

PRACE ORYGINALNE • ORIGINAL PAPERS

**Nowy przesiewowy test diagnostyczny w kierunku
Chlamydomphila pneumoniae – doniesienie wstępne****New screening diagnostic test for detecting *Chlamydomphila pneumoniae*
– preliminary data**

BARTOSZ J. SAPILAK^{1, A, C-G}, MAGDALENA FREJ-MĄDRZAK^{2, B, D}, AGNIESZKA JAMA-KMIECIK^{2, B, D},
DOROTA TERYKS-WOŁYNIEC^{2, B, D}, AGNIESZKA MUSZYŃSKA^{1, F}, ANDRZEJ STECIWKO^{1, G},
GRAŻYNA GOŚCINIAK^{3, B}, IRENA CHOROSZY-KRÓL^{2, A, B, D}

¹ Katedra i Zakład Medycyny Rodzinnej Akademii Medycznej we Wrocławiu
Kierownik: prof. dr hab. med. Andrzej Steciwko

² Zakład Nauk Podstawowych Akademii Medycznej we Wrocławiu
Kierownik: prof. dr hab. med. Irena Choroszy-Król

³ Katedra i Zakład Mikrobiologii Akademii Medycznej we Wrocławiu
Kierownik: prof. dr hab. Grażyna Gościniak

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

Streszczenie Wstęp. Liczba infekcji atypowych w praktyce lekarza pierwszego kontaktu od kilku lat utrzymuje się na wysokim poziomie. *Chlamydomphila pneumoniae* (*Chp*) są coraz częściej rozpoznawanym czynnikiem etiologicznym infekcji dróg oddechowych (zapalenia gardła, oskrzeli, płuc i zatok przynosowych), szczególnie u dzieci w wieku przedszkolnym i szkolnym. Zakażenie *Chp* przenosi się drogą kropelkową, okres inkubacji wynosi od 7 do 21 dni. Rezerwuarem infekcji jest wyłącznie człowiek. Wewnątrzkomórkowy cykl rozwoju sprawia, iż infekcja *Chp* rzadko manifestuje się nasilonymi objawami. Typowymi jej cechami są przewlekły kaszel i stany podgorączkowe.

Materiał i metody. Dotychczas dostępne metody diagnostyczne były dość drogie i czasochłonne. W zeszłym roku pojawił się w Polsce test paskowy firmy Biocard mający umożliwić szybką diagnostykę tego zakażenia już podczas badania chorego w gabinecie lekarskim. Aby ocenić jego rzeczywistą przydatność, przebadano 105 pacjentów z podejrzeniem infekcji *Chp* i 32 osoby potencjalnie zdrowe. Wszystkim badanym pobrano krew opuszkową, by przeprowadzić oznaczenie poziomu przeciwciał klasy IgM z wykorzystaniem szybkiego testu przesiewowego. W celu weryfikacji testu pacjentom pobrano także krew żylną i wymaz z gardła. W ten sposób uzyskano wynik z zastosowaniem techniki PCR, odczynu immunofluorescencyjnego (IF) oraz oznaczono rzeczywisty poziom przeciwciał klasy IgA, IgM i IgG.

Wyniki. Badany test przesiewowy dał wynik dodatni w 3 przypadkach – oznaczony metodą referencyjną rzeczywisty poziom przeciwciał był dodatni w dwu z nich. Wynik śladowo dodatni uzyskano w kolejnych 20 przypadkach – rzeczywisty poziom przeciwciał IgM był dodatni jedynie w jednym przypadku, w pozostałych 19 był ujemny.

Wnioski. 1. Poziom przeciwciał IgM nie może być brany pod uwagę jako jedyny marker zakażenia *Chp*. 2. Test przesiewowy firmy Biocard ma małą wartość diagnostyczną.

Słowa kluczowe: testy przesiewowe, *Chlamydomphila pneumoniae*, lekarz rodzinny.

Summary Background. Number of untypical infections has been high in recent years. *Chlamydomphila pneumoniae* (*Chp*) are one of the most common etiological factors of atypical upper respiratory tract infections, especially among children. The infection is a droplet one, with incubation period from 7 to 21 days. Its reservoir is another human. As the pathogen multiplies intracellularly the symptomatology is unconvincing. Typically patients suffering *Chp* infections have dry cough and the temperature in subfebrile range.

Material and methods. Available diagnostic methods have been relatively expensive and time-consuming so far. Just a year ago a new test appeared that should allow *Chp* infection diagnostics as soon as the patient undergoes medical examination. We examined 105 potentially infected patients and 32 ones from control group. To estimate clinical value of the IgM Biocard test we used PCR and IF methods. IgA, IgG and IgM antibodies were also indicated in both groups.

Results. Screening *Chp* IgM test was positive in 3 and uncertain in 20 patients. Standard diagnostic method revealed relatively only 2 and 1 positive results of IgM antibodies in those groups.

Conclusions. 1. The level of IgM antibodies cannot be taken into account as the only marker of infection *Chp*. 2. Biocard screening test has little diagnostic value.

Key words: screening tests, *Chlamydomphila pneumoniae*, family doctor.

Wstęp

Chlamydia pneumoniae, uprzednio *Chlamydia pneumoniae* (*Chp*) są coraz częściej rozpoznawanym czynnikiem etiologicznym infekcji dróg oddechowych (zapalenia gardła, oskrzeli, płuc i zatok przynosowych), szczególnie u dzieci w wieku przedszkolnym i szkolnym. Zakażenie przenosi się drogą kropelkową, okres inkubacji wynosi od 7 do 21 dni. Rezerwuarem infekcji jest wyłącznie człowiek.

Bakteria wykazuje tropizm do nabłonka dróg oddechowych, namnaża się w nich, a następnie niszczy na drodze lizy. Bytowanie wewnątrz komórki gospodarza powoduje, że wywołuje ona zakażenia przewlekłe, o charakterze nawracającym, utrzymujące się potencjalnie przez lata [1]. Podczas zakażenia dochodzi do zaburzenia ruchu rzęsek, rozwija się także swoista humoralna i komórkowa odpowiedź immunologiczna oraz miejscowy proces zapalny [2].

Badania populacyjne wykazały, iż 1/2 populacji ma przeciwciała przeciw *Chp*, a odsetek ten zwiększa się z wiekiem. Występują one u 10% dzieci między 5. a 10. r.ż., u 30–40% dorosłych oraz u ponad 80% osób w wieku podeszłym [3, 4]. Relatywnie niski poziom przeciwciał u dzieci < 5. r.ż. wynika najprawdopodobniej z faktu, iż *Chp* jest drobnoustrojem o niewielkiej immunogenności i do wywołania odpowiedzi humoralnej potrzebne jest wielokrotne zakażenie lub długotrwałe nosicielstwo [5, 6]. Ostre infekcje górnych dróg oddechowych o etiologii *Chp* występują u 10% dzieci < 2. r.ż., u 19% w wieku 2–4 lata. Także inni autorzy, w tym polscy, wykazali podobny odsetek zakażeń *Chp* – 14,1%, 13%, 45% [7–9].

Wewnątrzkomórkowy cykl rozwoju sprawia, iż infekcja *Chp* rzadko manifestuje się nasilonymi objawami. Typowymi symptomami są przewlekły kaszel i stany podgorączkowe. To właśnie suchy, nawracający kaszel, nieustępujący po standardowym leczeniu, nasuwa zazwyczaj podejrzenie infekcji *Chp* i powoduje, iż lekarz kieruje pacjenta na celowane badania diagnostyczne. Do pozostałych, rzadziej spotykanych, objawów zakażenia zalicza się: osłabienie, bóle głowy, objawy zapalenia gardła, uszu i błony śluzowej nosa.

Trudności techniczne oraz znaczne koszty badań laboratoryjnych sprawiają, iż diagnostyka zakażeń *Chp* nadal nie jest przeprowadzana rutynowo. Jest ona oparta na badaniach hodowli w komórkach, badaniach serologicznych (IF, OWD, ELISA), a także metodach biologii molekularnej (PCR). Dotychczas dostępnym materiałem diagnostycznym do badań były wymazy, plwocina, popłuczyny oraz krew. Wynik wymazu pacjent otrzymuje zazwyczaj po tygodniu, a poziom przeciwciał po 2–3 dniach.

Przeciwciała *Chp* klasy IgM pojawiają się po około 3 tygodniach od zakażenia i utrzymują się w surowicy przez 2–3 miesiące. Przeciwciała klasy

IgG pojawiają się później – po 6–8 tygodniach od początku infekcji i utrzymują się przez lata. W reinfekcji obserwuje się, wzrost miana przeciwciał klasy IgG oraz klasy IgA w drugim tygodniu choroby, poziom przeciwciał klasy IgM nie ulega wzrostowi.

Materiał i metody

Na rynku pojawił się test mający wspierać szybką, przesiewową diagnostykę infekcji *Chp* (Biocard *Chlamydia Pneumoniae* IgM). Test firmy Biocard ma wykrywać przeciwciała klasy IgM w krwi opuszkowej, czas wykonania oznaczenia wynosi zaledwie 5 minut. Pasek testowy zawiera przeciwciała anty-*Chp* klasy IgM znakowane złotem. Test działa na zasadzie immunochromatografii, po związaniu antygeny *Chp* na pasku zachodzi reakcja barwna. Do badania wystarcza 10 µl krwi włośniczkowej. Podawana przez producenta czułość metody wynosi 100%, a swoistość – 87,5%, ale zostało to potwierdzone badaniem na relatywnie dość niewielkiej próbie 42 chorych przebadanych jednocześnie metodą mikroimmunofluorescencji (MIF) [10]. Postanowiono sprawdzić wartość kliniczną tego testu.

W tym celu przebadano 105 pacjentów z objawami zakażeń układu oddechowego oraz 32 bezobjawowe osoby zdrowe z grupy kontrolnej. Pacjenci zgłaszali się do działającej przy Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii AM we Wrocławiu pracowni Microfam zajmującej się diagnostyką mikrobiologiczną i serologiczną, m.in. Pracowni Naukowej Chlamydioz. Były to osoby skierowane przez lekarza POZ, lekarza specjalistę lub zgłaszające się samodzielnie.

Wszystkim pobrano krew opuszkową celem wykonania testu firmy Biocard, a następnie pobierano wymaz z gardła i krew żylną celem wykonania oznaczeń metodami IF (test *Chlamydia* CEL PN firmy Cellabs) i PCR (test diagnostyczny PCR-*Chlamydia pneumoniae* firmy DNA – Gdańsk) oraz ustalenia poziomu przeciwciał w klasach IgM, IgA i IgG (test *Chlamydia pneumoniae* IgM ELISA, *Chlamydia pneumoniae* IgA ELISA, *Chlamydia pneumoniae* IgG ELISA firmy Vircell SL).

Wyniki

Wśród przebadanych 137 osób test przesiewowy dał wynik dodatni jedynie w 3 przypadkach, wynik śladowo dodatni uzyskano w kolejnych 20 przypadkach. Oznaczenia wykonane referencyjną metodą ilościową wykazały dodatni poziom przeciwciał IgM odpowiednio u dwóch i jednego pacjenta.

Jednocześnie w całej populacji badanej dodatni (> 11) indeks przeciwciał anty-*Chp* klasy IgM uzyskano w 7 przypadkach, a wątpliwy (9–11) w 3

przypadkach. W obu tych podgrupach chorych tylko w jednym przypadku wynik testu przesiewowego był śladowo dodatni, w pozostałych dał wynik ujemny.

Jednocześnie dodatni wynik wymazu z gardła wykonany z zastosowaniem testu immunofluorescencji (IF) uzyskano u 86 chorych (74 w grupie badanej i 12 w grupie kontrolnej). Nie uzyskano istotnych statystycznie korelacji między wynikami uzyskanymi za pomocą testu Biocard a wynikami uzyskanymi tech-

nikami IF, PCR i indeksami przeciwciał w klasach IgM, IgA i IgG.

Wnioski

1. Poziom przeciwciał IgM nie może być brany pod uwagę jako jedyny marker zakażenia *Chp*.
2. Test przesiewowy firmy Biocard ma małą wartość diagnostyczną.

Piśmiennictwo

1. Kapustina TA, Belova EV, Manchuk TV, et al. Chlamydial infection in chronic adenoiditis children. *Vestn Otorinolaringol* 2008; 2: 23–26.
2. Shemer-Avni Y, Lieberman D. *Chlamydia pneumoniae* – induced ciliostasis in ciliated bronchial epithelial cells. *J Infect Dis* 1995; 5: 1274–1278.
3. Kuo CC, Jackson LA, Campbell LA, et al. *Chlamydia pneumoniae* (TWAR). *Clin Microbiol Rev* 1995; 4: 451–461.
4. Lund-Olsen I, Lundback A, Gnarpe J, et al. Prevalence of specific antibodies to *Chlamydia pneumoniae* in children with acute respiratory infections. *Acta Paediatr* 1994; 83(11): 1143–1145.
5. Hammerschlag MR, Chirgwin K, Roblin PM, et al. Persistent infection with *Chlamydia pneumoniae* following acute respiratory illness. *Clin Infect Dis* 1992; 1: 178–182.
6. Normann E, Gnarpe J, Gnarpe H, et al. *Chlamydia pneumoniae* in children with acute respiratory tract infections. *Acta Paediatr* 1998; 1: 23–27.
7. Principi N, Esposito S. *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* cause lower respiratory tract disease in paediatric patients. *Curr Opin Infect Dis* 2002; 3: 295–300.
8. Podsiadły E, Frącka B, Szmigielska A, i wsp. Seroepidemiologiczne badania zakażeń *Chlamydia pneumoniae* u dzieci w wieku 1–36 m.ż. z zapaleniem dróg oddechowych i innymi chorobami w Polsce. *Pol J Microbiol* 2005; 3: 215–219.
9. Esposito S, Bosis S, Begliatti E, et al. Acute tonsillopharyngitis associated with atypical bacterial infection in children: natural history and impact of macrolide therapy. *Clin Infect Dis* 2006; 2: 206–209.
10. [Http://www.antibiotech.fi/antibiotech/pdfs/chl_pneum_engl_Biocard.pdf](http://www.antibiotech.fi/antibiotech/pdfs/chl_pneum_engl_Biocard.pdf).

Adres do korespondencji:

Dr n. med. Bartosz J. Sapilak
Katedra i Zakład Medycyny Rodzinnej AM
ul. Syrokomli 1
51-141 Wrocław
Tel.: 501 148-503
E-mail: bsapilak@poczta.onet.pl

Praca wpłynęła do Redakcji: 30.03.2011 r.

Po recenzji: 4.04.2011 r.

Zaakceptowano do druku: 11.04.2011 r.