

PRACE ORYGINALNE • ORIGINAL PAPERS

Czułość i swoistość testu end-point PCR w porównaniu z metodą fluorescencji pośredniej w świetle badań własnych

Sensitivity and specificity of the end-point PCR test in comparison with indirect fluorescence method in the light of own medical tests

IRENA CHOROSZY-KRÓL^{A, G}, JAKUB HETMAŃCZYK^{B, F}, MAGDALENA FREJ-MĄDRZAK^{C, E}, JOLANTA SAROWSKA^{D, B}, DOROTA TERYKS-WOŁYŃCIEC^E, AGNIESZKA JAMA-KMIECIK^{F, C}

Zakład Nauk Podstawowych Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu

A – przygotowanie projektu badania, **B** – zbieranie danych, **C** – analiza statystyczna, **D** – interpretacja danych, **E** – przygotowanie maszynopisu, **F** – opracowanie piśmiennictwa, **G** – pozyskanie funduszy

Streszczenie Wstęp. Na podstawie wyników badań 100 osób bez objawów ze strony układu oddechowego w wieku 20–69 lat dokonano oceny czułości i swoistości dwóch technik diagnostycznych używanych do identyfikacji *Chlamydomphila pneumoniae* (*Chlp.*).

Cel pracy. Ocena czułości i swoistości testu end-point PCR firmy GeneProof w porównaniu z metodą immunofluorescencji pośredniej.

Materiał i metody. Przedmiotem badań były wymazy z tylnej ściany gardła pochodzące głównie od pracowników i studentów UM we Wrocławiu. Badanie w kierunku *Chlp.* wykonywano dwiema technikami IF pośredniej (IFp) oraz techniką PCR.

Wyniki. Przeprowadzono analizę zgodności wyników badań wykrywających zakażenia *Chlp.* otrzymanych dwoma metodami: techniką IFp i end-point PCR. Były one zgodne w 85% przypadków. Metodą IFp częściej wykrywano antygen *Chlp.* (15%) niż gen bakteryjny techniką PCR (8%).

Wnioski. Zgodność wyników badań w kierunku *Chlp.* wykonanych techniką IFp i PCR wynosiła 85%. Mając na uwadze czułość i swoistość obu testów, zalecane jest wykonywanie badań w kierunku *Chlp.* testem IFp z uwagi na niższy koszt badania i wyższą czułość.

Słowa kluczowe: *Chlamydomphila pneumoniae*, czułość, swoistość.

Summary Background. Based on the testing results of 100 people without any symptoms from the respiratory system aged 20–69 an evaluation of sensitivity and specificity of two diagnostic techniques used for identifying *Chlp.* was carried out.

Objectives. The authors evaluated sensitivity and specificity of the GeneProof end-point PCR test compared to indirect immunofluorescence.

Material and methods. The subject of examination was the smear collected from the back side of the throat obtained from students and staff working in MU Wrocław. The *Chlp.* test was conducted by two techniques, i.e. indirect IF technique and PCR technique.

Results. The analysis of consistency of *Chlp.* test results was conducted. It involved two methods: the indirect IF technique and the end-point PCR technique. They were consistent in 85% cases. The *Chlp.* antigens were detected more frequently (15%) by the indirect IF method than the bacterial gene by the PCR technique (8%).

Conclusions. Consistency of *Chlp.* test results carried out by IFP and PCR technique was 85%. Considering sensitivity and specificity of both tests, it is advised to perform the *Chlp.* test by IFP due to lower cost and higher sensitivity.

Key words: *Chlamydomphila pneumoniae*, sensitivity, specificity.

Wstęp

Technika PCR stworzyła nowe możliwości wykrywania *Chlamydomphila pneumoniae* (*Chl. pneumoniae*) – drobnoustroju odpowiedzialnego za m.in. zmiany zapalne w obrębie układu oddechowego [1]. Diagnostyka zakażeń *Chl. pneumoniae* opiera się także na metodzie hodowli tkankowej (wykrywanie ciałek wtętowych) oraz immunofluorescencji (wykrywanie ciałek elementarnych i wtętowych). Ta ostatnia technika najbardziej nadaje się do badań masowych.

Cel pracy

Celem pracy była ocena czułości i swoistości testu end-point PCR firmy GeneProof w porównaniu ze stosowaną przez autorów rutynowo metodą immunofluorescencji pośredniej.

Materiał i metody

Badaniami objęto 100 osób bez objawów klinicznych zakażenia układu oddechowego, w tym 26 mężczyzn i 74 kobiet. Wiek badanych mieścił się w granicach 20–69 lat. Przedmiotem badania były wymazy z tylnej ściany gardła, które pobierano w godzinach porannych, na czczo, bez stosowania zabiegów higienicznych jamy ustnej. Materiał pobierano zgodnie z obowiązującymi procedurami [1]. Grupę badaną stanowili głównie pracownicy i studenci UM we Wrocławiu.

Badania bakteriologiczne w kierunku *Chl. pneumoniae* wykonano techniką immunofluorescencji pośredniej z użyciem monoklonalnych przeciwciał znakowanych izotocjanianem fluoresceiny FITC (Chlamydia CEL PN-IFT test firmy Cellabs) oraz mikroskopu fluorescencyjnego firmy Olympus.

Do wykrywania DNA wykorzystano zestaw diagnostyczny PCR-Chlamydia pneumoniae KIT firmy GeneProof umożliwiający wykrycie DNA za pomocą polimerazowej reakcji łańcu-

chowej (PCR). Wszystkie badania zostały wykonane zgodnie z zaleceniami instrukcji producentów odczynników [2, 3].

Wyniki i omówienie

Porównanie wyników badań uzyskanych metodą IF pośredniej i techniką end-point PCR przedstawia tabela 1.

Przy użyciu dwóch technik diagnostycznych wyniki zgodne stwierdzono u 85/100 (85%) badanych, w tym zgodnie dodatnie [IF+ PCR+] u 4/100 (4%), a zgodnie ujemne [IF- PCR-] – u 81/100 (81%). Wyniki niezgodne stanowiły dużo niższy odsetek i wykazano je u 15/100 (15%) ogółu badanych w tym [IF+ PCR-] u – 11/100 (11%), a [IF- PCR+] – 1 u 4/100 (4%).

Tabela 1. Porównanie wyników badań uzyskanych metodą immunofluorescencji pośredniej i techniką end-point PCR

Liczba badanych	Wyniki badań wymazów w kierunku <i>Chlamydia pneumoniae</i>			
	Wyniki zgodne dodatnie [%]	Wyniki zgodne ujemne [%]	Wyniki niezgodne [%]	
	IF+ PCR+	IF- PCR-	IF+ PCR-	IF- PCR+
100	4,0	81,0	11,0	4,0
Razem	85,0		15,0	

Tabela 2. Ocena czułości i swoistości testu IF pośredniej w porównaniu z techniką PCR

	PCR dodatni 8	PCR ujemny 92	Ogółem
IFp dodatni	4	11	15
IFp ujemny	4	81	85

Czułość: 4/8 (50%), swoistość: 81/92 (88%).

Tabela 3. Porównanie czułości i swoistości testu PCR w porównaniu z testem IFp

IF		+	-
PCR	+	4	4
	-	11	81

Czułość: 4/15 (26,7%), swoistość: 81/85 (95,3%).

Ocenę czułości i swoistości testu end-point PCR vs. IFp oraz IFp vs. end-point PCR przedstawiają tabele 2–3. Wynika z nich, że w porównaniu z metodą IFp czułość testu end-point PCR wynosiła 50%, a swoistość 88%. Czułość i swoistość wyliczono z następujących wzorów:

$$\text{czułość} = \frac{\text{liczba wyników dodatnich w obu testach}}{\text{liczba wyników ujemnych w jednym z testów}}$$

$$\text{swoistość} = \frac{\text{liczba wyników ujemnych w obu testach}}{\text{liczba wyników ujemnych w jednym z testów}}$$

Technika end-point PCR okazała się być mniej czułą niż metoda immunofluorescencji pośredniej.

Porównanie wyników badań własnych z doniesieniami z piśmiennictwa wskazuje, że istnieje duża zgodność danych dotyczących odsetka swoistości testu PCR, ocenianego ogółem na 87,5–99,0% [4].

Gaydos i wsp. [5] analizowali użyteczność testu PCR, hodowli tkankowej i immunofluorescencji pośredniej. Badania czułości i swoistości poszczególnych metod wykazały, że w przypadku zastosowania techniki IF pośredniej w porównaniu z metodą hodowli na komórkach Hep 2 czułość wynosiła 76,5%, a swoistość – 99,0%. Dla porównania przy użyciu techniki PCR i IF pośredniej wyniki czułości wynosiły 87,5%, a swoistość – 99,0%. Jedynie Hyman i wsp. [6] podali niższe odsetki w odniesieniu do wymazów z gardła. Znacznie większe różnice dotyczą oceny czułości omawianego testu, zwłaszcza przy użyciu go do badania różnych populacji [4–6].

Według autorów cytowanych w niniejszej pracy, czułość testu PCR była ogółem wyższa i wynosiła 76,5–87,5%; w badaniach własnych wynosiła ona zaledwie 50%. Wiadomo jednak, że między czułością i swoistością każdego testu istnieje pewne ekwilibrium, które powoduje, że im większa czułość, tym mniejsza swoistość, i odwrotnie. Cytowani w pracy autorzy przyznają, że test PCR jest bardzo dokładną techniką identyfikacji genów *Chl. pneumoniae*, jednak z uwagi na wysoki koszt, czasochłonność i długi czas oczekiwania na wynik nie nadaje się do badań masowych [6, 7].

Naszym zdaniem przy badaniach masowych wystarczająca i bardziej dostępna jest metoda immunofluorescencji pośredniej. Przy jednorazowym pobraniu materiału żadna pojedyncza technika badań nie wykrywa jednak wszystkich przypadków zakażeń.

Wnioski

1. Zgodność wyników badań w kierunku *Chl. pneumoniae* wykonanych techniką IFp i PCR wynosiła 85%.
2. Mając na uwadze czułość i swoistość obu testów, zalecane jest wykonywanie badań w kierunku *Chl. pneumoniae* testem IFp z uwagi na niższy koszt badania i wyższą czułość.

Piśmiennictwo

1. Jama-Kmieciak A, Noga L, Choroszy-Król I. Diagnostyka zakażeń wywołanych *Chlamydia pneumoniae*. *Fam Med Prim Care Rev* 2010; 12(2): 44–50.
2. Cellabs: Protokół produktu Chlamydia CEL PN.
3. Gene Proof: Protokół zestawu *Chlamydia pneumoniae* PCR Kit.
4. Choroszy-Król I, Frej-Mądrzak M, Jama-Kmieciak A, et al. Detection of *Chlamydia pneumoniae* antigens in patients with chronic cough. Wykrywanie antygenów EB *Chlamydia pneumoniae* u pacjentów z kaszlem przewlekłym. *Adv Exp Med Biol* 2013; 788: 47–50.
5. Gaydos CA, Roblin PM, Hammerschlag MR, et al. Diagnostic utility of PCR-enzyme immunoassay, culture, and serology for detection of *Chlamydia pneumoniae* in symptomatic and asymptomatic patients. *J Clin Microbiol* 1994; 12: 903–905.
6. Hyman CL, Roblin PM, Gaydos CA, et al. Prevalence of asymptomatic nasopharyngeal carriage of *Chlamydia pneumoniae* in subjectively healthy adults: assessment by polymerase chain reaction – enzyme immunoassay and culture. *Clin Infect Dis* 1995; 20(5): 1174–1178.

7. Choroszy-Król I, Frej-Mądrzak M, Hober M. i wsp. Częstość zakażeń układu oddechowego u dorosłych wywołana przez *Chlamydomydia pneumoniae*. *Fam Med Prim Care Rev* 2012; 14(2): 141–144.

Adres do korespondencji:

Prof. dr hab. Irena Choroszy-Król
Zakład Nauk Podstawowych UM
ul. Chałubińskiego 4
50-368 Wrocław
Tel.: 71 784-00-76
E-mail: irena.choroszy-krol@umed.wroc.pl

Praca wpłynęła do Redakcji: 23.01.2014 r.

Po recenzji: 14.04.2014 r.

Zaakceptowano do druku: 14.04.2014 r.