

Chlamydia trachomatis – charakterystyka patogenu i diagnostyka zakażeń

Chlamydia trachomatis – characteristics and diagnostics of infections

Justyna Gornowicz

Katedra i Klinika Dermatologii Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, kierownik Katedry i Kliniki: prof. dr hab. n. med. Wojciech Silny

Post Dermatol Alergol 2008; XXV, 3: 125–128

Streszczenie

Chlamydie są bakteriami, które wywołują wiele schorzeń, w tym o przebiegu niejawnym. *Chlamydia trachomatis* (*Chl. trachomatis*) uważana jest na świecie za bakterię najczęściej przenoszoną drogą płciową. Stosowanie metod skryningowych umożliwia redukcję komplikacji będących wynikiem zakażenia chlamydiami. Molekularne metody detekcji patogenu, takie jak reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR) czy reakcja łańcuchowa ligazy (LCR), przyczyniają się do stałego postępu w laboratoriach diagnostycznych. Techniki amplifikacji kwasu nukleinowego (NAAT) umożliwiają lepszą identyfikację patogenu, a także dostarczają prostych, czułych, szybkich i wiarygodnych sposobów wykrywania danego organizmu. Fakt ten czyni opisane metody bardzo dogodnym narzędziem do celów diagnostycznych. W niniejszej pracy przedstawiono biologię i systematykę *Chl. trachomatis* oraz metody diagnostyczne obejmujące zarówno metody hodowlane, jak i metody nieoparte na kulturach komórkowych.

Słowa kluczowe: *Chlamydia trachomatis*, metody diagnostyczne, techniki amplifikacji kwasu nukleinowego (NAAT).

Abstract

Chlamydia are bacteria which cause several diseases, including ones with lethal course. *Chlamydia trachomatis* is the most common sexually transmitted bacteria worldwide. Screening for chlamydial infection might reduce the incidence of complications of disease. Molecular methods of pathogen detection such as polymerase chain reaction (PCR) and ligase chain reaction (LCR) are making increasing progress in diagnostic laboratories. Nucleic acid amplification techniques (NAAT) allow better identification of the pathogen and provide a simple, sensitive, rapid and reliable means for detection of the organism. This fact makes these methods a very convenient tool. In this article the biology and systematics of *Ch. trachomatis* and diagnostic methods, including culture methods and non-culture methods for detection of *Ch. trachomatis*, are presented.

Key words: *Chlamydia trachomatis*, diagnostic methods, nucleic acid amplification techniques (NAAT).

Profil patogenu

Chlamydie są drobnoustrojami wykazującymi cechy pośrednie między bakteriami a wirusami. Wcześniej panował pogląd, że są one wirusami, z czasem – na podstawie analizowanych cech biochemicznych – chlamydie zostały zaliczone do bakterii. Mają one RNA i DNA w proporcji charakterystycznej dla organizmów prokariotycznych. Genom omawianego patogenu jest bardzo mały (względna masa cząsteczkowa $0,66 \times 10^9$) i odpowiada jedynie 1/4 informacji genetycznej *Escherichia coli* [1].

Chlamydie są Gram-ujemnymi, tlenowymi, obligatoryjnymi wewnątrzkomórkowymi patogenami. Ponieważ nie mają własnego systemu wytwarzającego ATP, muszą korzystać z innych źródeł energii, co czyni je zależnymi od metabolizmu gospodarza. Bywają przez to określane mianem *paszytów energetycznych* [1, 2].

Z punktu widzenia systematyki *Chlamydia trachomatis* (*Chl. trachomatis*) jest gatunkiem należącym do rodzaju *Chlamydia*, klasyfikowanym w obrębie rodziny *Chlamydiaceae*, która należy do rzędu *Chlamydiales* [3]. Wśród istniejących gatunków należących do rzędu

Adres do korespondencji: mgr inż. biotech. Justyna Gornowicz, ul. Dobrodzieńska 5/10, 60-162 Poznań, tel. +48 603 222 280, e-mail: justynagornowicz1@poczta.onet.pl

Chlamydiales Chlamydia trachomatis i *Chlamydia pneumoniae* (*Chl. pneumoniae*) są znanymi ludzkimi patogenami. Mimo niewielkiego podobieństwa, genetyczne mapowanie tych dwóch gatunków dowiodło, iż 70 genów występujących u *Chl. trachomatis* nie istnieje u *Chl. pneumoniae* [2].

Gatunek *Chl. trachomatis* obejmuje dwa biotypy – *trachoma* i *lymphogranuloma venereum* (LGV) [3]. Ponadto ze względu na występujące w zewnętrznej warstwie ściany komórkowej białko wyodrębniono odpowiednie serotypy *Chl. trachomatis*. W obrębie biotypu *trachoma* wyróżniono 14 serotypów (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, Ba, Da, Ia), natomiast w biotypie LGV zidentyfikowano 4 serotypy (L₁, L₂, L_{2a}, L₃). Serotypy A, B i C wywołują jaglicę prowadzącą do ślepoty. Infekcje powodowane przez serotypy D-K prowadzą do zapalenia spojówek, cewki moczowej, szyjki macicy oraz odbytnicy. Serotypy L₁-L₃ powodują ziarnicę weneryczną pachwin – chorobę przenoszoną drogą płciową, która spotykana jest najczęściej w krajach tropikalnych, a także stosunkowo często szerzy się wśród mężczyzn homoseksualnych [2].

Cykl rozwojowy bakterii i proces infekcji

Chlamydia trachomatis przechodzi unikalny, dwufazowy cykl rozwojowy, trwający 48–72 godz., odznaczający się istnieniem dwóch form morfologicznych [3]. Podczas pierwszej fazy – infekcyjnej – formują się ciałka elementarne (ang. *elementary body* – EB), które są cząsteczkami pozakomórkowymi, zakaźnymi, lecz nieaktywnymi metabolicznie. W formie EB bakterie nie podlegają replikacji. Ciałka elementarne przyczepiają się do komórek gospodarza, a następnie wnikają do nich przez indukowanie własnej endocytozy. Po wniknięciu EB do komórki powstaje specyficzny twór określany mianem inkluzji (wtrętu), wewnątrz którego ciałka elementarne różnicują się w ciałka retikularne, zwane też ciałkami siateczkowatymi (ang. *reticulate body* – RB). Dzięki istnieniu inkluzji eliminowana jest możliwość fuzji z lizosomem komórki. Opisana sekwencja zdarzeń stanowi o przejściu w drugą fazę – replikacyjną. Nazwa tego etapu wywodzi się stąd, że RB są aktywne metabolicznie i mają zdolność namnażania się przez podział. Należy zaznaczyć, iż ciałka retikularne nie stanowią postaci infekcyjnej. Pod koniec cyklu replikacji RB ponownie przekształcają się w ciałka elementarne, które są uwalniane z komórki na drodze egzocytozy lub przez lizę komórek gospodarza. Prawdopodobnie zdolność patogenu do przeżycia fagocytozy i destrukcji powodowanej działaniem enzymów lizosomalnych uwarunkowana jest unikalną strukturą jego ściany komórkowej. Jej budowa charakteryzuje się bogactwem cysteiny i lipopolisacharydów, co zapewnia bakterii ochronę. Uwolnione ciałka elementarne mogą zapoczątkować nowy cykl zakażenia [2, 4–7].

Obserwowana na końcu procesu infekcyjnego śmierć komórek gospodarza może częściowo przyczynić się

do wystąpienia u niego odpowiedzi zapalnej. Proces ten jest powodowany wydzielaniem cytokin przez makrofagi poddane apoptozie. Chroniczne zapalenie odpowiada także za procesy bliznowacenia, które są obserwowane podczas przebiegu chorób wywołanych tym patogenem. Przyjmuje się, że czynnik martwicy nowotworów α (ang. *tumour necrosis factor α* – TNF- α) i inne cytokiny zaangażowane w reakcję obronną, oprócz zwalczania infekcji mogą powodować długoterminowe szkody w tkankach [5]. Wykazano także, iż oprócz wpływu na cytotoxycytność cytokin, zakażenie chlamydiami wpływa na liczbę limfocytów T i ich subpopulacje. Sugeruje się, że główną rolę w odpowiedzi przeciw *Chl. trachomatis* odgrywają subpopulacje limfocytów T, takie jak Th, Tc i limfocyty z receptorem Tg- δ [8].

Epidemiologia

Chlamydia trachomatis jest najbardziej rozpowszechnioną na świecie bakterią przenoszoną drogą płciową [9, 10]. Najczęściej zakażenia obserwuje się wśród mężczyzn między 20. a 24. rokiem życia oraz u kobiet między 16. a 19. rokiem życia [2]. Ponieważ infekcja u większości kobiet przebiega bezobjawowo, część z nich pozostaje nieleczona, co ostatecznie może doprowadzić do zapalenia narządów miednicy mniejszej (ang. *pelvic inflammatory disease* – PID). Zapalenie to stanowi duże zagrożenie, ponieważ niezdiagnozowane i nielezione może skutkować ciążą pozamaciczną, bezpłodnością lub tzw. zespołem przewlekłego bólu narządów miednicy [11]. Stwierdzono, że częstość występowania *Chl. trachomatis* u niepłodnych pacjentów może sięgać 60% [12]. Sugeruje się, że stany przewlekłego zakażenia tym patogenem mogą stanowić przyczynę raka szyjki macicy [3].

Zakażenie *Chl. trachomatis* jest groźne podczas ciąży, gdyż może wywoływać przedwczesny poród lub nawet śmierć okołoporodową płodu. Niebezpieczeństwo stanowi fakt, iż infekcja tym patogenem może być wertykalnie przekazana podczas porodu i powodować u noworodków zapalenie spojówek, a także płuc. U mężczyzn zakażenie *Chl. trachomatis* zagraża powikłaniami, takimi jak zapalenie cewki moczowej, gruczołu krokowego czy, zwłaszcza u młodych mężczyzn, najądrzy [6, 9]. Zakażenia chlamydialne mogą także powodować niepłodność wskutek zaburzenia budowy i funkcji plemników lub w wyniku indukowania odpowiedzi immunologicznej prowadzącej do wytwarzania autooprzeciwciał przeciw plemnikom [3].

Ostatnio wykazano, że istnieje powiązanie między infekcjami *Chl. trachomatis* a zmianami miażdżycowymi w naczyniach krwionośnych. Przypuszcza się, że w ten proces zaangażowane jest białko szoku cieplnego chlamydii – HSP57, które wykazuje homologię z białkiem ludzkim. Odkryto mianowicie, iż HSP57 dzieli epitopy z ludzkim białkiem szoku cieplnego – HSP60 [12, 13].

Z historycznego punktu widzenia najstarszą chorobą wywoływaną przez *Chl. trachomatis* jest *trachoma* (jaglica). Zmiany powstałe w jej wyniku mogą prowadzić do ograniczenia pola widzenia, a nawet całkowitej utraty wzroku [3].

Diagnostyka zakażeń

Infekcje wywołane przez *Chl. trachomatis* nie dają charakterystycznego obrazu klinicznego i często przebiegają bezobjawowo lub skąpoobjawowo, co utrudnia ich rozpoznanie. W diagnostyce zakażenia tymi bakteriami zachodzi szybki postęp, co budzi nadzieje na umożliwienie wiarygodnej, szybkiej i prostej detekcji patogenu oraz dostępu do testów diagnostycznych do samodzielnego wykonania w domu.

Metody diagnostyczne znajdujące zastosowanie w wykrywaniu *Chl. trachomatis* można ogólnie podzielić na dwie kategorie. Są to metody oparte na hodowlach komórkowych (metody hodowlane) i nieoparte na kulturach komórkowych [2]. Szczególną uwagę należy zwrócić na diagnostykę molekularną, która ostatnio rozwija się bardzo dynamicznie, wywołując coraz szersze zainteresowanie i zastosowanie w laboratoriach diagnostycznych.

Metody hodowlane

Metody hodowlane to klasyczne metody polegające na detekcji *Chl. trachomatis* w hodowli komórkowej zakażonej odpowiednim materiałem. Wykrywanie patogenu występuje w hodowli na komórkach McCoy'a (komórki fibroblastów mysich). Do niedawna metody te określano mianem *złotego standardu* diagnostycznego w zakażeniach *Chl. trachomatis*, co zawdzięczały blisko 100-procentowej swoistości. Natomiast czułość tych metod jest stosunkowo mała i zależy od rodzajów badanych materiałów [2, 6]. Ponadto charakteryzują się one czasochłonnością oraz uzależnieniem od transportu badanych próbek. Jednak ze względu na fakt dużej swoistości pozostają one metodami z wyboru przydatnymi do weryfikacji wyników innych badań, a także do rozwiązywania kwestii sądowno-lekarskich.

Metody oparte na wykrywaniu antygenów *Chlamydia trachomatis*

Przy użyciu swoistych przeciwciał możliwe jest bezpośrednio wykazanie antygenów *Chl. trachomatis* w badanym materiale. Detekcja tak powstałych kompleksów opiera się na reakcji enzymatycznej lub fluorescencji. Do technik wykrywających antygen zaliczyć można dwa testy – immunofluorescencję bezpośrednią (ang. *direct immunofluorescence* – DIF) i metody immunoenzymatyczne (ang. *enzyme immunoassay* – EIA). Cechują się one relatywnie małą czułością (70–80%) oraz dużą swoistością (96–100%) [6].

Metoda DIF jest oparta na bezpośredniej wizualizacji ciałek elementarnych *Chl. trachomatis*. W teście tym stosuje się przeciwciała monoklonalne, znakowane izotiocyanianem fluoresceiny. Umożliwia on detekcję zarówno lipopolisacharydu (LPS), jak i głównego białka membrany zewnętrznej (ang. *major outer membrane protein* – MOMP) *Chl. trachomatis*. Technika ta – ze względu na czasochłonność oraz pracochłonność – jest niezbyt użyteczna dla dużej liczby próbek.

W metodzie EIA za pomocą przeciwciała znakowanego enzymem wzbudzającym barwę wykrywanym antygenem jest LPS *Chl. trachomatis*. Występowanie w badanym materiale innych Gram-ujemnych bakterii, z którymi mogą krzyżowo reagować zastosowane w teście przeciwciała, stwarza możliwość powstania fałszywie dodatnich wyników [14]. Niewątpliwą zaletą tego testu jest niewysoka cena oraz możliwość wykonania za jego pomocą dużej liczby badań. Przydatność testu immunoenzymatycznego w badaniach epidemiologicznych oraz jego szerokie zastosowanie w programach skryningowych opisano już w 1987 r., w pionierskiej pracy z tej dziedziny w Polsce [15].

Techniki amplifikacji kwasu nukleinowego

Szerokie stosowanie technik molekularnych opartych na powielaniu kwasów nukleinowych zrewolucjonizowało diagnostykę zakażeń *Chl. trachomatis*. Pozwalają one na wykrycie już niewielkiej liczby DNA lub RNA drobnoustroju. Techniki amplifikacji kwasu nukleinowego (ang. *nucleic acid amplification techniques* – NAAT) wyróżniają się zarówno wysoką swoistością (>99%), jak i czułością (>90%) – niekiedy można wykryć obecność nawet pojedynczych sekwencji nukleotydowych w próbce. Niekwestionowaną zaletą tego rodzaju metod jest wiarygodność wyników uzyskanych za pomocą badań próbek pozyskanych nieinwazyjnie (np. próbki moczu). Dzięki temu NAAT stanowi alternatywną, potencjalnie nietraumatyczną opcję detekcji *Chl. trachomatis* – do badań mogą być wykorzystane zarówno wymazy z narządów płciowych, jak i próbki moczu. Ten atut powoduje, że NAAT są technikami akceptowanymi przez większość pacjentów. Wcześniejsze metody niehodowlane (DIF, EIA) okazały się w tym względzie nieakceptowalne, szczególnie wśród populacji ofiar przestępstw seksualnych. Brak aprobaty wyniku z jednej strony ze stosunkowo niewiarygodnych wyników, z drugiej – z konieczności zastosowania inwazyjnych i potencjalnie traumatycznych metod pobierania próbek [16]. Nieinwazyjne pobieranie próbek stwarza większą możliwość przebadania pacjentów niewykazujących objawów zakażenia, a także dzieci. Fakt ten umożliwia zastosowanie NAAT na szerszą skalę. Dzięki ułatwieniu wcześniejszej detekcji patogenu, leczenia i przerwania procesu przekazywania zakażenia, techniki te odgrywają istotną rolę w epidemiologii [17]. Z kolei automatyzacja metod opartych na powielaniu kwasów nukleinowych umożliwia zastosowanie ich do programów przesiewowych (skryningowych).

Metody te jednak nie są bez wad. Istotnymi minusami tego typu testów są wysoki koszt, spowodowany koniecznością wyszkolenia personelu i zużyciem materiału, oraz redukcja wydajności wywołana obecnością inhibitorów (estrogeny, azotany, kryształki) w próbkach moczu [2]. Innym ograniczeniem omawianej techniki może być kontaminacja próbek przyczyniająca się do uzyskania fałszywych wyników. Dlatego też należy szczególnie przestrzegać procedur postępowania w laboratorium oraz podczas transportu i przechowywania próbek [17].

W obrębie NAAT dostępnych jest kilka metod opartych na różnych technologiach i obejmujących [2, 6]:

- reakcję łańcuchową polimerazy (ang. *polymerase chain reaction* – PCR) – polegającą na amplifikacji określonej sekwencji plazmidowego DNA, niewykazującego homologii z innymi mikroorganizmami; amplifikacja genu MOMP umożliwia szybką detekcję *Chl. trachomatis* w hodowlach komórkowych lub próbkach pochodzących bezpośrednio od chorych; najważniejszym zastosowaniem PCR w diagnostyce jest wykorzystanie tej techniki do uzyskania zwiększonej liczby DNA przed jego dalszą analizą;
- reakcję łańcuchową ligazy (ang. *ligase chain reaction* – LCR) – różni się od PCR tym, że stosuje się w niej nie dwa, lecz cztery oligonukleotydowe startery dobrane parami tak, że komplementarne do nich sekwencje są zlokalizowane na analizowanym odcinku DNA w bezpośrednim sąsiedztwie; w reakcji bierze udział termostabilna ligaza, a amplifikacji podlegają dwa już zligowane produkty powstałe w pierwszym cyklu; LCR może być użyteczna tam, gdzie barwienie immunohistochemiczne nie znajduje zastosowania; wynika to z faktu, iż barwienie immunohistochemiczne jest odpowiednio przy analizowaniu sekwencji o długości 200–400 pz; natomiast technika LCR przydatna jest w przypadku analizowania sekwencji mniejszych – już od 48 pz [18];
- reakcję łańcuchową polimerazy w czasie rzeczywistym (ang. *real-time PCR*) – wymaga ona zastosowania specjalnych termocyklorów sprzężonych ze spektrofлуorymetrem; w reakcji biorą udział dwa startery i dwie sondy komplementarne do blisko położonych względem siebie sekwencji genomu *Chl. trachomatis*; jedna z sond wyznakowana jest na końcu 5', a druga na końcu 3' przy zastosowaniu innego fluorochromu;
- testy oparte na amplifikacji rybosomalnego RNA (rRNA) *Chl. trachomatis* przez transkrypcję (ang. *transcription mediated amplification* – TMA);
- amplifikację z przesunięciem łańcucha (ang. *strand displacement amplification* – SDA) – w czasie reakcji w stałej temperaturze zachodzi amplifikacja i detekcja DNA (powstające produkty amplifikacji indukują sygnał fluorescencyjny proporcjonalny do liczby produktów).

Piśmiennictwo

1. Schlegel HG. Bezwzględne pasożyty komórkowe. W: Mikrobiologia ogólna. Mostowik K (red.). Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2004; 158-60.
2. Manavi K. A review on infection with *Chlamydia trachomatis*. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol 2006; 20: 941-51.
3. Pawlikowska M, Deptuła W. Choroby u ludzi spowodowane chlamydiami i chlamydofilami. Postępy Hig Med Dośw 2007; 61: 708-17.
4. Amin AS. Comparison of polymerase chain reaction and cell culture for the detection of *Chlamydia* species in the semen of bulls, buffalo-bulla, and rams. Vet J 2003; 166: 86-92.
5. Perfettini JL, Hospital V, Stahl L, et al. Cell death and inflammation during infection with the obligate intracellular pathogen, *Chlamydia*. Biochimie 2003; 85: 763-9.
6. Friedek D, Ekiel A, Martirosian G. *Chlamydia trachomatis*: etiopatogeneza i diagnostyka zakażeń. Przegl Epidemiol 2005; 59: 723-30.
7. Loomis WP, Starnbach MN. T-cell responses to *Chlamydia trachomatis*. Curr Opin Microbiol 2002; 5: 87-91.
8. Pawlikowska M, Deptuła W. Swoista odporność komórkowa a chlamydie i chlamydofile. Postępy Hig Med Dośw 2005; 59: 510-6.
9. Mikamo H, Ninomiya M, Tamaya T. Sensitivity of polymerase chain reaction to determine *Chlamydia trachomatis* eradication rate with levofloxacin therapy in patients with chlamydial cervicitis. Curr Therap Res 2003; 64: 375-7.
10. Smelov V, Krylova T, Smelova N, Norman L. Azithromycin treatment follow-up: antibacterial susceptibility of *Chlamydia trachomatis* in patients with chronic prostatitis. Int J Antimicrob Agents 2004; 23: 79-82.
11. Cassell JA, Mercer CH, Fenton KA, et al. A comparison of the population diagnosed with chlamydia in primary care with that diagnosed in sexual health clinics: Implications for a national screening programme. Pub Health 2006; 120: 984-8.
12. Cortiñas P, Muñoz MG, Loureiro CL, et al. Follicular fluid antibodies to *Chlamydia trachomatis* and human heat shock protein-60 kDa and infertility in women. Arch Med Res 2004; 35: 121-5.
13. Bazala E, Renda J. Latent chlamydial infections: The probable cause of a wide spectrum of human diseases. Med Hypotheses 2005; 65: 578-84.
14. Hollblad-Fadiman K, Goldman SM. American College of Preventive Medicine practice policy statement – Screening for *Chlamydia trachomatis*. Am J Prev Med 2003; 24: 287-92.
15. Żaba R, Łączkowska M, Bowszyc J, et al. Immunoenzymatyczny test Chlamydiazyme (Abbott) w diagnostyce zakażeń układu moczowo-płciowego. Przegl Dermatol 1987; 1: 44-50.
16. Kellogg ND, Baillargeon J, Lukefahr JL, et al. Comparison of nucleic acid amplification tests and culture techniques in the detection of *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* in victims of suspected child sexual abuse. J Ped Adol Gynecol 2004; 17: 331-9.
17. Stary A. *Chlamydia trachomatis*: screening programs and the nucleic acid amplification assays. Clin Dermatol 2002; 20: 164-9.
18. Noguchi Y, Yabushita H, Noguchi M, et al. Detection of *Chlamydia trachomatis* infection with DNA extracted from formalin-fixed paraffin-embedded tissues. Diagn Microbiol Infect Dis 2002; 43: 1-6.