microbiol. 1994, 41: 168-172. – 13. Shatkin A Chlamydial infections in Russia and former USSR. W: Proceedings of the European Society for the Chlamydia Research, Stockholm, 1992, 283-285. – 14. Stary A, ibid., 1992, 275-277. – 15. Toye B, Peeling RW, Jessamine P, i in. Diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infection in asymptomatic men and women by PCR assay. J Clin Microbiol. 1996, 34: 1396-1400.

Adres: Katedra i Zakład Mikrobiologii AM  
ul. Chałubińskiego 4, 50-368 Wrocław