

Инфекција грлића материце бактеријом *Chlamydia trachomatis* код студенткиња – дијагностика класичним и молекуларним методама

Снежана Томановић¹, Иван Чукић², Марија Обрадовић², Нађа Ђурчић²,
Анђела Петровић-Милинковић², Слободанка Ђукић³

¹Клиника за гинекологију и акушерство, Клинички центар Србије, Београд, Србија;

²Завод за здравствену заштиту студената, Београд, Србија;

³Институт за микробиологију и имунологију, Медицински факултет, Универзитет у Београду, Београд, Србија

КРАТАК САДРЖАЈ

Увод *Chlamydia trachomatis* је најчешћи бактеријски узрочник полно преносивих инфекција. Могућност развоја тешких компликација ових инфекција може се спречити благовременим откривањем ове бактерије на грлићу материце применом осетљивих и поузданих тестова, као што су савремени молекуларни тестови.

Циљ рада Циљ истраживања је био да се испитају могућност и учесталост дијагностиковања инфекције грлића материце бактеријом *C. trachomatis* код студенткиња применом класичних и молекуларних метода.

Методе рада Постојање *C. trachomatis* у ендоцервикалном брису 69 студенткиња без симптома обољења доказано је применом три методе: директне имунофлуоресценције (*DIF*), хибридизације нуклеинске киселине (*hc2*) и реакције ланчаног умножавања нуклеинске киселине (*PCR*).

Резултати Методом *DIF* *C. trachomatis* је откривена код четири испитанице (5,80%), методом *hc2* код такође четири (5,80%), а применом *PCR* код шест студенткиња (8,70%). Упоредна анализа примене *DIF* с методом *PCR* показала је сензитивност од 46% и специфичност од 95%, упоредна анализа примене *DIF* с методом *hc2* показала је сензитивност од 62% и специфичност од 97%, док је упоредна анализа примене *hc2* с методом *PCR* показала сензитивност од 76% и специфичност од 100%.

Закључак Метода избора за дијагностиковање *C. trachomatis* на грлићу материце код младих особа без симптома обољења је *PCR*, савремена молекуларна метода.

Кључне речи: *Chlamydia trachomatis*; дијагностика; имунофлуоресценција; молекуларне методе

УВОД

Chlamydia trachomatis је најчешћи бактеријски узрочник полно преносивих инфекција [1]. Ова бактерија код жена у репродуктивном периоду изазива запаљењске промене на грлићу материце [2]. *C. trachomatis* углавном изазива инфекције код младих особа које су сексуално активне, које нису у браку и које су нижег социјалног статуса [3]. Инфекција прво захвата прелаз плочастослојевитог епитела у цилиндрични. У више од 50% случајева цервицитиса (неки аутори сматрају и до 70%) не јављају се симптоми обољења или су они веома благи. Због тога ова инфекција код великог броја жена остаје недијагностикована, што олакшава даље ширење инфекције [4].

Могућност развоја тешких компликација може се спречити благовременим откривањем ове бактерије на грлићу материце применом осетљивих и поузданих тестова, као што су савремени молекуларни тестови [5]. Данас се у рутинском раду највише користи техника директне имунофлуоресценције (енгл. *direct immunofluorescence* – *DIF*), чија

осетљивост умногоме зависи од исправно узетог узорка. Револуцију у дијагностиковању инфекција бактеријом *C. trachomatis* донело је увођење савремених тестова на молекуларном нивоу који откривају ДНК овог патогена [6]. Ови тестови откривају постојање нуклеинских киселина *C. trachomatis* у различитим клиничким узорцима, чак и онда када постоји мали број ћелија у узорку [7]. Највише коришћена метода умножавања нуклеинске киселине је *PCR* (енгл. *polymerase chain reaction*). Поред ове, користе се још неке, попут методе „хватања“ хибрида (енгл. *hybrid capture* – *hc*). То је *in vitro* тест хибридизације нуклеинске киселине који се заснива на појачању сигнала, а користи хемијско осветљавање микроплоче за квалитативно откривање ДНК *C. trachomatis* у узорку [8].

ЦИЉ РАДА

Циљ истраживања је био да се испитају могућност и учесталост дијагностиковања инфекције грлића материце бактеријом *C. tracho-*

Correspondence to:

Slobodanka ĐUKIĆ
Institut za mikrobiologiju
i imunologiju
Medicinski fakultet
Dr Subotića 1, 11000 Beograd
Srbija
bobadi@sezampro.rs

matis код студенткиња класичним и молекуларним методама уз поређење њихове осетљивости и специфичности.

МЕТОДЕ РАДА

Проспективном студијом, која је трајала од септембра 2008. до јануара 2009. године, обухваћено је 69 студенткиња узраста од 21 до 31 године. Све испитанице су упућене у гинеколошку амбуланту Студентске поликлинике ради колпоскопског прегледа грлића материце. Ниједна студенткиња није имала симптоме инфекције гениталног система.

Пре колпоскопског прегледа свакој испитаници узета су три ендоцервикална бриса према стандардним препорукама. Наиме, након апликације спекулума најпре је уклоњена слуз са грлића материце стерилним брисом, а затим је нови стерилни брис увлачен око 1 cm у ендоцервикални канал, ротиран неколико пута да би се покупило довољно ћелија, а затим извучен без додиривања зидова вагине. Први ендоцервикални брис је употребљен за прављење препарата за примену методе *DIF*. Други брис је, из оригиналног паковања *hc2 CT-ID* ДНК тест, након узимања стављен у оригиналну подлогу за транспорт. Трећи брис, из оригиналног паковања *Cobas AmpliCor CT test*, након узимања стављен је у *STM* оригиналну епрувету, снажно промућкан у течности 15 секунди, добро оцеђен о зидове епрувете и одбачен.

Постојање бактерије *C. trachomatis* у ендоцервикалном брису испитаница доказивано је трима методама: *DIF*, *hc2* и *PCR*. Метода *DIF* је рађена тестом *Chlamydia Direct IF (ID)* (*bioMérieux*, Француска). То је квалитативни тест за *in vitro* изоловање *C. trachomatis* у урогениталном узорку техником *DIF* помоћу моноклонских антитела на *MOMP* антиген ове бактерије. За методу *hc2* коришћен је тест *Hybrid Capture2 CT-ID* ДНК (*Qiagen*, Немачка). За методу *PCR* коришћен је тест *Cobas AmpliCor Chlamydia trachomatis* (*Roche Diagnostics*, Немачка). То је квалитативни тест за откривање ДНК *C. trachomatis* из клиничких узорака у условима *in vitro*, на основу амплификације нуклеинске киселине реакцијом њеног ланчаног умножавања.

Резултати истраживања су обрађени у статистичком пакету *SPSS 12.0*, описани методама дескриптивне статистике (аритметичка средина, стандардна девијација, распон) и поређени методама аналитичке статистике (Студентов *t*-тест, χ^2 -тест, Ман-Витнијев тест).

РЕЗУЛТАТИ

Истраживањем је обухваћено 69 студенткиња без симптома обољења које су упућене у гинеколошку амбуланту ради колпоскопског прегледа грлића материце. Методом *DIF* *C. trachomatis* је изолована код четири испитанице (5,80%), методом *hc2* код такође четири студенткиње (5,80%), применом *PCR* код шест испитаница (8,70%).

Упоредна анализа методе *DIF* с методом *PCR* показала је сензитивност од 46% и специфичност од 95% (Табеле 1 и 2). Упоредна анализа методе *DIF* с методом *hc2* показала је сензитивност од 62% и специфичност од 97% (Табеле 3 и 4). Упоредна анализа методе *hc2* с методом *PCR* показала је сензитивност од 76% и специфичност од 100% (Табеле 5 и 6).

ДИСКУСИЈА

C. trachomatis је стриктно интрацелуларна, Грам-негативна бактерија и најчешћи бактеријски узрочник полно преносивих болести која инфицира епителне ћелије човека. Од 18 серотипова овог патогена, из урогениталног система изоловано је 11: *D*, *Da*, *E*, *F*, *G*, *Ga*, *H*, *I*, *Ia*, *J* и *K* [9].

Хламидијалне инфекције се чешће јављају код жена него код мушкараца, с тенденцијом повећања инциденције у последњих десет година [10]. Преваленција хламидијалне инфекције међу сексуално активним девојкама узраста 16–19 година у Европи је 4,1–25% [3]. У популацији студенткиња без симптома обољења у Белгији Колиер (*Colliers*) и сарадници [11] су инфекцију грлића материце бактеријом *C. trachomatis* применом методе *PCR* дијагностиковали код 2,9% испитаница. Резултати нашег истраживања су показали да је ова инфекција заступљена код 5,80% студенткиња (дијагностиковано методом *DIF*), односно 8,70% (дијагно-

Табела 1. Упоредна анализа резултата добијених применом метода *DIF* и *PCR*

Table 1. Comparative analysis of results obtained by using *DIF* and *PCR*

<i>DIF</i>	<i>PCR</i>		
	Позитиван Positive	Негативан Negative	Укупно Total
Позитиван Positive	3	1	4
Негативан Negative	60	5	65
Укупно Total	63	6	69

Табела 2. Осетљивост и специфичност методе *DIF* у поређењу с методом *PCR*

Table 2. Sensitivity and specificity of *DIF* compared with *PCR*

Параметар Parameter	Вредност Value
Преваленција Prevalence	0.09
Сензитивност Sensitivity	0.46
Специфичност Specificity	0.95
Стварно позитивни True positive	0.25
Лажно позитивни False positive	0.94
Стварно негативни True negative	0.92
Лажно негативни False negative	0.08

Табела 3. Упоредна анализа резултата добијених методом *DIF* и тестом *hc2***Table 3.** Comparative analysis of results obtained by using *DIF* and *hc2* test

<i>DIF</i>	<i>hc2</i>		
	Позитиван Positive	Негативан Negative	Укупно Total
Позитиван Positive	3	1	4
Негативан Negative	62	3	65
Укупно Total	65	4	69

Табела 4. Осетљивост и специфичност методе *DIF* у поређењу с тестом *hc2***Table 4.** Sensitivity and specificity of *DIF* compared with *hc2* test

Параметар Parameter	Вредност Value
Преваленција Prevalence	0.06
Сензитивност Sensitivity	0.62
Специфичност Specificity	0.97
Стварно позитивни True positive	0.25
Лажно позитивни False positive	0.75
Стварно негативни True negative	0.95
Лажно негативни False negative	0.05

стиковано методом *PCR*). Добијени налази показују нешто мало већу учесталост хламидијалне инфекције у поређењу с резултатима белгијских аутора, али не одступају од резултата других истраживача који сличну учесталост приказују у групи младих девојака [11, 12].

Велики проценат асимптоматских инфекција и могућност тешких компликација повећавају значај благовременог дијагностиковања *C. trachomatis* на грлићу материце. Савремени молекуларни тестови засновани на умножавању нуклеинске киселине *C. trachomatis* пружају могућност откривања малог броја присутних бактерија. Због стабилности ДНК молекула, могуће је открити *C. trachomatis* и ако је дошло до губитка инфективности, због чега је сензитивност ових тестова већа него код култивисања [13]. С обзиром на то да се открива сегмент ДНК јединствен за ову бактерију, ови тестови показују високу специфичност.

У нашем истраживању су за доказивање *C. trachomatis* у ендоцервикалном брису коришћене методе *DIF*, *hc2* и *PCR*. Метода *DIF* је најчешће коришћена у већини лабораторија код нас за рутинску дијагностику инфекције грлића материце бактеријом *C. trachomatis*. Веома је лака и једноставна за извођење и даје могућност добијања резултата за 30 минута од времена узорковања бриса. С друге стране, захтева правилно узет узорак за анализу, са довољним бројем епителних ћелија. Квалитет ендоцервикалног бриса узет за откривање овог патогена знатно утиче на сензитивност употребљеног дијагностичког теста [14]. Метода *hc2* је молекуларна

Табела 5. Упоредна анализа резултата добијених тестом *hc2* и методом *PCR***Table 5.** Comparative analysis of results obtained by using *hc2* and *PCR*

<i>hc2</i>	<i>PCR</i>		
	Позитиван Positive	Негативан Negative	Укупно Total
Позитиван Positive	0	4	4
Негативан Negative	63	2	65
Укупно Total	63	6	69

Табела 6. Осетљивост и специфичност теста *hc2* у поређењу с методом *PCR***Table 6.** Sensitivity and specificity of *hc2* compared with *PCR*

Параметар Parameter	Вредност Value
Преваленција Prevalence	0.08
Сензитивност Sensitivity	0.76
Специфичност Specificity	1.00
Стварно позитивни True positive	1.00
Лажно позитивни False positive	0.00
Стварно негативни True negative	0.96
Лажно негативни False negative	0.31

метода на бази појачања сигнала. Овом методом се открива ДНК *C. trachomatis* тако што се одређени сегмент ДНК хибридује са РНК сондом, а затим тај ДНК/РНК хибрид бива „ухваћен“ антителима која су обележена фосфатазом. Дарвин (*Darwin*) и сарадници [15] су поредили специфичност и сензитивност *hc2* теста с културом ткива и доказали 93,8% сензитивности и 95,9% специфичности теста. Метода је полуаутоматизована и захтева обученост и спретност у извођењу. Молекуларни тестови на бази умножавања нуклеинске киселине су направили револуцију у дијагностици инфективних болести. *PCR* је широм света највише коришћен тест из ове групе тестова. Њиме се из узорака омогућава откривање пробирљивих и спорорастућих микроорганизама, као што су хламидије [16].

Арустамјан (*Arustamian*) [17] је поредио три методе за дијагностиковање инфекције са *C. trachomatis* – *DIF*, *PCR* и *ELISA* методу из ендоцервикалног бриса и узорка крви, и закључио да је *PCR* метода високе сензитивности (92%) и специфичности (95%). Хаџу (*Hadgu*) и Стернберг (*Sternberg*) [18] су указали на тешкоће у одређивању репродукцибилности различитих дијагностичких метода које се користе у откривању инфекција бактеријом *C. trachomatis*. Прави „златни стандард“ за дијагностику ове инфекције у ствари не постоји. Процена параметара добијених тестовима перформанси при изостанку златног стандарда је тешко. Зато су предложени статистички модели којима се осетљивост и специфичност једне дијагностичке

методе може испитати у поређењу с неком другом. Наведени статистички модели су коришћени у обради добијених резултата и у нашем раду.

Центри за контролу болести у Атланти (*Centers for Disease Control and Prevention – CDC*) препоручују тестирање на *C. trachomatis* свих жена с мукопурулентним цервицитисом и свих девојака млађих од 20 година. Такође се саветује тестирање жена старости 20–23 године које имају новог сексуалног партнера или више од једног партнера месечно. Велики број асимптоматских инфекција и могућност настанка тешких компликација намећу питање неопходности програма систематског прегледа [19]. Подизање нивоа знања и обавештености о озбиљности могућих компликација хламидијалне инфекције повећава интересовање за ове програме [20].

ЛИТЕРАТУРА

- Morris SR, Bauer HM, Chartier M, Howard H, Watson S, Yokotobi J, et al. Relative efficiency of chlamydia screening in non-clinical settings in two California countries. *Int J STD AIDS*. 2010; 21(1):52-6.
- Stamm WE. *Chlamydia* screening: expanding the scope. *Ann Intern Med*. 2004; 141:570-2.
- Kučinskienė V, Šutaitė I, Valiukevičienė S, Milašauskienė Ž, Domeika M. Prevalence and risk factors of genital *Chlamydia trachomatis* infection. *Medicina (Kaunas)*. 2006; 42(10):885-94.
- Dean D. *Chlamydia trachomatis* today: treatment, detection, immunogenetics and the need for a greater global understanding of chlamydial disease pathogenesis. *Drugs*. 2009; 45:25-31.
- Manavi K. A review on infection with *Chlamydia trachomatis*. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2006; 20:941-51.
- Spiliopoulou A, Lakiotis V, Vittoraki A, Zavou D, Mauri D. *Chlamydia trachomatis*: time for screening? *Clin Microbiol Infect*. 2005; 11:687-9.
- Ostergaard L. Microbiological aspects of the diagnosis of *Chlamydia trachomatis*. *Best Pract Res Clin Obstet Gynecol*. 2002; 16(6):789-99.
- Van Dyck E, Ieven M, Pattyn S, Van Damme L, Laga M. Detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* by enzyme immuno-assay, culture, and tree nucleic acid amplification tests. *J Clin Microbiol*. 2001; 39:1751-6.
- Morre SA, Rozendaal L, van Valkengoed IGM, Boeke AJ, van Voorst Vader PC, Schirm J, et al. Urogenital *Chlamydia trachomatis* serovars in men and women with a symptomatic or asymptomatic infection: an association with clinical manifestations? *J Clin Microbiol*. 2000; 38:2292-6.
- Da Ros CT, Schmitt CS. Global epidemiology of sexually transmitted diseases. *Asian J Androl*. 2008; 10:110-4.
- Colliers A, Verster A, Van Puyenbroeck K, Stalpaert M, Van Royen P, Verhoeven V. Screening Belgian university students for *Chlamydia trachomatis* infection: a feasibility study. *Int J Adolesc Med Health*. 2009; 21(3):343-6.
- Aldeen T, Jacobs J, Powell R. Screening university students for genital chlamydial infection: another lesson to learn. *Sex Health*. 2010; 7(4):491-4.
- Miller KE. Diagnosis and treatment of *Chlamydia trachomatis* infection. *Am Fam Physician*. 2006; 73:1411-6.
- Welsh LE, Quinn TC, Gaydos CA. Influence of the endocervical specimen adequacy on PCR and direct fluorescent-antibody staining for detection of *Chlamydia trachomatis* infections. *J Clin Microbiol*. 1997; 35(12):3078-81.
- Darwin LH, Cullen AP, Arthur PM, Long CD, Smith KR, Girdner JL, et al. Comparison of Digene hybrid capture 2 and conventional culture for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in cervical specimens. *J Clin Microbiol*. 2002; 40(2):641-4.
- Louie M, Louie L, Simor AE. The role of DNA amplification technology in the diagnosis of infectious diseases. *CMAJ*. 2000; 163(3):301-9.
- Arustamian KK. Comparative analysis of methods for diagnostics of chlamydial infection in women of reproductive age. *Georgian Med News*. 2006; 139:73-5.
- Hadgu A, Sternberg M. Reproducibility and specificity concerns associated with nucleic acid amplification tests for detecting *Chlamydia trachomatis*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2009; 28:9-15.
- Fenton KA, LaMontagne DS, Randall S. National screening programme for *Chlamydia* exists in England. *BMJ*. 2004; 329(7458):172.
- Pavlin NL, Gunn JM, Parker R, Fairley CK, Hocking J. Implementing *Chlamydia* screening: what do women think? A systematic review of the literature. *BMC Public Health*. 2006; 6:221.

ЗАКЉУЧАК

Испитивањем учесталости и могућности дијагностиковања инфекције грлића материце бактеријом *C. trachomatis* код студенткиња класичним и молекуларним методама утврђено је да је метода избора за дијагностику овог патогена на грлићу материце младих жена без симптома обољења *PCR*, која има највећу осетљивост и специфичност у поређењу с техником *DIF* и методом хибридизације нуклеинске киселине. Благовремено дијагностиковање ове инфекције веома је важно у млађим узрасним групама због високог процента асимптоматских инфекција и могућности развоја тешких компликација које се могу одразити на репродуктивну моћ жене.

The Diagnosis of *Chlamydia trachomatis* Cervical Infection among Students by Using Classical and Molecular Methods

Snežana Tomanović¹, Ivan Čukić², Marija Obradović², Nadja Ćurčić², Andjela Petrović-Milinković², Slobodanka Djukić³

¹Clinic of Gynecology and Obstetrics, Clinical Center of Serbia, Belgrade, Serbia;

²Institute of Student Health Care, Belgrade, Serbia;

³Institute of Microbiology and Immunology, School of Medicine, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

SUMMARY

Introduction *Chlamydia trachomatis* is the most common cause of sexually transmitted disease. The possibility of serious complications may be prevented by early detection of the bacteria on the uterine cervix by the application of sensitive and reliable tests such as up-to-date molecular tests.

Objective The aim of the study was the comparison of sensitivity and specificity of three different methods in the diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infection.

Methods The study included 69 female students referred to the gynecological outpatient unit at the Students' Polyclinic for colposcopic examination of the uterine cervix. Cervical *Chlamydia trachomatis* was diagnosed by using three different methods: direct immunofluorescence (DIF), nucleic acid hybridization assay (hc2), and polymerase chain reaction (PCR).

Results By using DIF *Chlamydia trachomatis* was identified in four students (5.80%), by using hc2 also in four (5.80%), while by using PCR test in six students (8.70%). Comparative analysis of the obtained results evidenced sensitivity and specificity rates of DIF in comparison to PCR method of 46% and 95%, respectively. Sensitivity and specificity of DIF method in comparison to hc2 was 62% and 97%. Sensitivity and specificity of hc2 method in comparison to PCR was 76% and 100%.

Conclusion Contemporary molecular methods, such as PCR, are methods of choice for the identification of endocervical *Chlamydia trachomatis* in the population of university students without symptoms of the disease.

Keywords: *Chlamydia trachomatis*; diagnosis; immunofluorescence; molecular methods

Примљен • Received: 27/07/2011

Ревизија • Revision: 21/01/2013

Прихваћен • Accepted: 04/02/2013