


Laboratórna diagnostika chlamýdiových infekcií

Hučková D., HPL Bratislava
47.odborná konferencia SSPRL
Bojnice, 19. – 20. máj 2006



Metódy laboratórnej diagnostiky

C. pneumoniae

Priame

- kultivácia
- detekcia antigénu
- detekcia NK

Nepriame

- MIF
- ELISA (IgA, IgG, IgM)
- Western blot
- KFR

Metódy priameho dôkazu *C. pneumoniae*

Kultivácia

- mikroskopický dôkaz živého agens po jeho pomnožení v tkanivovej kultúre, žltkový vak a následnej detekcii antigénu, resp. inklúzií pomocou farbenia (napr. Giemsa, monoklonálne protilátky)
- vysoko špecifická, málo citlivá
- vysoké nároky na technické vybavenie, subjektívne hodnotenie
- v súčasnosti najmä pre výskumné a epidemiologické účely

Detekcia antigénu

- priama imunofluorescencia

Metódy priameho dôkazu *C. pneumoniae*

Detekcia NK

- Polymerázová reťazová reakcia (PCR)
(25 % citlivejšie ako kultivácia)
- **metodika používaná v HPL (GeneProof, ČR)**
 - detekcia multikópiovej sekvencie génu pre 16S rRNK *C. pneumoniae*
 - senzitivita metódy 10^1 kópií genómovej DNK *C. pneumoniae* - napr. vo vzorke výteru alebo až 10^1 v 1 ml krvi
 - technológia „hot start“ a interný štandard - minimalizácia nešpecifických reakcií, resp. odhalenie inhibície PCR

Odber a uchovávanie vzoriek pre priamy dôkaz *C. pneumoniae*

Vyšetrovaný materiál

- **výtery z nosohltanu, z nosnej sliznice**
- indukované **spútum, bronchoalveolárna laváž**
- nezrážanlivá periférna **krv** do EDTA
 - cievna stena, monocyty, makrofágy pri artérioskleróze
 - ster z rohovky, očnej spojovky
 - pohrudničný výpotok
 - kĺbový punktát, synoviálna membrána

Odber do sterilnej skúmavky bez transportného média

- transport pri +4 °C do 12 hod (dlhšie skladovanie zamraziť pri -20°C)
 - 2 ml telesných tekutín, ster alebo výter na tampóne "na sucho"

Nepriama sérologická diagnostika

- ☞ **Chlamýdie indukujú tvorbu typovo, poddruhovo, druhovo a rodovo špecifických protilátok**
 - pri primárnej infekcii sú indukované najskôr protilátky proti dominantným antigénom, t.j. KV a rodovo špecifickým a až v neskoršom štádiu infekcie dochádza k tvorbe druhovo špecifických protilátok
- ☞ **Dostupné testy sa delia do dvoch základných skupín:**
 - metódy dokazujúce protilátky **proti rodovo spoločným chlamýdiovým antigénom**: LPS, proteíny tepelného šoku (chHsp)
 - metódy určené pre dôkaz protilátok **proti antigénom konkrétneho druhu chlamýdie**: proteíny vonkajšej chlamýdiovej membrány (MOMP)

Dôkaz rodovo špecifických protilátok

ELISA – IgM, IgA, IgG

- **rekombinantný chlamýdiový LPS (rELISA)** - zníženie nešpecificity v dôsledku skríženej reaktivity s protilátkami proti LPS ostatných gramnegatívnych baktérií
 - senzitivita pre recentnú infekciu je 93-96%
- **veľmi citlivý test, pozitívny vo včasnej fáze infekcie**
 - signifikantná sérokonverzia od 5. dňa, 77% pozitívnych výsledkov v sérach odobratých po 7 dňoch ochorenia, teda v dobe, keď len 50% sér býva pozitívnych v MIF
- **pozitívny i pri reinfekcii**

Dôkaz rodovo špecifických protilátok

Komplement-viažúca reakcia

- nižšia citlivosť – pozitivita len u 25 % hospitalizovaných osôb
- pri primoinfekcii KF protilátky rýchlo stúpajú, čo umožňuje včasný sérologický dôkaz nákazy
- u starších osôb a **pri reinfekcii častá negativita KFR**

Dôkaz druhovo špecifických protilátok

Nepriama mikroimunofluorescencia (MIF)

- „zlatý štandard“ sérologickej diagnostiky
 - hlavná nevýhoda je oneskorená detekcia imunoglobulínov a oproti ELISA i nižšia citlivosť

ELISA - semikvantitatívne stanovenie

- syntetické peptidy, MOMP antigény, zmiešané polypeptidové antigény

Western blot - IgM, IgA, IgG

- súčasná detekcia rodovo i druhovo špecifických protilátok
- **výpovedná hodnota výrazne závisí od kvality použitej diagnostickej súpravy**
 - napr. MIKROGEN, Nemecko

Western blot (MIKROGEN, Nemecko)

| Antigén | Druh |
|---|---|
| MOMP Major outer membrane protein | <i>C. trachomatis</i> <i>C. pneumoniae</i> <i>C. psittaci</i> |
| OMP 2 Outer membrane protein 2 | <i>C. trachomatis</i> <i>C. pneumoniae</i> |
| HSP 60 Heat shock protein 60 | <i>C. trachomatis</i> |
| MIP Macrophage infectivity potentiator | <i>C. trachomatis</i> |
| OMP 4 Outer membrane protein 4 | <i>C. pneumoniae</i> |
| OMP 5 Outer membrane protein 5 | <i>C. pneumoniae</i> |

Nepriame sérologické metódy v HPL

- **MIF** (FOCUS Diagnostics, USA)
 - semikvantitatívny dôkaz protilátok triedy IgA, IgG

- **ELISA** (Novagnost, Nemecko)
 - semikvantitatívny dôkaz protilátok triedy IgA, IgG
 - MOMP antigén



Zertifikat

Ringversuch Mai 2005

Gültigkeitsdauer 12 Monate

INSTAND e.V.

Institut für Standardisierung und
Dokumentation im medizinischen
Laboratorium e. V.
Ubler - Str. 20 / PF 250211
40223 / 40093 Düsseldorf
Tel. (0211) 159213 - 0
FAX (0211) 159213 - 30

Der unten genannte Teilnehmer hat die Anforderungen bei folgenden Untersuchungen erfüllt:

| | | |
|--|--|--|
| LUES : | Lues - TPPA (qual.) | Lues - TPPA (quant.) |
| Lues - ELISA (polyvalent) (qual.) | Lues - VDRL-Mikrofl.Test (qual.) | |
| Lues - VDRL-Mikrofl.Test (quant.) | Lues - Diagn.Gesamtbewertung | |
| CHLAMYDIA TRACHOM. : | Chlamydia trachom. - MIFT-IgG (qual.) | Chlamydia trachom. - MIFT-IgG (quant.) |
| Chlamydia trachom. - MIFT-IgA (qual.) | Chlamydia trachom. - MIFT-IgA (quant.) | |
| Chlamydia trachom. - Diagn.Gesamtbewertung | | |
| CHLAMYDIA PNEUM. : | Chlamydia pneum. - MIFT-IgG (qual.) | Chlamydia pneum. - MIFT-IgG (quant.) |
| Chlamydia pneum. - MIFT-IgA (qual.) | | |
| Chlamydia pneum. - MIFT-IgA (quant.) | | |
| Chlamydia pneum. - Diagn.Gesamtbewertung | | |

5987
HPL spol. s.r.o.
Mikrobiologické labor
MUDr. Juraj Hanzen
Istrijska 20
84107 BRATISLAVA
SLOWAKISCHE REP.

Düsseldorf, der 3.8.2005



Reinauer

Prof. Dr. med. Reinauer
(Von der Bundesärztekammer ernannter Ringversuchsleiter)



MIF (FOCUS Diagnostics, USA)

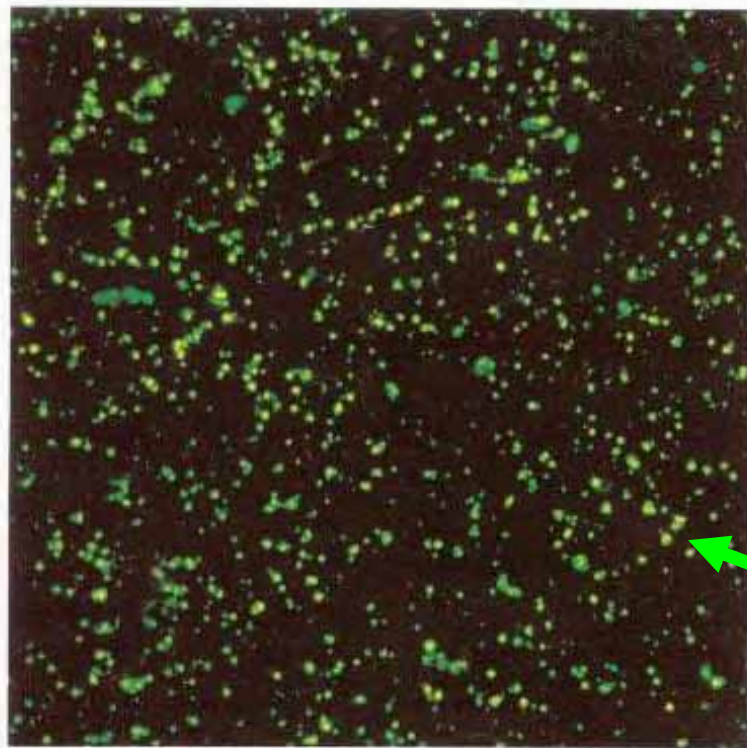
- Purifikované elementárne telieska (zbavené LPS) zriedené v 3 % žĺtkovom vaku
- MOMP *C. pneumoniae*, *C. trachomatis*, *C. psittaci*
- Základné riedenie: IgA, IgG – 1:16; IgM – 1:10

MIF Proven Reliability . . . Standard Serology Method Validated Worldwide

Each well of Focus Technologies' MIF indirect immunofluorescent slide contains three antigen spots and a control spot. Kits for three antibody isotypes -- IgM, IgG, IgA - are available to perform semi-quantitative endpoint titers for single specimens or paired sera.



MIF (FOCUS Diagnostics, USA)



Positive serology :
"starry sky" appearance

Hodnotenie:

pozitívny nález - jasnozelená fluorescencia rovnomerne po celej ploche antigénu

Chlamydia pneumoniae MIF result



Positive



Negative

Dynamika tvorby protilátok

IgM

- tvorba len pri primárnej infekcii (väčšinou u detí)
- začiatok: 2 – 4 týždne po objavení sa príznakov ochorenia
- pretrvávanie: 2 – 6 mesiacov

IgG

- oneskorená odpoveď IgG 6 – 8 týždňov po infekcii
- pomalé stúpanie aj klesanie
- diagnostickým kritériom u primárnych chlamýdiových infekcií je 4-násobný vzostup titra

Dynamika tvorby protilátok

IgA

- nástup v skorom štádiu infekcie
- pretrvávanie 3 týždne – 2 mesiace (závislosť od veku)
- perzistencia viac ako 6 mesiacov je znakom chronickej infekcie *C. pneumoniae*

Väčšina infekcií *C. pneumoniae* u dospelých sú reinfekcie, pre ktoré je charakteristické:

- chýbanie IgM
- rýchla a vysoká odpoveď IgA a IgG
- tendencia k rýchlemu vymiznutiu IgA
 - nie je to však pravidlom, sú prípady, kedy môžu byť nízke hladiny IgM a IgG nemusia stúpať

Interpretácia nálezu *C. pneumoniae* špecifických protilátok

☛ Aktívna infekcia

- prítomnosť IgM a/alebo IgA
- titer IgG – párová vzorka – štvornásobný vzostup hladiny IgG

☛ Infekcia prekonaná v minulosti

- prítomnosť len IgG

☛ Chronická infekcia

- pretrvávanie IgA dlhšie ako 6 mesiacov

Prevalencia protilátok proti *Chlamydia pneumoniae* v HPL

Nediferencovaný súbor; metóda MIF (FOCUS Diagnostics, USA)

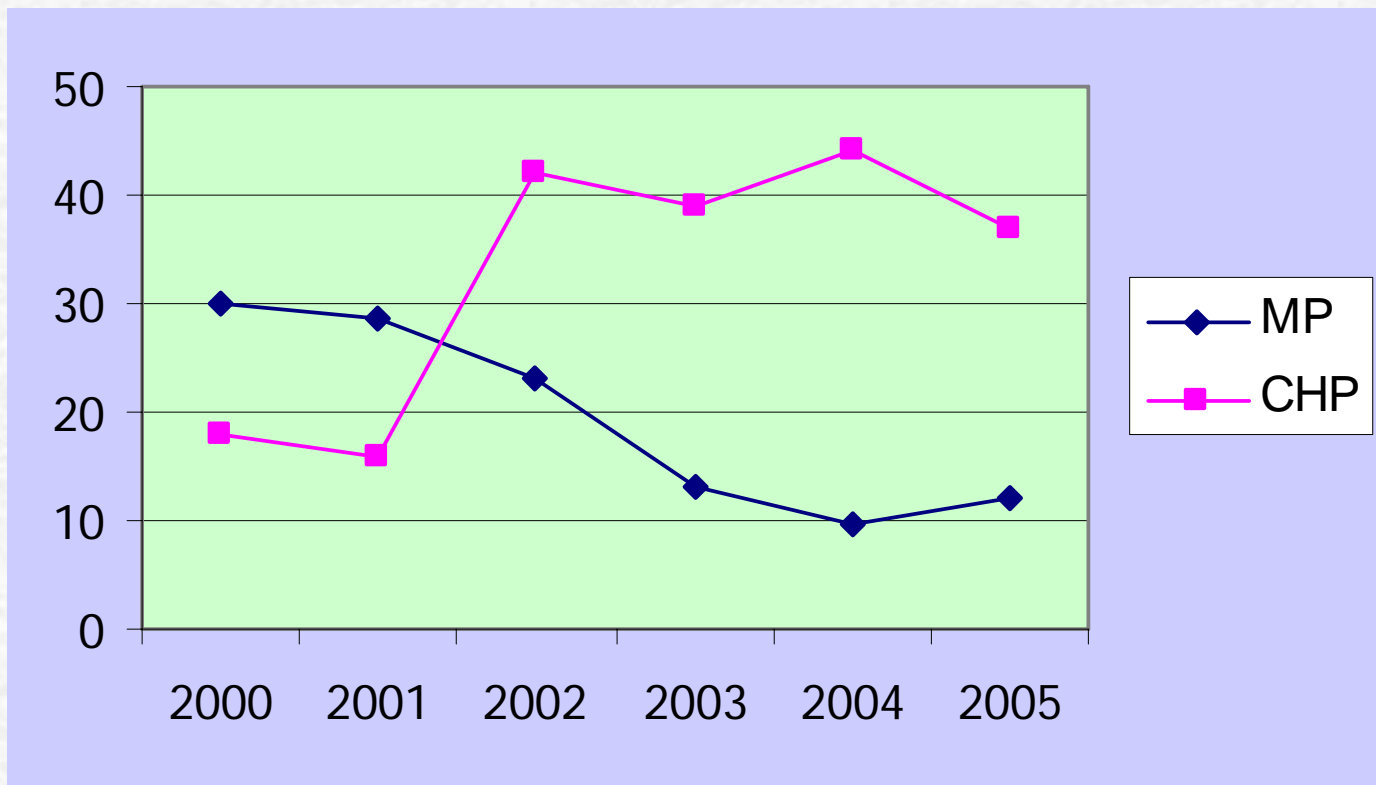
| roky | počet pacientov | recentná infekcia | | infekcia v minulosti | | bez špec. protil. | |
|------|-----------------|-------------------|----|----------------------|----|-------------------|----|
| | | n | % | n | % | n | % |
| 2000 | 818 | 144 | 18 | 247 | 30 | 427 | 52 |
| 2001 | 1 979 | 317 | 16 | 676 | 34 | 986 | 50 |
| 2002 | 3 616 | 1 508 | 42 | 365 | 10 | 1 743 | 48 |
| 2003 | 5 527 | 2 151 | 39 | 970 | 18 | 2 406 | 43 |
| 2004 | 6 883 | 3 055 | 44 | 835 | 12 | 2 993 | 44 |
| 2005 | 12 635 | 4 653 | 37 | 2 253 | 18 | 5 729 | 45 |

Prevalencia protilátok proti *Mycoplasma pneumoniae* v HPL

Nediferencovaný súbor, metóda ELISA (Dia Sorin, Taliansko)

| roky | počet pacientov | recentná infekcia | | infekcia v minulosti | | bez špec. protil. | |
|------|-----------------|-------------------|------|----------------------|------|-------------------|------|
| | | n | % | n | % | n | % |
| 2000 | 427 | 127 | 30,0 | 56 | 13,0 | 244 | 57,0 |
| 2001 | 1 072 | 306 | 28,5 | 128 | 12,0 | 638 | 59,5 |
| 2002 | 1 890 | 435 | 23,0 | 309 | 16,0 | 1 146 | 61,0 |
| 2003 | 2 302 | 307 | 13,0 | 334 | 15,0 | 1 661 | 72,0 |
| 2004 | 2 981 | 280 | 9,4 | 337 | 11,3 | 2 364 | 79,3 |
| 2005 | 6 736 | 829 | 12,0 | 536 | 8,0 | 5 371 | 80,0 |

Percentuálne porovnanie výskytu recentnej infekcie *M. pneumoniae* a *C. pneumoniae*



Prevalencia protilátok proti *Chlamydia trachomatis* v HPL

Nediferencovaný súbor; metóda MIF (FOCUS Diagnostics, USA)

| roky | počet pacientov | pozit. IgA | | pozit. IgG | | bez špec. protil. | |
|------|-----------------|------------|-----|------------|-----|-------------------|------|
| | | n | % | n | % | n | % |
| 2000 | 818 | 11 | 1,3 | 16 | 2,0 | 791 | 96,7 |
| 2001 | 1 979 | 22 | 1,1 | 79 | 4,0 | 1 878 | 94,9 |
| 2002 | 3 616 | 123 | 3,4 | 72 | 2,0 | 3 421 | 94,6 |
| 2003 | 5 527 | 187 | 3,4 | 88 | 1,6 | 5 252 | 95,0 |
| 2004 | 6 883 | 117 | 1,7 | 76 | 1,1 | 6 690 | 97,2 |
| 2005 | 12 572 | 86 | 0,7 | 330 | 2,6 | 12 156 | 96,7 |

Porovnanie záchytnosti *C. trachomatis*
nasledovnými metódami v HPL v rokoch 1997-2005

| Metóda (roky) | počet vyšetrení | z toho pozitívne | |
|------------------------------------|--------------------|------------------|------------|
| | | abs. | % |
| Clearview (1997-1999) | 665 | 20 | 3,0 |
| Génové sondy (1998-2005) | 12 913 | 420 | 3,3 |
| PCR (2005) | 4 113 | 195 | 4,7 |

Záver

Podľa citlivosti a špecifity jednotlivých laboratórnych metód sú doporučené nasledovné postupy:

1. Nepriama sérológia
2. PCR
3. Izolácia
4. Priama detekcia antigénu

Záver

- Detekcia Ab v indikovaných prípadoch pomáha ozrejmiť prítomnosť, charakter a priebeh infekcie
 - dôkaz protilátok proti chlamýdiovému LPS spolu s protilátkami proti chHsp v kombinácii s dôkazom druho špecifických protilátok môže prispieť k odhaleniu chronickej a perzistujúcej infekcie
- Vzhľadom k problematickej epidemiológii a tým obmedzenému interpretačnému využitiu sérologických metód prebieha v súčasnej dobe intenzívny medzinárodný výskum pre validáciu PCR
 - výrazný diagnostický význam pri asymptomatickom, či chronickom priebehu a u systémových ochorení