



Laboratorní diagnostika chlamydiových infekcí

MUDr. Hana Zelená

Virologické oddělení

Centrum klinických laboratoří

Zdravotní ústav se sídlem v Ostravě

Taxonomie – Čeďed'

Chlamydiaceae

Rod: Chlamydia

- *C. trachomatis*
 - sérotypy A,B,C – trachom
 - sérotypy L1-3 – lymfograneluloma venereum
 - sérotypy D-K – urogenitální, oční a neonatální infekce
- *C. muridarium*
- *C. suis*

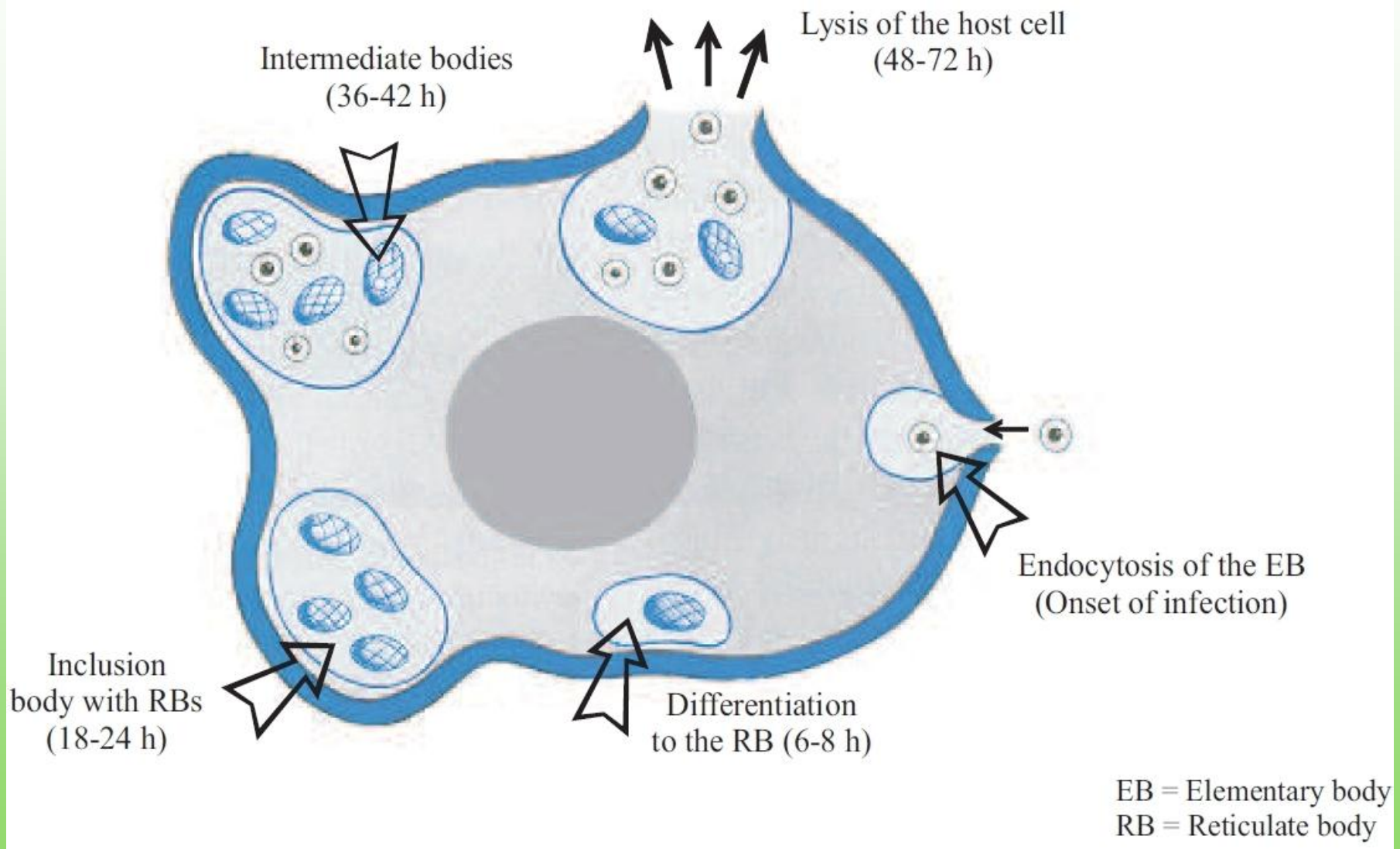
Rod: Chlamydophila

- *C. pneumoniae*
- *C. psittaci*
- *C. pecorum*
- *C. felis*
- *C. abortus*

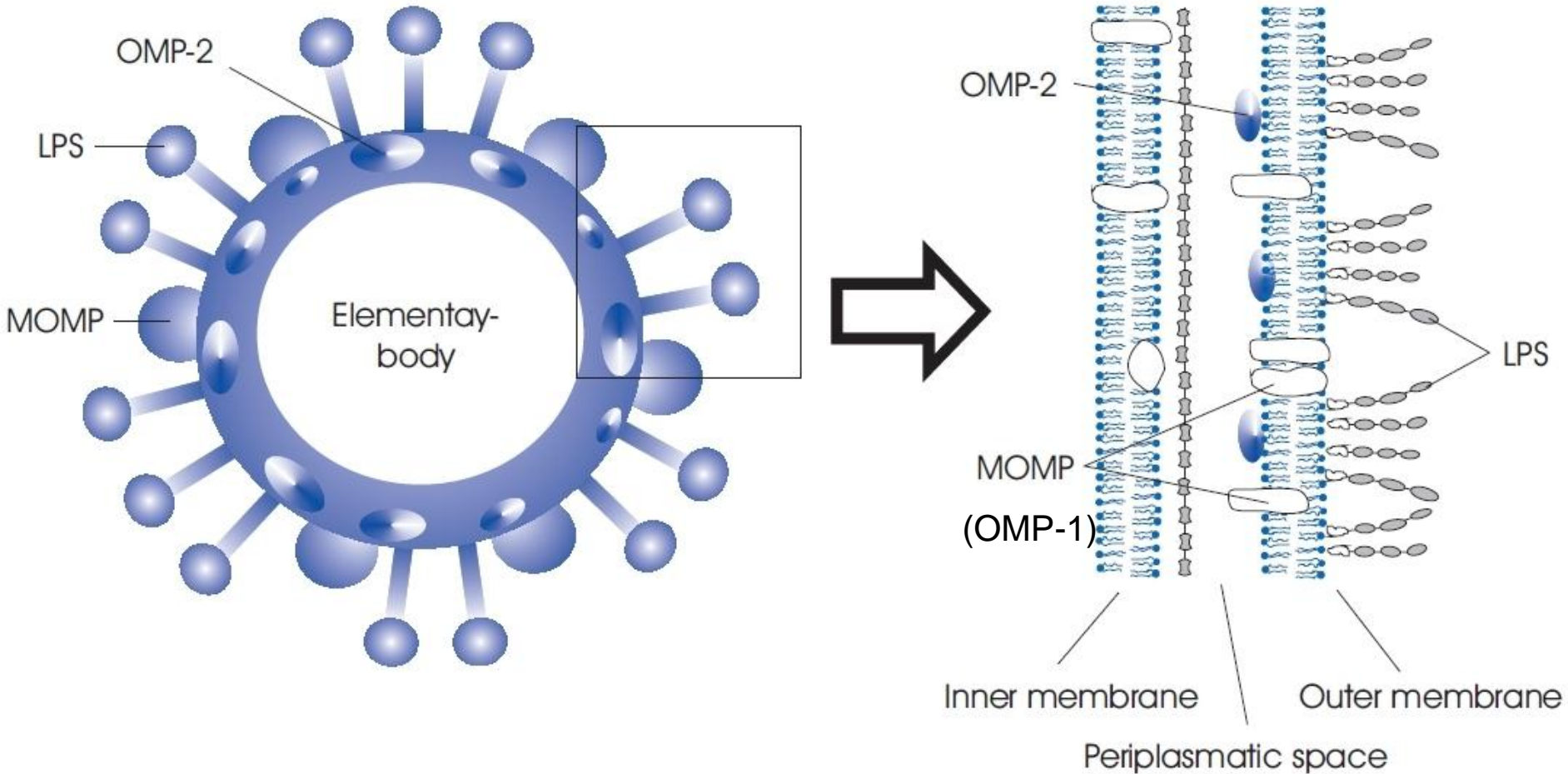
Základní vlastnosti chlamydií

- malé G- bakterie s nekompletní buněčnou stěnou
- intracelulární parazité, nemají vlastní systém pro syntézu ATP
- kultivace je možná jen na tkáňových kulturách nebo kuřecích embryích; nerostou na bakteriologických půdách
- citlivé na ATB
- reprodukční cyklus trvá 2-3 dny, probíhá uvnitř buňky, střídání 2 forem „života“:
 - metabolicky neaktivních **elementárních tělísek (EB)** – 300 nm
 - infekční částice – extracelulární
 - metabolicky aktivních **retikulárních tělísek (RB)** – 1000 nm – intracelulární
 - za určitých podmínek přetrvávají v buňkách dlouhodobě v tzv. dormantní fázi (**kryptická tělíska**)

Životní cyklus chlamydie



Buněčná stěna chlamydie



Antigenní výbava chlamydií

- **LPS**
 - společný pro všechny chlamydie – nespecifický
 - **rodově specifické** protilátky (EIA)
 - nastupují jako první (**5.-10. den**) – **akutní infekce**
- **komplex membránových proteinů (MOMP=OMP1, OMP2)**
 - **druhově specifické**
 - protilátky prokazovány metodou EIA i WB
 - protilátky **za 3-8 týdnů** po nákaze
- **proteiny tepelného šoku HSP-60, HSP-70**
 - produkce při poškození buněk během **chronické** infekce
 - protilátky prokazovány metodou **WB**
 - HSP lidského i bakteriálního původu – spuštění autoimunitního děje?
- **další specifické antigeny** (prokazovány metodou WB)
 - *C. trachomatis* 57kD
 - *C. pneumoniae* 54kD, 35kD

Chlamydiové infekce

lokalizované na slizniční epitel

- **C. trachomatis**

- **a) akutní**

- urethritis
- cervicitis
- inkluzní konjunktivitida
- infekce novorozence

- **b) chronické**

- pelvic inflammatory disease (PID)
- tubární sterilita
- mimoděložní těhotenství
- prostatitis, epididymitis, orchitis

- **C. pneumoniae**

- **a) akutní**

- pharyngitis
- sinusitis, otitis media
- bronchitis acuta
- komunitní atypická pneumonie

- **b) chronické**

- chron. zánět průdušek
- exacerbace AB
- zhoršení cyst. fibrózy

Chlamydiové infekce systémové – chronické a perzistující

C. trachomatis

- reaktivní artritida
- Reiterův syndrom

C. pneumoniae

- arterioskleróza
- onemocnění koronárních tepen

Podíl v patogenezi spekulativní:

- *myokarditis*
- *perikarditis*
- *arteriitidy*
- *roztroušená skleróza*
- *Alzheimerova demence*
- *obezita*
- *glaukom*
- *autoimunitní choroby*
- *řada dalších chorobných stavů...*

Několik poznámek k patogenezi chronických chlamydiových infekcí

- Průběh chlamydiové infekce je dán **individuální reaktivitou imunitního systému** – kombinace genetické dispozice a aktuálního stavu jedince.
 - Prokázána souvislost HLA-B27 s reaktivní artritidou.
- **Riziková antigenní výbava chlamydií**
 - **HSP** – prozánětlivé molekuly - disponující ke vzniku zkřížené reakce proti vlastním podobným proteinům
 - **LPS** – prozánětlivé aktivátory lymfocytů a makrofágů
- Chronicky infikované buňky produkují velké množství **prozánětlivých cytokinů** → chronický fibroproduktivní zánět
- Chlamydie **v monocytech** → systémové rozšíření mimo původní cílové tkáně (endotel cév, kloubní výstelka, CNS).
- **C. trachomatis** – imunopatologický proces relativně dobře definován
- **C. pneumoniae** – intenzivní seriózní výzkum i nejrůznější spekulace

Diagnostika

1. Přímý průkaz

- kultivace na TK
- průkaz antigenu (IF, ELISA, ELFA)
- molekulárně biologické metody – průkaz DNA

Přímá diagnostika je přínosná zejména při **akutních infekcích** při vyšetření materiálu odebraného přímo **z místa probíhající infekce**.

2. Nepřímý průkaz

- MIF
 - protilátky proti MOMP
- ELISA
 - protilátky proti LPS (rodově specifické)
 - protilátky proti MOMP (druhově specifické)
- WESTERN BLOT
 - protilátky proti jednotlivým antigenům (LPS, MOMP, HSP,...)

Průkaz DNA *C. trachomatis* metodou Hybrid Capture II

- Průkaz DNA hybridizační sondou, amplifikace signálu, chemiluminiscenční detekce.
- Klinický materiál: výtěr z cervixu, uretry nebo ze spojivkového vaku do speciálních odběrových souprav.
- Důležitý je správný odběr materiálu – musí obsahovat buňky (epitelie).
- Vysoká citlivost i specificita.

Průkaz DNA *C. trachomatis* a *C. pneumoniae* metodou PCR

- Amplifikační metoda – průkaz DNA.
- Lze vyšetřit různý biologický materiál – nativní materiál nebo stěr suchým dakronovým tamponem.
 - *C. trachomatis*: výtěr z cervixu, uretry, oka, moč, sperma, punktáty
 - *C. pneumoniae*: BAL, sputum, tracheální aspirát, bronchiální sekret, pleurální výpotek
- Vysoká citlivost, riziko inhibice.
- „Falešná negativita“ při nesprávném odběru materiálu.



Průkaz protilátek metodou ELISA

- Materiál srážlivá krev.
- Přínos u akutních i chronických stavů.
- **Protilátky proti LPS (rodově specifické)** ve třídách IgG, IgM, IgA
 - objevují se jako první (5. – 10. den po nákaze), postupně vymizí
 - průkaz akutní infekce
- **Protilátky proti MOMP (druhově specifické)** ve třídách IgG, IgM, IgA – *C. trachomatis*, *pneumoniae*, *psittaci*
 - za 3 až 8 týdnů po nákaze, přetrvávají týdny až měsíce

Interpretace výsledků druhově specifických protilátek

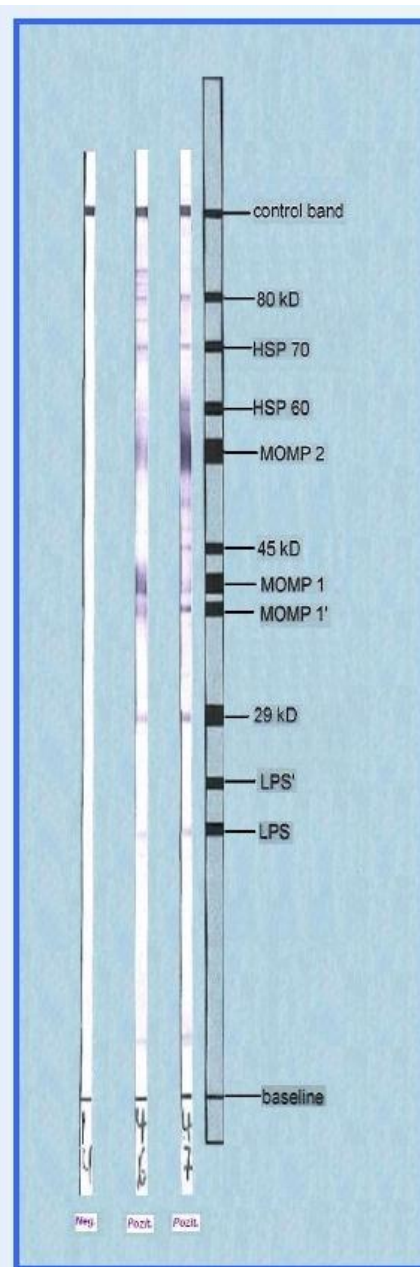
- Interpretace je obtížná, mnohdy nejednoznačná a výsledky zdánlivě diskrepantní.
- **Vždy je prioritní klinický stav, hodnocení se zřetelem na ostatní výsledky laboratorních vyšetření.**

IgG	IgA	IgM	hodnocení	doporučení
neg.	neg.	neg.	Negativní nález, může jít o časnou fázi infekce (pozit. a-LPS).	Kontrolní odběr s odstupem 2-4 týdny.
pozit.	neg.	neg.	Pravděp. anamnestické protilátky po dříve prodělané infekci.	
neg.	neg. / pozit.	pozit.	Možná počínající infekce nebo nespecifická reakce.	Kontrolní odběr s odstupem 2-4 týdny.
pozit.	neg.	pozit.	Pravděpodobně primoinfekce (nebo stav po primoinfekci).	
pozit.	pozit.	neg.	Reinfekce, reaktivace nebo chronická infekce. Stav po proběhlé infekci.	Pro potvrzení chronické infekce opakované vyšetření za 3-6 měsíců, vždy v kontextu s klinickými příznaky .
pozit.	pozit.	pozit.	Probíhající infekce. Stav po proběhlé infekci.	V případě přetrvávání klinických příznaků kontrolní odběr za 3-6 měsíců.

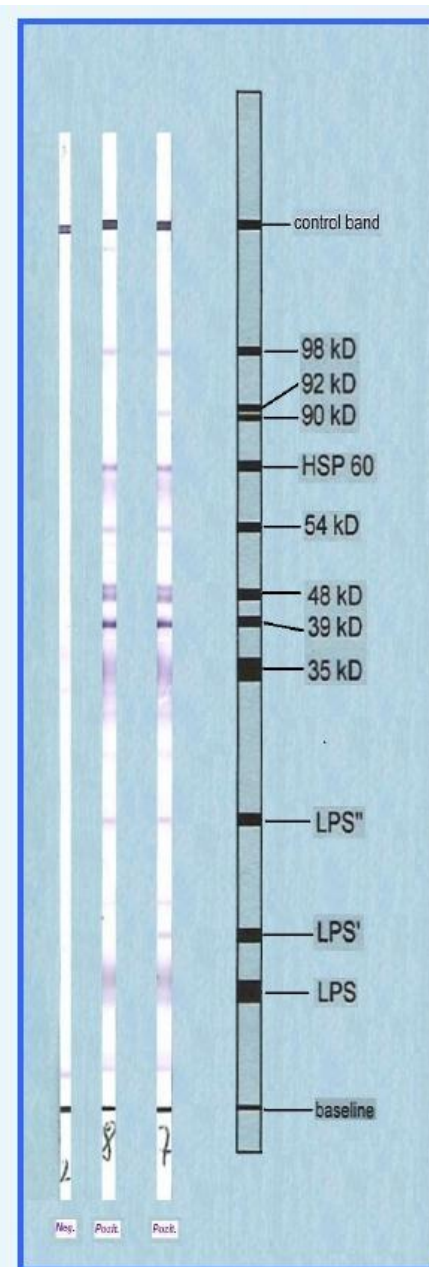
Průkaz protilátek metodou Western Blot

- Průkaz protilátek **IgG** a **IgA** *C. trachomatis* a *C. pneumoniae*.
- Význam zejména u **chronických infekcí**.
- Determinace jednotlivých antigenů, proti kterým jsou zaměřeny pacientovy protilátky.
- Antigeny rozděleny elektroforeticky dle molekulové hmotnosti na nitrocelulózových proužcích.
- Odečtení pomocí skeneru a objektivní vyhodnocení za použití software.

Western Blot - proužky

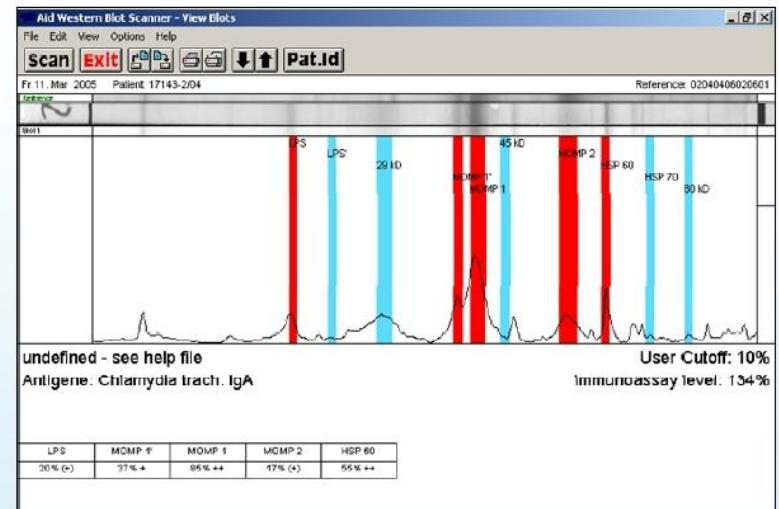
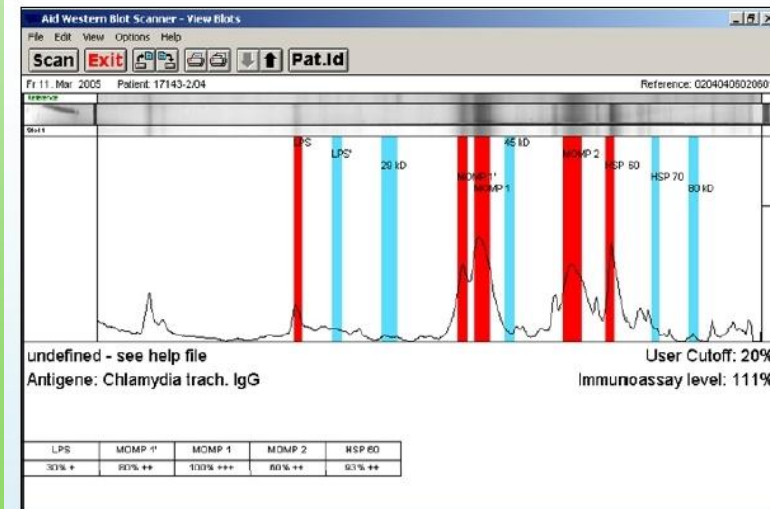
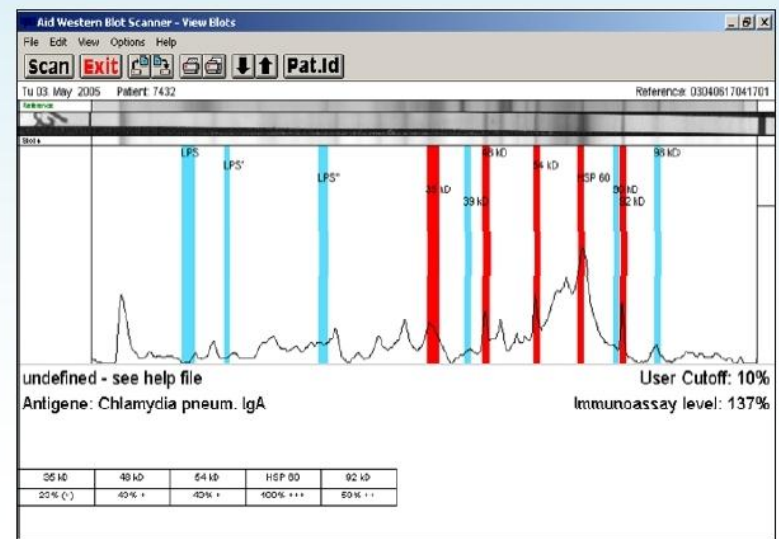
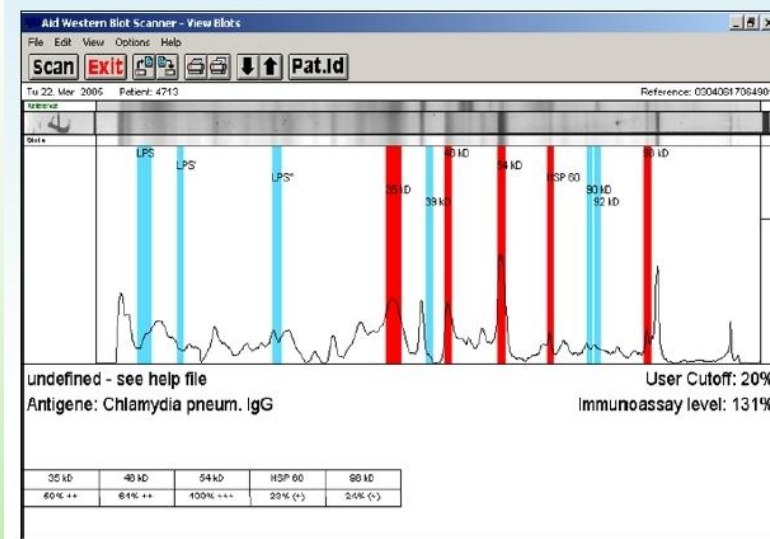


Obr. 1: *C. trachomatis*, příklad negativního a pozitivního výsledku



Obr. 2: *C. pneumoniae*, příklad negativního a pozitivního výsledku

Western Blot – objektivní vyhodnocení scannerem



Western blot - vyhodnocení

- kritéria positivity definována výrobcem pro každý parametr
- vždy musí být pozitivní specifický proužek anti-MOMP

- Pouze IgG: anamnestické protilátky.
- IgG + IgA: reinfekce, reaktivace nebo chronická infekce, nebo stav po proběhlé infekci

- význam jednotlivých antigenů:
 - HSP60 – ukazatel chronické infekce
 - antigen *C. trachomatis* 57 kD – souvisí s reaktivní artritidou
 - antigeny *C. pneumoniae* 54 kD, 35 kD - zvýšené riziko arteriosklerózy

Zásady terapie chlamydiových infekcí

- **Neléčíme protilátky, léčíme pacienta.**
- V terapeutické strategii vždy rozhoduje klinický stav.
- Účinné: **Makrolidy, azalidy, tetracykliny, fluorochinolony**, v kombinacích **nitroimidazoly** (Metronidazol), **rifampicin**.
- **Telefonická konzultace s lékařem** laboratoře týkající se interpretace výsledků konkrétního pacienta a návrhu dalšího diagnostického a terapeutického postupu.



Děkuji Vám za pozornost.