

Zgodność wyników badań w kierunku *Chlamydia trachomatis* metodą immunofluorescencji bezpośredniej, ELISA i PCR z uwzględnieniem ich czułości i swoistości, u pacjentów z NGU

The consistency of tests results for *Chlamydia trachomatis* carried out by direct immunofluorescence test, ELISA and PCR including their sensitivity and specificity in patients with NGU

STRESZCZENIE

Wstęp. Analizę zgodności wyników badań w kierunku *Chlamydia trachomatis* (Ct) wykonano trzema metodami: techniką immunofluorescencji bezpośredniej (IF), *nested*-PCR oraz metodą immunoenzymatyczną.

Materiał i metody. Grupę badaną stanowili pacjenci hospitalizowani na Oddziale Nefrologii Pediatricznej oraz z przychodni MicroFAM (n = 61) w wieku 3–76 lat. Przedmiotem badań były wymazy z cewki moczowej, surowica krwi oraz moczu. Antygen Ct wykrywano techniką IF. Do wykrywania genu *crp* użyto techniki *nested*-PCR. Obecność swoistych przeciwciał anty-cHSP60 zbadano metodą ELISA.

Wyniki. Analiza wyników badań w kierunku Ct otrzymanych trzema wymienionymi metodami wykazała zgodność w 62,3%. Swoiste przeciwciała anty-cHSP60 w surowicy krwi metodą ELISA wykrywano równie często jak obecność antygenu Ct metodą IF (16,4%). Nieco rzadziej wykrywano obecność genu *crp* w moczu techniką *nested*-PCR (14,8%).

Wnioski. Biorąc pod uwagę czułość i swoistość trzech zastosowanych testów oraz aspekt ekonomiczny, wskazane jest wykonywanie badań w kierunku Ct testem IF z uwagi na prostotę wykonania i niższy koszt badania.

Forum Medycyny Rodzinnej 2016, tom 10, nr 2, 91–94

słowa kluczowe: diagnostyka, wymazy z cewki, *nested*-PCR

Irena Choroszy-Król,
Magdalena Frej-Mądrzak,
Anna Trojgo, Agnieszka
Jama-Kmieciak, Dorota Teryks-
-Wołyniec, Jolanta Sarowska

Zakład Nauk Podstawowych
WNOZ Uniwersytetu Medycznego
we Wrocławiu

Adres do korespondencji:
prof. dr hab. n. med. Irena Choroszy-Król
Zakład Nauk Podstawowych
ul. Chalubińskiego 4, 50–368 Wrocław
tel.: (071) 784–00–76
e-mail: irena.choroszy-krol@umed.wroc.pl

Copyright © 2016 Via Medica
ISSN 1897–3590

ABSTRACT

Background. The analysis of consistency of research results for *Ct* conducted by three diagnostic methods: direct immunofluorescence, nested PCR and immunoenzymatic technique.

Material and methods. Studied group — patients hospitalized at the Department and Clinic of Paediatric Nephrology and patients from outpatient clinic MicroFAM (n = 61) aged 3–76. Material for research were urethral swabs, serum and urine. *Ct* antigen was detected using direct immunofluorescence method, *C. trachomatis crp* gene was found by nested PCR technique. Specific anti-cHSP60 antibodies were detected using ELISA method.

Results. The analysis of the results of research for *Ct* conducted by three diagnostic methods showed the compatibility in 62,3%. Specific anti-cHSP60 antibodies were detected in serum by ELISA method as often as *Ct* antigen by IF (16,4%). Less often *Ct crp* gene was found in urine by nested-PCR technique (14,8%).

Conclusions. Considering the sensitivity and specificity of three tests and economic aspect, it's advisable to perform the studies for *Ct* by IF method due to simplicity of performance and lower cost of the study.

Forum Medycyny Rodzinnej 2016, vol 10, no 2, 91–94

key words: diagnosis, urethral swabs, nested-PCR

WSTĘP

Do nowoczesnych metod diagnostyki *Ct* zalicza się techniki amplifikacji kwasów nukleinowych, w tym polimerazową reakcję łańcuchową (PCR, *polymerase chain reaction*) i ligazową reakcję łańcuchową (LCR, *ligase chain reaction*) [1–3]. Techniki te, jakkolwiek wysoce czułe i swoiste, wymagają drogiego zestawu aparatury i odczynników do badań, dlatego też mogą być stosowane tylko w nielicznych laboratoriach. Celem pracy była ocena zgodności wyników badań w kierunku *Ct* przy zastosowaniu wyżej wymienionych metod, ze szczególnym uwzględnieniem ich czułości i swoistości.

MATERIAŁ I METODY

Badaniom w kierunku zakażenia *Ct* poddano 61 pacjentów, w tym 36 mężczyzn i 19 kobiet w wieku 18–76 lat, a także 6 dzieci w wieku 3–17 lat. Materiałem do badań były wymazy z cewki moczowej, mocz oraz surowica krwi pochodzące od pacjentów Oddziału Nefrologii Pediatrycznej oraz Przychodni MicroFam z objawami stanów zapalnych cewki moczowej. Wymazy z cewki moczowej pobierano

przy użyciu sterylnych, jednorazowych, bawełnianych wymazówek. Mocz pobrano rano, bez zastosowania higieny osobistej, w ilości około 10 ml do jałowego pojemnika. W badaniach własnych użyto metodę IF (test Pathfinder® *Chlamydia trachomatis* Direct Specimen firmy BioRad) do wykrywania antygenu wymienionych bakterii [4]. Metodą *nested-PCR* (test PCR — *Chlamydia trachomatis* firmy DNA Gdańsk), wykrywano gen *crp* [5], natomiast metodą ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) stwierdzano obecność przeciwciał anti-cHSP60 (test ELISA firmy Medac) [6]. Wszystkie badania wykonano zgodnie z instrukcją producentów.

WYNIKI

Zgodność wyników uzyskanych 3 metodami diagnostycznymi przedstawiono w tabeli 1, z której wynika, że u 38/61 (62,3%) badanych uzyskano wyniki zgodne. U jednego pacjenta wynik dodatni uzyskano wszystkimi metodami, co stanowi 1,6%, u pozostałych pacjentów (60,7%) uzyskano wyniki ujemne. Wyniki niezgodne stwierdzono u 23/61 pacjentów, co stanowi 37,7%. U 2/19 kobiet (10,5%)

Tabela 1

Zgodność wyników uzyskanych trzema metodami diagnostycznymi (DIF, ELISA, PCR)

Płeć	Liczba badanych	Zgodnie dodatni (IF+, ELISA+, PCR+)		Zgodnie ujemny (IF-, ELISA-, PCR-)	
		Liczba	(%)	Liczba	(%)
Kobiety	19	0	0,0	13	68,4
Mężczyźni	36	1	2,8	19	52,8
Dzieci	6	0	0,0	5	83,3
Ogółem	61	1	1,6	37	60,7

otrzymano wynik dodatni wyłącznie metodą ELISA, a u 3/19 kobiet (15,8%) wynik dodatni uzyskano tylko techniką *nested*-PCR. Z kolei u 7/36 mężczyzn (19,4%) uzyskano wynik dodatni jedynie metodą IF, u 6/36 mężczyzn (16,7%) wynik dodatni jedynie metodą ELISA, a u 3/36 mężczyzn (8,3%) wynik dodatni tylko techniką *nested*-PCR. U jednego mężczyzny (2,8%) otrzymano wynik dodatni dwoma wymienionymi metodami. W grupie dzieci wynik dodatni uzyskano tylko u jednej dziewczynki (16,7%), dwiema metodami — IF oraz techniką *nested*-PCR (tab. 2). Porównując czułość i swoistość metody ELISA oraz techniki *nested*-PCR z metodą IF, stwierdzono, że obie metody mają wysoką swoistość (odpowiednio: ELISA — 84,3%, *nested*-PCR — 88,2%) oraz bardzo niską czułość (ELISA — 10,0%, *nested*-PCR — 30,0%) (tab. 2, 3).

DYSKUSJA

W badaniach własnych porównano częstość występowania antygeny *Ct*, genu *crp* oraz

Tabela 3

Porównanie czułości i swoistości metody immunoenzymatycznej (ELISA) z metodą immunofluorescencji bezpośredniej (DIF)

		DIF	
		+	-
ELISA (IgG anty-cHSP60)	+	1	8
	-	9	43

Czułość: 1/10 = 10,0%

Swoistość: 43/51 = 84,3%

Tabela 4

Porównanie czułości i swoistości metody *nested*-PCR z metodą immunofluorescencji bezpośredniej (DIF)

		DIF	
		+	-
<i>nested</i> -PCR	+	3	6
	-	7	45

Czułość: 3/10 = 30,0%

Swoistość: 45/51 = 88,2%

Tabela 2

Niezgodność wyników w kierunku *Chlamydia trachomatis* uzyskanych wszystkimi metodami diagnostycznymi (DIF, ELISA, PCR)

Płeć	Liczba badanych	Wyniki					
		IF+ ELISA- (IgG anty-cHSP60) PCR-	IF+ ELISA+ (IgG anty-cHSP60) PCR-	IF+ ELISA- (IgG anty-cHSP60) PCR+	IF- ELISA+ (IgG anty-cHSP60) PCR-	IF- ELISA- (IgG anty-cHSP60) PCR+	IF- ELISA+ (IgG anty-cHSP60) PCR+
Kobiety	19	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	2 (10,5%)	3 (15,8%)	0 (0,0%)
Mężczyźni	36	7 (19,4%)	0 (0,0%)	1 (2,8%)	6 (16,7%)	3 (8,3%)	0 (0,0%)
Dzieci	6	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (16,7%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
Ogółem	61	7 (11,5%)	0 (0,0%)	2 (3,3%)	8 (13,1%)	6 (9,8%)	0 (0,0%)

przeciwciał anty-cHSP60 u pacjentów z NGU. Od 61 pacjentów, w tym 36 mężczyzn, 19 kobiet oraz 6 dzieci, pobrano wymaz z cewki moczowej, moczu oraz surowicę krwi. U 25,0% mężczyzn oraz 16,7% dzieci wykryto antygen *Ct* w wymazach z cewki moczowej metodą IF-bezpośredniej. U kobiet nie wykryto antygeny *Ct* w wymazach z cewki moczowej. Swoiste przeciwciała anty-cHSP60 stwierdzono w surowicy krwi 22,2% mężczyzn oraz 10,5% kobiet. U dzieci nie stwierdzono obecności przeciwciał anty-cHSP60 w surowicy krwi. Do wykrywania przeciwciał anty-cHSP60 zastosowano test ELISA. Technika *nested*-PCR wykryło gen *crp* w moczu u 13,9% mężczyzn, u 15,8% kobiet oraz u 16,7% dzieci. W badaniach własnych nie stwierdzono zgodności wykrywania przeciwciał anty-cHSP60 w surowicy krwi, z obecnością genu *crp* w moczu u pacjentów z NGU. Zaobserwowano stosunkowo niską czułość porównywanych metod diagnostycznych przy

jednoczesnej dobrej swoistości. Przyczyną tak niskiej czułości obu wymienionych metod może być brak standaryzacji obu metod diagnostycznych oraz używanie przez firmy produkujące odczynniki do techniki PCR różnych primerów. Natomiast niska czułość techniki ELISA może wynikać z użycia LPS jako antygeny do identyfikacji przeciwciał, który może reagować krzyżowo z antygenami innych drobnoustrojów, dając niemiarodajne wyniki [7].

WNIOSKI

1. Metoda ELISA, charakteryzująca się bardzo niską czułością, nie może być stosowana jako metoda diagnostyczna w kierunku rozpoznania NGU o etiologii chlamydialnej.
2. Biorąc pod uwagę czułość i swoistość trzech zastosowanych testów oraz aspekt ekonomiczny, wskazane jest wykonywanie badań w kierunku *Ct* testem IF z uwagi na prostotę wykonania i niższy koszt badania.

PIŚMIENICTWO

1. Frej-Mądrzak M., Teryks-Wołyniec D., Elias M., Choroszy-Król I. Znaczenie diagnostyczne wykrywania genu *crp Chlamydia trachomatis* oraz przeciwciał anty-cHSP60 u nieplodnych kobiet. *Fam. Med. Prim. Care Rev.* 2010; 12: 176–178.
2. Hjelholt A., Christiansen G., Johannesson T.G. i wsp. Tubal factor infertility is associated with antibodies against *Chlamydia trachomatis* heat shock protein 60 (HSP60) but not human HSP60. *Hum. Reprod.* 2011; 26: 2069–2076.
3. Choroszy-Król I., Ruczkowska J. *Laboratoryjna diagnostyka chlamydioz*. Wydawnictwo AM, Wrocław 2004.
4. Direct Antigen Detection System for the Identification of *Chlamydia trachomatis* in Direct Specimens. BioRad Pathfinder® *Chlamydia trachomatis* Direct Specimen. 2003.
5. Zestaw diagnostyczny PCR — *Chlamydia trachomatis* do wykrywania *Chlamydia trachomatis* w moczu lub w kulturach komórkowych. DNA — Gdańsk II s.c.
6. cHSP60-IgG-ELISA medac. Recombinant enzyme immunoassay for the quantitative detection of IgG antibodies to chlamydial heat shock protein 60. Medac 2008.
7. Choroszy-Król I., Frej-Mądrzak M., Teryks-Wołyniec D. Zakażenia układu moczowo-płciowego wywołane przez *Chlamydia trachomatis* w praktyce lekarza rodzinnego. *Fam. Med. Prim. Care Rev.* 2011; 13: 292–295.