

## DIJAGNOZA HLAMIDIJALNE INFEKCIJE

Jelena Tošić-Pajić<sup>1</sup>, Dejan Baskić<sup>2</sup>, Dragan R. Milovanović<sup>3</sup>, Violeta Ninković<sup>4</sup>, Jelena Čukić<sup>4</sup>, Predrag Sazdanović<sup>5</sup>, Marija Šorak<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu, Kragujevac

<sup>2</sup>Fakultet medicinskih nauka, Centar za molekulska medicinu i istraživanje matičnih ćelija, Univerzitet u Kragujevcu, Kragujevac

<sup>3</sup>Fakultet medicinskih nauka, Farmakologija i toksikologija, Univerzitet u Kragujevcu, Kragujevac

<sup>4</sup>Institut za javno zdravlje Kragujevac, Kragujevac

<sup>5</sup>Klinički centar Kragujevac, Ginekološko-akušerska klinika, Kragujevac

## DIAGNOSIS OF CHLAMYDIAL INFECTION

Jelena Tosić-Pajić<sup>1</sup>, Dejan Baskić<sup>2</sup>, Dragan R. Milovanović<sup>3</sup>, Violeta Ninković<sup>4</sup>, Jelena Cukić<sup>4</sup>, Predrag Sazdanović<sup>5</sup>, Marija Sorak<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Serbia

<sup>2</sup>Faculty of Medical Sciences, Center for Molecular Medicine and Stem Cell Research, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

<sup>3</sup>Faculty of Medical Sciences, Department of Pharmacology and toxicology, University of Kragujevac, Serbia

<sup>4</sup>Public Health Institute Kragujevac, Kragujevac, Serbia

<sup>5</sup>Clinical Center Kragujevac, Clinic for Gynecology and Obstetrics, Kragujevac, Serbia

### SAŽETAK

Hlamidijalna infekcija pogađa mlade seksualno aktivne osobe. Kao najčešća bakterijska seksualno prenosiva infekcija širom sveta hlamidija može da dovede do ozbiljnih posledica na reproduktivnom traktu, uključujući pelvičnu inflamatornu bolest, ektopičnu trudnoću i neplodnost sa uzromom u jajovodima. Sa druge strane, iako je kod velikog broja žena imunski odgovor sposoban da sanira infekciju, infekcija može asenditno da se širi u gornji reproduktivni trakt, gde može progradirati u perzistentnu infekciju. Dijagnostičke procedure za otkrivanje hlamidijalne infekcije uključuju direktne i indirektne metode. Lokalizovane, akutne infekcije se dijagnostikuju direktnom detekcijom patogena upotrebom ćelijske kulture, testova za kvalitativno otkrivanje antigena, testova hibridizacije i amplifikacije nukleinskih kiselina. U uslovima kada je infekcija prešla na gornji genitalni trakt, pogotovu u slučaju razvijene perzistentne infekcije dijagnoza se uglavnom postavlja indirektnim metodama, detekcijom antitela na hlamidijalne antigene. Za dijagnozu akutne hlamidijalne infekcije neophodna je direktna detekcija patogena u bolesničkom materijalu. Od svih direktnih dijagnostičkih testova, testovi amplifikacije nukleinskih kiselina su prema preporukama evropskog i američkog entra za kontrolu i prevenciju bolesti jedini testovi koji se mogu koristiti za dijagnozu akutne hlamidijalne infekcije. Ovi testovi se preporučuju zbog visoke senzitivnosti, specifičnosti i brzine dijagnostike. Za detekciju perzistentne hlamidijalne infekcije preporučuju se indirektni serološki testovi kojima se detektuje imunski odgovor, odnosno antitela specifična za hlamidijalne antigene. Naime uzorci seruma se relativno lako uzimaju, dok su uzorci tkiva sa mesta perzistentne infekcije najčešće ili teško dostupni ili nedostupni.

**Cljučne reči:** Chlamydia Trachomatis; dijagnoza, akutna infekcija, perzistentna infekcija.

### ABSTRACT

Chlamydial infection affects young, sexually active persons. As the most common bacterial sexually transmitted infection in the world, Chlamydia can lead to severe consequences in reproductive system, including chronic pelvic inflammatory disease, ectopic pregnancy and tubal factor infertility. On the other hand, although in large number of women the immune response is capable of removing the pathogen, infection can ascendently spread to the upper reproductive tract where can develop into persistent infection. Diagnostic procedures for detecting chlamydial infection include direct and indirect methods. Localized acute infections are detected by direct pathogen detection using cell culture, tests for qualitative detection of antigens, hybridization tests and nucleic acid amplification tests. When the infection has passed on the upper genital tract, especially in the case of a developed persistent infection, the diagnosis is usually made by indirect methods - the detection of antibodies to chlamydial antigens. Direct pathogen detection in patient material is necessary for the diagnosis of an acute chlamydial infection. Of all direct diagnostic tests, nucleic acid amplification tests are the only tests recommended by European and American Center for Disease Control and Prevention which can be used for the diagnosis of an acute chlamydial infection. These tests are recommended for their high sensitivity, specificity and diagnostic speed. Indirect serological tests which detect immune response or antibodies specific to chlamydial antigens are recommended for the detection of persistent chlamydial infection. Serum samples are relatively easy to collect, while tissue samples from the place of persistent infection are often hard to reach or unavailable.

**Key words:** Chlamydia trachomatis; diagnosis; acute infection; persistent infection

## UVOD

Infekcija *C. trachomatis* je najčešća seksualno prenosiva bakterijska infekcija u svetu (1,2). Procenjuje se da hlamidija seksualnim putem inficira preko 100 miliona ljudi svake godine širom sveta (3). Infekcija uglavnom pogađa mlade seksualno aktivne osobe. Većina infekcija *C. trachomatis* su asimptomatske i stoga, ostaju nedijagnostikovane i posledično neležene (4,5). Ukoliko ostane neležena, infekcija *C. trachomatis*, može kod žena da dovede do ozbiljnih posledica na reproduktivnom traktu uključujući pelvičnu inflamatornu bolest (*od engl. Pelvic Inflammatory Disease - PID*), tubalni faktor infertiliteta (TFI), kao i ektopičnu trudnoću (6). Kod muškaraca, hlamidijalna infekcija je glavni uzrok uretritisa koji može napredovati do akutnog epididimitisa. Sa druge strane, iako kod velikog broja žena dolazi do spontane rezolucije infekcije, infekcija može ascendentno da se širi u gornji reproduktivni trakt, gde može progredirati u perzistentnu infekciju (7). Perzistentnu hlamidijalnu infekciju karakteriše prisustvo aberantnih, nereplikativnih, ali vijabilnih perzistentnih formi, koje predstavljaju ne samo alternativni razvojni ciklus hlamidija, već i način na koji hlamidije veoma vešto izbegavaju imunski odgovor domaćina. Laboratorijskom dijagnostikovanju hlamidijalne infekcije treba da se podvrgnu svi muškarci sa negonokoknim uretritisom, postgonokoknim uretritisom, epididimitisom ili Rajterovim sindromom, kao i žene sa salpingitisom, mukopurulentnim cervicitisom, ektopičnom trudnoćom, tubalnim faktorom infertiliteta, bolom u karlici, svi pacijenti sa gonorejom, trudnice, asimptomatski seksualno aktivni pacijenti, sa ciljem blagovremenog dijagnostikovanja infekcije donjeg genitalnog trakta i prevencije prenošenja i nastanka posledičnih sekvela u gornjem genitalnom traktu (8). Pored izolacije u kulturi ćelija, danas je dostupan veliki broj komercijalnih testova za dijagnozu akutne hlamidijalne infekcije. Za uspesnu dijagnozu hlamidijalnih infekcija neophodno je napraviti dobar odabir testa koji obezbeđuje visoku senzitivnost i specifičnost ali i brzinu izvođenja testa, što su po preporukama evropsko i americkog centra za kontrolu bolesti (ECDC i CDC) testovi amplifikacije nukleinskih kiselina.

## DIJAGNOSTIČKE METODE

U poslednjih trideset godina je ostvaren značajan napredak na polju dijagnostikovanja hlamidijalne infekcije. Za detekciju *C. trachomatis* postoje višestruke opcije laboratorijskog testiranja, mada neke ne mogu biti preporučene za rutinsku upotrebu. Kako je *C. trachomatis* obligatna intracelularna bakterija, ćelijska kultura ostaje referentni metod, iako su danas dostupni mnogi komercijalni testovi koji nisu zasnovani na kulturi ćelija.

Dijagnostičke procedure za otkrivanje hlamidijalne infekcije uključuju direktne i indirektne metode. Generalno, lokalizovane, akutne infekcije se dijagnostikuju direktnom detekcijom patogena upotrebom ćelijske kulture, testova za kvalitativno otkrivanje antigena, testova hibridizacije i amplifikacije nukleinskih kiselina. U uslovima kada je infekcija prešla na gornji genitalni trakt, pogotovu u slučaju razvijene perzistentne infekcije dijagnoza se uglavnom postavlja indirektnim metodama, detekcijom antitela na hlamidijalne antigene (9).

### *Izolacija u ćelijskoj kulturi*

Ćelijska kultura je jedini test koji potvrđuje prisustvo vijabilnih hlamidija u bolesničkom uzorku (10). Stabilne ćelijske linije za izolaciju *C. trachomatis* uključuju McCoy, Hella 229, HEp-2 ćelije kao i Buffalo green ćelije bubrega majmuna. Uzorci za analizu se mogu uzimati sa različitih anatomskih mesta endocerviksa, uretre, analnog kanala i konjuktiva. Ovi uzorci su pogodni za izvođenje testa, ali je za adekvatno uzorkovanje neophodno obezbediti odgovarajući pribor i transport u adekvatnim medijumima (11). Klinički uzorci se inokulišu na cikloheksamid tretirane monoslojeve kulture McCoy ćelija ili drugih odgovarajućih ćelija. Inokulacija uključuje centrifugiranje uzorka na ćelijski monosloj praćeno inkubacijom 48-72h. Nakon 48-72h rasta, inficirane ćelije razvijaju karakteristične intracitoplazmatske inkluzije koje sadrže značajan broj elementarnih i retikularnih telašaca *C. trachomatis*. Monosloj ćelija se izlaže genus specifičnim ili vrsno specifičnim fluoresceinom obeleženim monoklonskim antitelima da bi se dobila specifična vizualizacija hlamidijalnih inkluzija fluorescentnim mikroskopom. Detekcija *C. trachomatis* putem ćelijskog kultivisanja je visoko specifična ukoliko se koristi bojenje specifično za glavni protein spoljašnje membrane (*od engl. major outer membrane protein – MOMP*) *C. trachomatis*. Komercijalno bojenje korišćenjem monoklonskih antitela protiv lipopolisaharida koja su genus specifična, koštaju manje, ali pokazuju manju specifičnost.

Manje specifične metode detekcije inkluzija gde se koristi bojenje jodom ili Gimza bojenje se ne preporučuju za rutinsku upotrebu (12-14). Ćelijsko kultivisanje pokazuje relativno nisku senzitivnost, mada se uočavaju varijacije između različitih laboratorija (15). Recimo neke laboratorije koriste "Shell vial" metod kultivisanja upotrebom većeg inokuluma sa smanjenim rizikom za ukrštenu kontaminaciju i time obezbeđuju veću tačnost od metode sa mikrotitar pločom od 96 bunarčića (16, 17). U određenim laboratorijama, veća senzitivnost se postiže izvođenjem "slepog prelaza", kada se u cilju dobijanja novog ciklusa rasta, inokulisani monosloj ćelija, nakon inkubacije u trajanju od 48-72h, podize i koristi za inokulaciju novog monosloja, koji se zatim boji nakon 48-

72h inokulacije (11). Visoka specifičnost ćelijskog kultivisanja kao i dobijanje kliničkog izolata za testiranje osetljivosti na antimikrobne agense su svakako prednosti ovog testa, obzirom da ne postoje standardne procedure za procenu osetljivosti *C. trachomatis* na antibiotike u *in vitro* uslovima (18). Glavni nedostaci izolacije *C. trachomatis* putem ćelijskog kultivisanja su relativno niska senzitivnost, dugo vreme rasta, teškoće u standardizaciji, tehnička kompleksnost, striktni zahtevi pri transportu i relativno visoki troškovi, zbog kojih se ova metoda ne preporučuje za dijagnozu hlamidijalne infekcije, ali svakako treba biti dostupna u izuzetnim situacijama.

Po definiciji, detekcija perzistentne hlamidijalne infekcije izolacijom u kulturi nije moguća. Međutim, izolacija u ćelijskoj kulturi se uspešno koristila u ranijim studijama o perzistenciji. U misijem modelu perzistentne hlamidijalne infekcije izolacijom u ćelijskoj kulturi pokazano je prisustvo vijabilnih hlamidija u inficiranom tkivu nakon reaktivacije perzistentne infekcije primenom kortizola (19). Za dijagnostikovanje perzistentne hlamidijalne infekcije bitno je obratiti pažnju na pravilno prikupljanje uzoraka, pošto se perzistentne hlamidijalne forme uglavnom lokalizuju u tkivima, a ređe na mukoznoj površini dostupnoj za briseve (20). Stoga ne iznenađuje podatak da su mnogi uzorci koji su bili negativni na kulturi bili pozitivni na testu amplifikacije nukleinskih kiselina.

### Detekcija antigena

Danas je dostupan veliki broj komercijalnih enzimskih imunoeseja (EIA) za detekciju hlamidijalnih antigena u kliničkim uzorcima (8). Enzimski imunoeseji koriste monoklonska antitela za detekciju glavnih proteina spoljašnje membrane (MOMP) ili poliklonska antitela za detekciju hlamidijalnog lipopolisaharida (LPS). Ova antitela su obeležena enzimom koji u reakciji sa substratom, nakon vezivanja za specifični antigen, oslobađa boju koja se detektuje kolorimetrijski ili golim okom. Testovi koji detektuju hlamidijalni LPS mogu dati lažno pozitivne rezultate zbog ukrštene reakcije sa LPS drugih mikroorganizama (11, 12, 21, 22). U odnosu na PCR (*od engl. polimerase chain reaction*) kao referentni metod komercijalno dostupni enzimski imunoeseji za detekciju hlamidijalnih antigena pokazuju visoku specifičnost (97%) uz nisku senzitivnost (60%-75%) (8, 23).

U odabiru testova za detekciju hlamidijalne infekcije, pored dijagnostičke tačnosti, veoma je bitna i brzina izvođenja testa i dobijanja rezultata radi blagovremenog iniciranja lečenja. Testovi lateralne hromatografije (brzi imunohromatografski testovi - BT) za kvalitativno otkrivanje hlamidijalnih antigena predstavljaju novu generaciju imunoenzimskih testova koji svakako ispunjavaju ovaj uslov, obzirom da su rezultati testa

dostupni za deset minuta, tako da pacijenti sa pozitivnim rezultatom testa mogu odmah krenuti sa antibiotskom terapijom. Smatra se da ovi testovi mogu da smanje nivo transmisije i incidencu hlamidijalnih infekcija i posledicne sekvele po reproduktivno zdravlje žena upravo tako sto smanjuju vreme izmedja postavljanja dijagnoze i pocetka tretmana. Međutim, jedna studija ukazuje na nisku senzitivnost (11.6%-27.3%) brzih testova (24), koja se u nekim slucajevima moze objasniti testiranjem asimptomatskih pacijenata, kod kojih je infekcija na samom početku. Međutim, iako se testiranjem endocervikalnih uzoraka kod simptomatskih pacijenata senzitivnost brzih testova moze povecati (22,7%-37,7%), ona je i dalje na nezadovoljavajućem nivou (25). I pored visoke specifičnosti i kratkog vremena izvođenja testa, zbog niske senzitivnosti ovi testovi se ne preporučuju za dijagnozu asimptomatskih i simptomatskih hlamidijalnih infekcija (9).

Drugi pristup potvrđivanja infekcije tj. detekcije hlamidijalnih antigena u kliničkim uzorcima, uključuje testiranje uzoraka testom direktne imunofluorescencije (DIF) koji koristi vrsno specifična monoklonska antitela za detekciju glavnog proteina spoljašnje membrane hlamidija. Reagens koji sadrži mišja monoklonska antitela obeležena fluoresceinom specifično se vezuju za MOMP antigen *C. trachomatis* u uzorku pacijenata i daje svetlozelenu fluorescenciju. Kvalitet fluorescencije je dobar, jer se MOMP podjednako raspoređuje po hlamidijalnoj membrani. Prednost testa direktne imunofluorescencije je sto kvalitet endocervikalnih uzoraka može biti procenjen prisustvom i brojem epitelnih ćelija. Dalje, ova procedura nudi brzu dijagnozu, jer je za izvođenje potrebno 30-tak minuta. Uz visoku specifičnost od 98%, senzitivnost testa direktne imunofluorescencije se kreće od 75%-85%, u poređenju sa kulturom i nešto nižom osetljivošću od 70% u odnosu na testove amplifikacije nukleinskih kiselina (8). Obzirom da je ova metoda subjektivna, da zahteva osobu koja je iskusna u radu sa fluorescentnim mikroskopom, te da ima nezadovoljavajuću senzitivnost, ne može se preporučiti za detekciju akutne hlamidijalne infekcije. Zbog svega navedenog, testovi za detekciju hlamidijalnih antigena (EIA, DIF, BT) se zbog nedovoljne dijagnostičke tačnosti ne mogu preporučiti za rutinsku dijagnozu i skrining hlamidijalnih infekcija (11, 26).

Teoretski, detekcija hlamidijalnih antigena u kliničkim uzorcima može poslužiti kao dijagnostički test za detekciju perzistentne infekcije. Međutim, kako bi se na mestu infekcije dokazali tragovi perzistentne infekcije tj., aberantna tela, uzimanje uzoraka mora biti invazivnije nego što je to slucaj prilikom uzorkovanja briseva sa mukoze. Štaviše, količina aberantnih tela u uzorku je verovatno veoma mala, a reagensi koji bi ih učinili vidljivim u ovom trenutku još nisu dostupni. Ipak, opšti

utisak je da detekcija EB u mukoznim brisevima ukazuje na prisustvo akutne infekcije *C. trachomatis* (27). U istraživačkim uslovima, detekcija hlamidijalnih antigena u tkivima imunocitohemijskim metodama (ICC) se pokazala korisnom, narocito u studijama o kliničkim pojavama perzistentnih infekcija, uključujući postinfektivni tubalni infertilitet (28). Sa druge strane, detekcija i kvantifikacija solubilnih, cirkulišućih hlamidijalnih antigena, kao što je LPS, može predstavljati potencijalni marker za detekciju perzistentne infekcije (29).

### **Testovi amplifikacije nukleinskih kiselina**

Testovi amplifikacije nukleinskih kiselina (*od engl. nucleic acid amplification test - NAAT*) su načinili preokret u dijagnostici *C. trachomatis*. Ovi testovi, u odnosu na kulturu, pokazuju najveću osetljivost uz visoku specifičnost, ali za razliku od kulture ne zavise od vijabilnog patogena što olakšava transport uzoraka. Pored toga, uz automatizovanu ekstrakciju nukleinskih kiselina rezultati ovih testova se mogu dobiti za nekoliko sati. Zbog sveg toga, na osnovu preporuka ECDC i CDC testovi amplifikacije nukleinskih kiselina se smatraju testom izbora za dijagnozu akutne hlamidijalne infekcije i zamenjuju kulturu kao dijagnostički zlatni standard (11, 26, 30, 31). Iako je većina NAAT testova zasnovana na lančanoj reakciji polimerizacije (*od engl. polymerase chain reaction - PCR*) nekoliko NAAT metoda je trenutno licencirano za detekciju *C. trachomatis* u kliničkim uzorcima: lančana reakcija polimerizacije, (Amplacor, Roche Molecular Systems, USA), lančana reakcija ligaze (*od engl. ligase chain reaction - LCR*) (LCx test, Abbott Laboratories, USA), transkripcijom posredovana amplifikacija (*od engl. transcription-mediated amplification - TMA*) (AMP-CT i APTIMA Combo 2, Gen-Probe Inc, USA) i izotermalna amplifikacija zamenom lanca (*od engl. strand displacement amplification - SDA*) (ProbeTec, BD Diagnostic Systems, USA). PCR, LCR i SDA testovi amplifikuju nukleotidne sekvence kriptičnog plazmida, koji je prisutan u višestrukim kopijama u svakom EB *C. trachomatis*. TMA reakcija registruje ribozomalnu RNA koja je takođe prisutna u višestrukim kopijama. Teoretski, ove tehnike bi trebalo da mogu da detektuju manje od jednog EB, međutim prava osetljivost kod kliničkih uzoraka je niža (90% do 96%) zbog varijabilnosti pri uzimanju uzoraka i inhibicije amplifikacione reakcije faktorima iz uzorka (32). Kliničke provere su pokazale veću senzitivnost testova amplifikacije u odnosu na izolaciju u kulturi ćelija i druge metode dijagnostikovanja hlamidija (33, 34). Povremeno se u nekim studijama, javlja neusaglašenost rezultata NAAT testova, koja se može opravdati različitim analitičkom osetljivošću, različitim efikasnošću izolacije nukleinskih kiselina i varijabilnošću genoma hlamidije, u najvećem broju studija, rezultati različitih NAAT testova

su usklađeni (35-37). Stoga se smatra da u kliničkim uslovima potvrda pozitivnih NAAT testova nije neophodna. Važan izuzetak predstavljaju pravne istrage u slučaju seksualnog zlostavljanja. U takvim slučajevima primenjuju se testovi sa najvećom senzitivnošću i specifičnošću. Pokazalo se da su NAAT testovi osetljiviji od culture u otkrivanju hlamidijalne infekcije kod žrtava seksualnog napada (38). Iako intracelularni životni ciklus hlamidija predstavlja popriličnu prepreku za nastanak genetskih rekombinacija, do njih u realnim uslovima ipak dolazi, što ne samo da može dovesti do razvoja novih varijanti sa povećanom virulencijom (39), već može predstavljati vrhunski izazov za dijagnozu hlamidijalnih infekcija, pogotovu kada se za dijagnozu koriste testovi zasnovani na otkrivanju nukleinske kiseline. U ovakvim situacijama NAAT testovi pokazuju napredak razvojem dvostrukih ciljnih testova, koji omogućavaju otkrivanje novih varijanti sa delecijama ili rekombinacijom u jednom od ciljnih regiona (40).

NAAT testovi, uključujući PCR, su takođe pogodni za detekciju perzistentne hlamidijalne infekcije. Upotreba amplifikacionih tehnologija u kombinaciji sa izolacijom u kulturi ćelija je dala neosporne dokaze postojanja perzistentne infekcije *in vivo*. Naime, *C. trachomatis* može biti kultivisana u akutnim infekcijama donjeg genitalnog trakta, ali kultura retko uspeva u infekcijama gornjeg trakta, uključujući tubalni faktor infertiliteta, mada se i u tim uslovima DNK *C. trachomatis* može amplifikovati PCR tehnikama (41). Upravo je PCR metodologija, u kombinaciji sa serologijom, potvrdila prisustvo DNK *C. pneumoniae* u ateromima i cirkulišućim krvnim ćelijama čime je uspostavljena nepobitna veza između ateroskleroze i infekcija, naročito perzistentnih infekcija izazvanih bakterijom *C. pneumoniae* (42). Naravno, demonstracija bakterijske DNK per se, ne dokazuje i vijabilnost patogena, ali zato identifikacija primarnih transkripta hlamidijalne rRNK može pokazati da su bakterije metabolički aktivne, a time i vijabilne (43). U tom smislu, pokazano je da se u sinovijalnim uzorcima pacijenata sa reaktivnim artritisom mogu detektovati primarni rRNK i mRNK transkripti hlamidijalnih gena (44).

### **Serologija**

Serologija se ne preporučuje za dijagnostikovanje akutnih hlamidijalnih infekcija donjeg genitalnog trakta, obzirom da se antitela mogu detektovati tek nekoliko nedelja od početka infekcije, titar antitela može biti nizak, a mnogi serološki testovi nisu u mogućnosti da razlikuju antitela protiv različitih vrsta hlamidija. Sa izuzetkom, serologija može biti od koristi kod infekcija novorođenčadi, pacijenata sa tubalnim faktorom infertiliteta (45, 46), ektoپیčnom trudnoćom (47), rekurentnim pobačajima (48) i pelvičnom inflamatornom bolešću (49). Iako se tehnika mikroimunofluorescencije (MIF) (50) i danas smatra

zlatnim standardom za serodijagnozu hlamidijalnih infekcija (51), brojni nedostaci ovu metodu čine neadekvatnom za rutinsku primenu. MIF je dugotrajna metoda koja zahteva intenzivan rad, uslovi testiranja mogu biti varijabilni, čitanje fluorescentnih signala je sklono subjektivnoj proceni što u kombinaciji sa pristrasnošću izbora slučajeva i kontrolama može dovesti do konfliktnih rezultata (52, 53).

Stoga se danas u rutinskoj praksi više koriste imunoenzimski testovi, naročito *C. trachomatis* specifični ELISA testovi (od engl. - *enzyme-linked immunosorbent assay - ELISA*) (52, 54). Šta više, neke studije pokazuju da su serološki imunoenzimski testovi po svojim dijagnostičkim performansama komparabilni, ako ne i bolji u odnosu na MIF (55). Obzirom da su ELISA serološki testovi bolje standardizovani, zahtevaju manje vremena za izvođenje, jeftiniji su i u svakom pogledu manje zahtevni od MIF, ovi testovi predstavljaju dobru alternativu za detekciju antitela na *C. trachomatis*, pogotovu u slučajevima kada je potrebno obraditi veliki broj uzoraka. Ovi ELISA testovi uobičajeno detektuju antitela specifična za glavni protein spoljašnje membrane (od engl. *major outer membrane protein - MOMP* da obrisem vec je objasnjena) ili 60-kDa hlamidijalni protein toplotnog šoka (od engl. *60-kDa chlamydial heat shock protein - cHSP60*). Drugi serološki testovi koji se koriste za detekciju antitela specifičnih za hlamidije su EIA testovi specifični za hlamidijalna EB/RB ili hlamidijalni LPS, inkluzioni test imunofluorescencije, indirektna hemaglutinacija, neutralizacija, precipitacija, gel difuzija, enzimski vezana fluorescencija, imunoperoksidaza test i imunoelektroforeza. Ipak, najveći broj studija je pokazao da najveću dijagnostičku primenu od svih seroloških testova imaju upravo ELISA testovi jer pokazuju snažnu korelaciju između prisustva anti-MOMP (56-60) i anti-cHSP60 (61-63) antitela i težine genitalne infekcije *C. trachomatis*, PID, infertiliteta i tubalne patologije (64, 65). Stoga, iako se serološke metode ne mogu preporučiti za detekciju akutne hlamidijalne infekcije donjih partija genitalnog trakta, serologija može biti od koristi kako u epidemiološkim studijama, tako i u studijama koje ispituju klinički spektar hlamidijalnih infekcija, uključujući komplikacija akutne infekcije (reaktivni artritis), perzistentnu infekciju, ali i manifestacija perzistentne infekcije (PID, TFI, ektopična trudnoća).

Bez obzira na značajne napore i postignute rezultate, perzistentna hlamidijalna infekcija je teška za dijagnostikovanje i trenutno nema široko prihvaćenih seroloških kriterijuma za detekciju perzistentne infekcije. Dijagnostikovanje perzistentne hlamidijalne infekcije prvobitno je zasnovano na nalazima dobijenim tradicionalnom, ali specifičnom hlamidijalnom serologijom. Antitela koja se detektuju pomoću MIF metode su upravljena direktno protiv površinskih proteina

hlamidijalnih EB. Proteomska analiza hlamidijalne infekcije je otkrila da je kod akutne infekcije povećana ekspresija određenih površinskih proteina, a kod perzistentne infekcije ili TFI povećana ekspresija nekih drugih proteina. Ovi rezultati su obećavajući, jer ukazuju na različitu reaktivnost antitela u akutnoj i hroničnoj hlamidijalnoj infekciji, što može biti od koristi za karakterizaciju određenih panela antitela kao mogućih markera za različite faze infekcije (66). Stoga, MIF test, kao i EIA testovi koji koriste cele bakterije ne mogu adekvatno da naprave razliku između akutnih i perzistentnih infekcija (67). Proteomski profil hlamidijalne infekcije može omogućiti razvoj preciznijih seroloških testova koji mogu bolje da razlikuju odgovore povezane sa akutnom infekcijom, izlečenom prošlom infekcijom i perzistentnom infekcijom. Proteinski mikroreji visoke rezolucije (*high-resolution whole genome scale protein array*) mogu dati precizne informacije koje se odnose i bitne su za detekciju novih hlamidijalnih proteina, kombinacija proteina povezanih sa različitim stadijumima infekcije ili profilisanje serološkog odgovora. Mnogi proteini *C. trachomatis* su prepoznati u serumima pacijenata sa TFI i njihovim kontrolama (68). Poređenjem profila antitela otkriveno je da je u serumima pacijenata sa TFI pokazano više od trideset proteina *C. trachomatis* odsutnih u serumu zdravih osoba. Oni uključuju i CT110 (GroEL; 71% seruma je reagovalo sa proteinom) potvrđujući ranije zaključke da je odgovor na homolog Hsp60 povezan sa TFI. Međutim, u ovoj studiji nijedan antigen nije pokazivao senzitivnost >50% uz održavu specifičnost od 100% (69). Naime, osobe sa akutnom infekcijom *C. trachomatis* u visokom procentu su pokazivale seropozitivnost na GroEL što jasno umanjuje vrednost ovog antigena kao markera perzistentne infekcije. Na osnovu sličnih istraživanja predloženi su paneli antigena *C. trachomatis* koji bi mogli da predvide tubalnu patologiju i akutnu infekciju. Po jednoj studiji, reaktivnost na četiri proteina CT110, CT376 (malat dehidrogenaza), CT557 (dihidrolipoamid hidrolaza) i CT443 (OmcB), bi mogla da razdvoji žene sa TFI od fertilnih žena i to sa senzitivnošću od 63% i specifičnošću od 100% (70).

## ZAKLJUČAK

*C. trachomatis* je obligatna intracelularna bakterija koja inficira epitelne ćelije domaćina. Infekcija može biti asimptomatska, uporna i dugotrajna, dovodeći do velikih komplikacija i sekvela. Za dijagnozu akutne hlamidijalne infekcije neophodna je direktna detekcija patogena u bolesničkom materijalu. Od svih direktnih dijagnostičkih testova, NAAT testovi su prema preporukama ECDC i CDC jedini testovi koji se mogu koristiti za dijagnozu akutne hlamidijalne infekcije. NAAT testovi se preporučuju zbog visoke osetljivosti, specifičnosti i brzine

dijagnostike kako kod simptomatskih tako i kod asimptomatskih hlamidijalnih infekcija. Za detekciju perzistentne hlamidijalne infekcije preporučuju se indirektni serološki testovi kojima se detektuje imunski odgovor, odnosno antitela specifična za hlamidijalne antigene. Naime uzorci seruma se relativno lako uzimaju, dok su uzorci tkiva sa mesta perzistentne infekcije najčešće ili teško dostupni ili nedostupni. Sposobnost ovih testova da razlikuju odgovor antitela koji se odnosi na perzistentnu infekciju od onog koji se odnosi na akutnu infekciju je vrlo važna i predstavlja osnov kliničke upotrebljivosti ovih testova.

### LITERATURA

1. Bebear C, de Barbeyrac B. Genital Chlamydia trachomatis infections. *Clin Microbiol Infect* 2009; 15:4-10.
2. O'Connell CM, Ferone ME. Chlamydia trachomatis genital infections. *Microb cell* 2016; 3:390-403.
3. Nenoff P, Manos A, Ehrhard I, et al. Non-viral sexually transmitted infections - epidemiology, clinical manifestations, diagnostics and therapy: Part 2: Chlamydia and mycoplasma. *Hautarzt* 2017; 68:50-8.
4. Peipert JF. Clinical practice. Genital chlamydial infections. *N Engl J Med* 2003; 349:2424-30.
5. Bally F, Quach A. Chlamydia: from population screening to repeated individual screening. *Rev Med Suisse* 2014; 10:1882-6.
6. Ljubin-Sternak S, Meštrović T. Chlamydia trachomatis and genital Mycoplasmas: pathogens with an impact on human reproductive health. *J Pathog* 2014; 2014:183167.
7. Morre SA, van den Brule AJ, Rozendaal L, et al. The natural course of asymptomatic Chlamydia trachomatis infections: 45% clearance and no development of clinical PID after one-year follow-up. *Int J STD AIDS* 2002; 13:12-8.
8. Chernesky MA. The laboratory diagnosis of Chlamydia trachomatis infections. *Can J Infect Dis Med Microbiol* 2005; 16:39-44.
9. Meyer T. Diagnostic procedures to detect Chlamydia trachomatis infections. *Microorganisms* 2016; 4:25.
10. Ripa KT, Mardh PA. Cultivation of Chlamydia trachomatis in cycloheximide-treated McCoy cells. *J Clin Microbiol* 1977; 6:328-31.
11. Papp JR, Schachter J, Gaydos CA, Der Pol BV. Recommendations for the laboratory-based detection of Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae-2014. *MMWR Recomm Rep* 2014; 63:1-19.
12. CDC. False-positive results with the use of chlamydial tests in the evaluation of suspected sexual abuse-Ohio, 1990. *MMWR* 1991; 39:932-5.
13. Barnes RC. Laboratory diagnosis of human chlamydial infections. *Clin Microbiol Rev* 1989; 2:119-36.
14. Hammerschlag MR, Ajl S, Laraque D. Inappropriate use of nonculture test for the detection of Chlamydia trachomatis in suspected victims of child sexual abuse: a continuing problem. *Pediatrics* 1999; 104:1137-9.
15. Pate MS, Hook EW. Laboratory to laboratory variation in Chlamydia trachomatis culture practices. *Sex Transm Dis* 1995; 22:322-6.
16. Stamm WE, Tam M, Koester M, Cles L. Detection of Chlamydia trachomatis inclusions in McCoy cell cultures with fluorescein-conjugated monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol* 1983; 17:666-8.
17. Yoder BL, Stamm WE, Koester CM, Alexander ER. Microtest procedure for isolation of Chlamydia trachomatis. *J Clin Microbiol* 1981; 13:1036-9.
18. Wang SA, Papp JR, Stamm WE, Peeling RW, Martin DH, Holmes KK. Evaluation of antimicrobial resistance and treatment failures for Chlamydia trachomatis: a meeting report. *J Infect Dis* 2005; 191:917-23.
19. Yang YS, Kuo CC, Chen WJ. Reactivation of Chlamydia trachomatis lung infection in mice by cortisone. *Infect Immun* 1983; 39:655-8.
20. Cappuccino AL, Paton DL, Kuo CC, Campbella LA. Detection of Chlamydia trachomatis deoxyribonucleic acid in monkey models (Macaca nemestrina) of salpingitis by in situ hybridization: implications for pathogenesis. *Am J Obstet Gynecol* 1994; 171:102-10.
21. Kellog JA, Seiple JW, Hick ME. Cross-reaction of clinical isolates of bacteria and yeasts with the Chlamydiazyme test for chlamydial antigen, before and after use of a blockin reagent. *Am J Clin Pathol* 1992; 97:309-12.
22. Stamm WE. Diagnosis of Chlamydia trachomatis genitourinary infections. *Ann Intern Med* 1988; 108:710-7.
23. Bañuelos Pánuco CA, Deleón Rodríguez I, Hernández Méndez JT, et al. Detection of Chlamydia trachomatis in pregnant women by the Papanicolaou technique, enzyme immunoassay and polymerase chain reaction. *Acta Cytol* 2000; 44:114-23.
24. Van Dommelen L, van Tiel FH, Ouburg S, et al. Alarming poor performance in Chlamydia trachomatis point-of-care testing. *Sex Transm Infect* 2010; 86:355-9.
25. Nuñez-Forero L, Moyano-Ariza L, Gaitán-Duarte H, et al. Diagnostic accuracy of rapid tests for sexually transmitted infections in symptomatic women. *Sex Transm Infect* 2016; 92:24-8.

26. Nwokolo NC, Dragovic B, Patel S, Tong CY, Barker G, Radcliffe K. 2015 UK national guideline for the management of infection with *Chlamydia trachomatis*. *Int J STD AIDS* 2016; 27:251–67.
27. Havlichek DH Jr, Mauck C, Mummaw NL, Moorer G, Rajan SJ, Mushahwar IK. Comparison of chlamydial culture with Chlamydiazyme assay during erythromycin PCE treatment of *Chlamydia* genital infection. *Sex Transm Dis* 1990; 17:48-50.
28. Patton DL, Askienazy-Elbhar M, Henry-Suchet J, et al. Detection of *Chlamydia trachomatis* in fallopian tube tissue in women with postinfectious tubal infertility. *Am J Obstet Gynecol* 1994; 171:95-101.
29. Tirola T, Jaakkola A, Bloigu A, et al. Novel enzyme immunoassay utilizing lipopolysaccharide-binding protein as a capture molecule for the measurement of chlamydial lipopolysaccharide in serum. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2006; 54:7-12.
30. CDC Recommendations for the laboratory-based detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*. Recommendations and Reports 2014; 63:1-19.
31. ECDC. European Centre for Disease Prevention and Control. Annual Epidemiological Report 2016 – Chlamydia. [Online]. Available: <https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/Chlamydia%20AER.pdf>
32. Maahony J, Chong S, Jang D, et al. Urine specimens from pregnant and nonpregnant women inhibitory to amplification of *Chlamydia trachomatis* nucleic acid by PCR, ligase chain reaction, and transcription-mediated amplification: Identification of urinary substances associated with inhibition and removal of inhibitory activity. *J Clin Microbiol* 1998; 36:3122-6.
33. Kluytmans JA, Goessens WH, Mouton JW, et al. Evaluation of clearview and magic lite tests, polymerase chain reaction, and cell culture for detection of *Chlamydia trachomatis* in urogenital specimens. *J Clin Microbiol* 1993; 31:3204-10.
34. Van Dyck E, Leven M, Pattyn S, Van Damme L, Laga M. Detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* by enzyme immunoassay, culture and three nucleic acid amplification tests. *J Clin Microbiol* 2001; 39:1751-6.
35. Marshall R, Chernesky M, Jang D, et al. Characteristics of the m2000 automated sample preparation and multiplex real-time PCR system for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *J Clin Microbiol* 2007; 45:747–51.
36. Cheng A, Qian Q, Kirby JE. Evaluation of the Abbott RealTime CT/NG assay in comparison to the Roche Cobas Amplicor CT/NG assay. *J Clin Microbiol* 2011; 49:1294–300.
37. Chernesky MA, Jang DA, Luinstra K, et al. High analytical sensitivity and low rates of inhibition may contribute to detection of *Chlamydia trachomatis* in significantly more women by the APTIMA Combo 2 assay. *J Clin Microbiol* 2006; 44:400–5.
38. Black CM, Driebe EM, Howard LA, et al. Multicenter study of nucleic acid amplification tests for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in children being evaluated for sexual abuse. *Pediatr Infect Dis J* 2009; 28:608–13.
39. Samboona N, Wan R, Ojcius DM, et al. Hypervirulent *Chlamydia trachomatis* clinical strain is a recombinant between lymphogranuloma venereum (L2) and D lineages. *MBio* 2011; 2:e00045-11.
40. Möller JK, Pedersen LN, Persson K. Comparison of the Abbott RealTime CT new formulation assay with two other commercial assays for detection of wild-type and new variant strains of *Chlamydia trachomatis*. *J Clin Microbiol* 2010; 48:440–3.
41. Brunham RC, Maclean IW, Binns B, Peeling RV. *Chlamydia trachomatis*: its role in tubal infertility. *J Infect Dis* 1985; 152:1275-82.
42. Campbell LA, Paton DL, Kuo CC. *Chlamydia pneumoniae*- an infectious risk factor for atherosclerosis? *Nat Rev Microbiol* 2004; 2:23-32.
43. Gerard HC, Whittum-Hudson JA, Hudson AP. Genes required for assembly and function of the protein synthetic system in *Chlamydia trachomatis* are expressed early in elementary to reticulate body transformation. *Mol Gen Genet* 1997; 255:637-42.
44. Gerard HC, Branigan PJ, Schumacher HR, Hudson AP. Synovial *Chlamydia trachomatis* in patients with reactive arthritis/Reiter's syndrome are viable but show aberrant gene expression. *J Rheumatol* 1998; 25:734-42.
45. Arya R, Mannion PT, Woodcock K, Haddad NG. Incidence of genital *Chlamydia trachomatis* infection in the male partners attending an infertility clinic. *J Obstet Gynaecol* 2005; 25:364–7.
46. den Hartog JE, Lardenoije CM, Severens JL, Land JA, Evers JL, Kessels AG. Screening strategies for tubal factor subfertility. *Hum Reprod* 2008; 23:1840–8.
47. Machado AC, Guimarães EM, Sakurai E, et al. High titers of *Chlamydia trachomatis* antibodies in Brazilian women with tubal occlusion or previous ectopic pregnancy. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2007; 2007:24816.
48. Baud D, Regan L, Greub G. Emerging role of *Chlamydia* and *Chlamydia*-like organisms in adverse pregnancy outcomes. *Curr Opin Infect Dis* 2008; 21:70–6.

49. Ness RB, Soper DE, Richter HE, et al. Chlamydia antibodies, chlamydia heat shock protein, and adverse sequelae after pelvic inflammatory disease: the PID Evaluation and Clinical Health (PEACH) Study. *Sex Transm Dis* 2008; 35:129–35.
50. Wang SP, Grayston JT. Human serology in Chlamydia trachomatis infection with microimmunofluorescence. *J Infect Dis* 1974; 130:388-97.
51. Dowell SF, Peeling RW, Boman J, et al. Standardizing Chlamydia pneumoniae assays: recommendations from the Centers for Disease Control and Prevention (USA) and the Laboratory Centre for Disease Control (Canada). *Clin Infect Dis* 2001; 33:492–503
52. Morre SA, Munk C, Persson K, et al. Comparison of three commercially available peptide-based immunoglobulin G (IgG) and IgA assays to microimmunofluorescence assay for detection of Chlamydia trachomatis antibodies. *J Clin Microbiol* 2002; 40:584-7.
53. Tuuminen T, Palomäki P, Paavonen J. The use of serologic tests for the diagnosis of chlamydial infections. *J Microbiol Methods* 2000; 42:265-79.
54. Forsbach-Birk V, Simnacher U, Pfrepper KI, et al. Identification and evaluation of a combination of Chlamydial antigens to support diagnosis of severe and invasive Chlamydia trachomatis infections. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16:1237-44.
55. Baud D, Regan L, Greub G. Comparison of five commercial serological tests for the detection of anti-Chlamydia trachomatis antibodies. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2010; 29:669-75.
56. Jones CS, Maple PA, Andrews NJ, Paul ID, Caul EO. Measurement of IgG antibodies to Chlamydia trachomatis by commercial enzyme immunoassays and immunofluorescence in sera from pregnant women and patients with infertility, pelvic inflammatory disease, ectopic pregnancy, and laboratory diagnosed Chlamydia psittaci/Chlamydia pneumoniae infection. *J Clin Pathol* 2003; 56:225–9.
57. Mouton JW, Peeters MF, van Rijssort-Vos JH, Verkooyen RP. Tubal factor pathology caused by Chlamydia trachomatis: the role of serology. *Int J STD AIDS* 2002; 13:26–9.
58. Verkooyen RP, Peeters MF, van Rijsoort-Vos JH, Van der Meijden W, Mouton JW. Sensitivity and specificity of three new commercially available Chlamydia trachomatis tests. *Int J STD AIDS* 2002; 2:23–5.
59. Land JA, Gijsen AP, Kessels AG, Slobbe ME, Bruggeman CA. Performance of five serological chlamydia antibody tests in subfertile women. *Hum Reprod* 2003; 18:2621–7.
60. Bax CJ, Mutsaers JA, Jansen CL, Trimboos JB, Dorr PJ, Oostvogel PM. Comparison of serological assays for detection of Chlamydia trachomatis antibodies in different groups of obstetrical and gynecological patients. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003; 10:174–6.
61. Gazzard CM, Wood RN, Debattista J, Allan JA, Allan JM, Timms P. Use of a commercial assay for detecting the 60 kDa chlamydial heat shock protein in a range of patient groups. *Sex Transm Dis* 2006; 33:77–9.
62. Dutta R, Jha R, Salhan S, Mittal A. Chlamydia trachomatis-specific heat shock proteins 60 antibodies can serve as prognostic marker in secondary infertile women. *Infection* 2008; 36:374–8.
63. Bax CJ, Dörr PJ, Trimboos JB, et al. Chlamydia trachomatis heat shock protein 60 (cHSP60) antibodies in women without and with tubal pathology using a new commercially available assay. *Sex Transm Infect* 2004; 80:415–6.
64. Conwaj D, Glazener CM, Caul EO, et al. Chlamydial serology in fertile and infertile women. *Lancet* 1984; 1:191-3.
65. Richmond SJ, Caul EO. Fluorescent antibody studies in chlamydial infections. *J Clin Microbiol* 1975; 1:345-52.
66. Budrys NM, Gong S, Rodgers AK, et al. Chlamydia trachomatis antigens recognized in women with tubal factor infertility, normal fertility, and acute infection. *Obstet Gynecol* 2012; 119:1009-16.
67. Bunk S, Susnea I, Rupp J, et al. Immunoproteomic identification and serological responses to novel Chlamydia pneumoniae antigens that are associated with persistent C. pneumonia infections. *J Immunol* 2008; 180:5490-8.
68. Wang J, Zhang Y, Lu C, Lci L, Yu P, Zhong G. A genome-wide profiling of the humoral immune response to Chlamydia trachomatis infection reveals vaccine candidate antigens expressed in humans. *J Immunol* 2010; 185:1670-80.
69. Rodgers AK, Budrys NM, Gong S, et al. Genome-wide identification of Chlamydia trachomatis antigens associated with tubal factor infertility. *Fertil Steril* 2011; 96:715-21.
70. Puolakkainen M. Laboratory diagnosis of persistent human chlamydial infection. *Front Cell Infect Microbiol* 2013; 3:99.