



cobas

Life needs answers

Nr
37

ISSN 1644-8448

nakład: 1000 egz.

LabForum

Wesołych Świąt
i szczęśliwego Nowego Roku
życzy zespół Roche Diagnostics

Roche



Wesołych Świąt



Życzymy Państwu spokojnych, pogodnych i rodzinnych świąt Bożego Narodzenia, aby Nowy Rok przyniósł radość, miłość, pomyślność i spełnienie wszystkich marzeń, a gdy się one już spełnią, aby dorzucił garść nowych marzeń, bo one nadają życiu znaczenie.

Miło mi poinformować, że na początku listopada w Warszawie odbyła się konferencja prasowa firmy Roche. Jej celem było pokazanie Roche jako firmy wiodącej w rewolucyjnych przemianach ekonomicznych i medycznych zachodzących w Europie Wschodniej. Organizatorzy wyjaśniali mechanizmy rozwoju systemu opieki zdrowotnej na tym obszarze w porównaniu ze standardami obowiązującymi na Zachodzie, szczególnie w aspekcie roli jaką odgrywają takie firmy jak Roche. Podczas konferencji prezentowano także zagadnienie postrzegania rynku wschodniego nie tylko w kategoriach handlowych lecz również w kategoriach istotnego wpływu, jaki wywiera, wnosząc swój wkład w badania naukowe i rozwój. Na to spotkanie zaproszono kluczowych dziennikarzy prasy publicznej i biznesowej z całej Europy. Nasza firma zaprezentowała się jako organizacja aktywnie działająca na rzecz środowiska, poważny inwestor i świetny pracodawca.

W następnym numerze przedstawimy Państwu echa prasowe tego wydarzenia.

W imieniu całego zespołu chciałbym podziękować za owocną współpracę w bieżącym roku i polecić nasze usługi na rok następny.

Życzę miłej lektury,

Andrzej Banaszkiewicz
wraz z zespołem

Spis treści:

Wesołych Świąt	2
Cystatyna C – co wiemy w roku 2008	3-6
Wartość diagnostyczna zautomatyzowanego i bardzo szybkiego testu STA Liatest D-dimer przeprowadzanego w analizatorze STA-R	6-10
Diagnostyka zakażeń <i>chlamydia trachomatis</i>	10-12

Nasz adres:

Roche Diagnostics Polska Sp. z o.o.
ul. Wybrzeże Gdynskie 6B
01-531 Warszawa

centrala: tel. 0-22/481 55 55, 56
faks 0-22/481 55 99
call center: tel. 0-22/481 54 54

serwis: tel. 0-22/481 54 55, 56
faks 0-22/481 55 91
obsługa klienta: tel. 0-22/481 54 00-05
faks 0-22/481 55 96
e-mail: polska.diagnostics@roche.com
dia.callcenter@roche.com
internet: www.rochediagnostics.pl

Cystatyna C – co wiemy w roku 2008

Piotr Rozentryt, III Katedra i Kliniczny Oddział Kardiologii, Śląskie Centrum Chorób Serca, Zabrze

Struktura i właściwości biologiczne

Cystatyna C jest małym eliptycznym białkiem o masie około 13 kd składającym się ze 120 aminokwasów i kodowanym przez pojedynczy gen zlokalizowany na chromosomie 20. Jest ona wydzielana równomiernie do krwi przez wszystkie jądrzaste komórki organizmu. Wszelchobecność cystatyny w komórkach ma związek z pełnionymi przez to białko licznymi funkcjami biologicznymi. Cystatyna C należy do grupy endogennych inhibitorów proteolizy cysteinowych i wiązana jest z procesem powstawania przerzutów nowotworowych, odgrywa rolę w regulacji resorpcji kości przez osteoklasty, chemotaksji neutrofilów, regulacji zapalenia, między innymi poprzez udział w procesie prezentacji antygenów i odpowiedzi immunologicznej na infekcje bakteryjne i wirusowe.^(1,2,3) Ważna rola cystatyny C w wymienionych wyżej procesach związana jest najpewniej z hamowaniem aktywności katepsyn, przede wszystkim katepsyny S⁽⁴⁾. Katepsyny biorą istotny udział w metabolizmie tkanki łącznej powodując trawienie włókien elastycznych. Zjawisko takie ma miejsce także w obrębie blaszki miażdżycowej i ściany naczyniowej. Może to prowadzić do destabilizacji blaszki miażdżycowej, jej pęknięcia i powikłań zakrzepowych, a na terenie dużych naczyń przyczyniać się do powstania tętniaków. Zagadnieniu temu poświęcono dużo badań. Dla przykładu, w eksperymentach u zwierząt pozbawionych genu dla cystatyny C wykazano zwiększenie prawdopodobieństwa rozwoju tętniaka aorty piersiowej⁽⁵⁾. Kilka lat wcześniej niedobór cystatyny C udokumentowano także w obrębie ognisk miażdżycowych i tętniaków aorty piersiowej u ludzi⁽⁶⁾. Niezależnie od wpływu na aktywność katepsyn, cystatyna C odgrywa także rolę w proliferacji komórek⁽⁷⁾, co może sugerować jej związek z patologiczną przebudową naczyń i innych narządów. Do wzrostu zainteresowania cystatyną

C jako potencjalnym mediatorem w procesie przebudowy naczyń przyczyniły się również badania genetyczne wskazujące, iż pewne polimorfizmy genu dla cystatyny C wiążą się ze zwiększonym ryzykiem miażdżycy⁽⁸⁾.

Największe zainteresowanie cystatyną C nie jest jednak wcale związane z jej funkcjami fizjologicznymi. Większość badaczy koncentruje się na tym białku jako na użytecznym wskaźniku filtracji kłębuszkowej.

Cystatyna C jako wskaźnik czynności wydalniczej nerek

Związek pomiędzy filtracją kłębuszkową a stężeniem cystatyny C i możliwość wykorzystania tego związku do oszacowania filtracji kłębuszkowej udokumentowano już niemal przed ćwierćwieczem⁽⁹⁾. Walo-ry cystatyny C ujawniają się zwłaszcza w konfrontacji z tradycyjnymi sposobami oceny filtracji kłębuszkowej i wraz z coraz szerszym docenianiem przez klinicystów wartości precyzyjnego oszacowania filtracji kłębuszkowej w codziennej praktyce klinicznej, zwłaszcza w profilaktyce.

Metody bezpośredniego pomiaru filtracji za pomocą podawanych z zewnątrz znaczników takich jak inulina, EDTA czy DTPA znakowanych radioaktywnymi izotopami odpowiednio chromu czy technetu

lub znacznikami nieizotopowymi (io-talamate, iohexol) są technikami pracochłonnymi i w codziennej praktyce mają ograniczone zastosowania. Rozpowszechniony klinicznie pomiar czynności wydalniczej nerek oparty o oznaczenie stężenia kreatyniny we krwi jest obciążony poważnymi niedogodnościami. Stężenie tego związku we krwi zaczyna zwiększać się przy filtracjach 50–60 ml/min x 1,73 m², podczas gdy niekorzystne konsekwencje upośledzonej filtracji kłębuszkowej są zauważalne już przy filtracji poniżej 90 ml/min x 1,73 m²⁽¹⁰⁾. Stężenie kreatyniny nie jest czułym markerem upośledzonej czynności nerek. Stężenie kreatyniny we krwi zależy od licznych czynników pozanerkowych. Część z nich jest konsekwencją stosowanej techniki pomiaru kreatyniny, część zależy od cech metabolizmu kreatyniny i sposobu jej wydalania w różnych sytuacjach fizjologicznych. Najważniejsze spośród nich wymieniono w tabeli 1.

Pośród czynników wymienionych w tabeli duże znaczenie ma indywidualne zróżnicowanie masy mięśniowej u ludzi. Zależy ono od płci, czynników genetycznych, ale co bardzo ważne jest u poszczególnych osób zmienne w czasie, co wynika z różnego nasilenia aktywności fizycznej i działania czynników o charakterze chorobowym. Im niższa masa mięśniowa,

Tabela 1. Czynniki pozanerkowe wpływające na stężenie kreatyniny we krwi⁽¹¹⁾

Czynniki zmniejszające stężenie kreatyniny	Czynniki zwiększające stężenie kreatyniny
Ograniczenie białka w diecie, anoreksja	Hiperglikemia, ketoza#
Niedożywienie, wyniszczenie, niska masa mięśniowa	Cefalosporyny
Hiperbilirubinemia#	Fluorocytozyna*
Choroby wątroby	Cymetydyna, trimetoprim
Płeć żeńska	Nasilone ćwiczenia fizyczne
Zaawansowany wiek	Wysoko białkowe posiłki

– interferencja przy oznaczaniu kreatyniny metodą Jaffe

* – interferencja przy oznaczaniu kreatyniny metodą enzymatyczną

tym stężenie kreatyniny dla danego poziomu filtracji kłębuszkowej może być niższe. Im niższa filtracja kłębuszkowa, tym także więcej kreatyniny wydalone jest drogą cewkową. Przy rzeczywistej filtracji poniżej 30 ml/min x 1,73 m² nawet 50% kreatyniny może być wydalanych tą drogą co prowadzi do zaniżania stężenia kreatyniny w stosunku do rzeczywistej filtracji. Zjawiska te powodują, iż stężenie kreatyniny jest bardzo nieprecyzyjnym odzwierciedleniem filtracji kłębuszkowej.

Próba zmniejszenia opisanych powyżej niedogodności było opracowanie szeregu empirycznych wzorów, które pozwalają ograniczyć wpływ czynników pozanerkowych na szacowaną filtrację. Uzyskano je drogą analizy równań regresji, w których zmienną zależną była filtracja kłębuszkowa zmierzona bezpośrednio w dużej referencyjnej populacji, a zmiennymi niezależnymi stężenie kreatyniny, wiek, płeć oraz w niektórych wzorach także parametry antropometryczne. Do najbardziej znanych wzorów należą wzory Cocrofta-Gaulta, MDRD i wzór Schwartza dla dzieci⁽¹²⁾. Wzory te umożliwiły znaczący postęp w diagnostyce przewlekłych chorób nerek, a skrócony wzór pochodzący z badania MDRD (Modification of Diet in Renal Diseases) stał się podstawą stworzenia systemu definiującego zaawansowanie przewlekłej choroby nerek⁽¹³⁾.

Szacowanie filtracji za pomocą wzorów nie jest wolne od ograniczeń. Wynikają one po części z ograniczeń pomiaru i czynników wpływających na stężenie kreatyniny, po części z ograniczeń populacji, w których wzory były opracowane – głównie chorych z przewlekłą chorobą nerek. W wyniku, wzory te w różnych sytuacjach klinicznych przeszacowują rzeczywistą filtrację u chorych z obniżonymi jej wartościami i niedoszacowują w wysokich wartościach⁽¹⁴⁾. Technika ta nie pozwala także uniknąć błędów szacowania zależnych od zmian w czasie masy mięśniowej u tego samego osobnika.

W tej sytuacji ciekawą alternatywą okazała się cystatyna C. Cystatyna C jest wydzielana ze stałą szybkością przez wszystkie komórki posiadające jądra. Z racji swojej niskiej masy cząsteczkowej jest swobodnie filtrowana w kłębuszkach

nerkowych, a w dalszych częściach nefronu nie jest wydzielana lub wydzielana jest w minimalnych ilościach do moczu pierwotnego. W małym stopniu cystatyna C usuwana jest drogą mechanizmów pozanerkowych⁽¹⁵⁾. Jej stężenie we krwi nie zależy od diety, stanu odżywienia czynników zapalnych⁽¹⁶⁾. Poznano dotąd kilka okoliczności które zmieniają stężenie we krwi niezależnie od filtracji kłębuszkowej. Do czynników modyfikujących jej stężenie zaliczyć należy niedoczynność tarczycy⁽¹⁷⁾ i terapię glikokortykosteroidami⁽¹⁸⁾. Czynniki te odwracalnie zwiększają stężenie cystatyny C we krwi. Wbrew pierwotnym ustaleniom, duże badania udokumentowały, iż także czynniki antropomorficzne takie jak płeć i rasa nie pozostają bez wpływu na stężenia cystatyny C. Związki te są jednak daleko słabsze niż w przypadku kreatyniny. Dla przykładu, średnie stężenie kreatyniny odpowiadające zmierzonej bezpośrednio filtracji 60 ml/min x 1,73 m² u 60 letniej białej kobiety w populacji amerykańskiej wynosi 0,95 mg/dL, podczas gdy u czarnego mężczyzny tej samej populacji 1,46 mg/dL. Oznacza to rozrzut dla tej samej filtracji aż 50%. W przypadku cystatyny C wartości te wynoszą odpowiednio 1,12 mg/dL i 1,27 mg/dL, co daje rozrzut jedynie 13%⁽¹⁹⁾. Pomimo tych ograniczeń cystatyna C jest potencjalnie daleko lepszym markerem filtracji niż kreatynina.

Jedną z zasadniczych korzystnych cech cystatyny C jest wzrost jej stężenia już przy bardzo nieznacznej redukcji filtracji kłębuszkowej w zakresie 70–90 ml/min x 1,73 m², co czyni z niej szczególnie obiecujący wskaźnik umożliwiający bardzo wczesne rozpoznanie upośledzenia filtracji kłębuszkowej⁽²⁰⁾. W wymienionych zakresach filtracji stężenie kreatyniny pozostaje prawidłowe. Także estymowanie filtracji za pomocą wzoru Cocrofta-Gaulta czy MDRD nie zwiększa możliwości rozpoznania wczesnych etapów upośledzenia filtracji. Przyczyną jest ponad 3-krotnie większa wewnątrzosobnicza zmienność pomiarów estymowanej filtracji niż pomiarów cystatyny C (18,7% versus 5,4%)⁽²¹⁾.

Względna niezależność stężenia cystatyny od masy mięśniowej czyni z niej do-

godny wskaźnik filtracji u dzieci. Już w wieku 2 lat u zdrowych dzieci stężenie cystatyny C jest takie samo jak u dorosłych⁽²²⁾. Z drugiej strony u ludzi starych zauważalna jest rosnąca z wiekiem chorych rozbieżność między estymacją czynności wydalniczej nerek za pomocą stężenia kreatyniny i cystatyny C⁽²³⁾. Prawdopodobnym powodem jest postępujący spadek masy mięśniowej w tej populacji, który poprzez zmniejszoną produkcję kreatyniny maskuje ubytek filtracji kłębuszkowej. Zastosowanie cystatyny C do estymacji filtracji może mieć tutaj szczególne znaczenie, ponieważ ta populacja charakteryzuje się zwiększoną chorobowością co nasila ryzyko ostrej niewydolności nerek w następstwie na przykład nieadekwatnego do rzeczywistej filtracji zastosowania leków czy kontrastu radiologicznego.

Użyteczność oznaczenia cystatyny C była przedmiotem badań w bardzo różnych populacjach, w których zastosowanie estymacji filtracji obciążone jest szczególnie niedogodnościami lub daje niezadowolające wyniki. Należy wymienić tutaj dzieci⁽²⁴⁾, wczesne etapy nefropatii cukrzycowej⁽²⁰⁾, kobiety w ciąży zagrożone rzucawką⁽²⁵⁾, chorzy po przeszczepie nerek⁽²⁶⁾, czy pacjenci z poważnymi chorobami wątroby⁽²⁷⁾. Generalnie większość badań wskazuje, iż oznaczenie cystatyny C ma istotną przewagę nad oznaczeniem kreatyniny a nawet nad szacowaniem filtracji za pomocą wzorów. Znajduje to potwierdzenie w meta-analizie, w której rzeczywista filtracja koreluje ściślej z odwrotnością stężenia cystatyny C (1/cyst), niż z odwrotnością stężenia kreatyniny (1/krea)⁽²⁸⁾.

Szersze wykorzystanie pomiaru stężenia cystatyny w estymacji rzeczywistej filtracji zostało ostatnio poszerzone o próby tworzenia wzorów na podobieństwo tych wygenerowanych w oparciu o stężenie kreatyniny. W odróżnieniu od wzoru Cocrofta-Gaulta i MDRD, które zawyżają wartości rzeczywistej filtracji, wzory oparte o stężenie cystatyny pozbawione są tej niedogodności^(29, 30). Strategia ta wydaje się bardzo interesująca również z uwagi na możliwości integracji w jednym wzorze informacji dostarczonych

Tabela 2. Wzory do szacowania filtracji w oparciu o stężenie cystatyny C

Wzór	Sposób pomiaru GFR	Populacja	Referencja
$GFR = (80,35 / \text{cystatyna C [mg/L]}) - 4,32$	125I-iothalamat	Przewlekła choroba nerek (n=123)	29
$GFR = 99,19 \times \text{cystatyna C [mg/L]} - 1,713 \times 0,823$ (kobiety)	Iohexol	Dorośli (n=451)	30
$GFR = (87,1 / \text{cystatyna C [mg/L]}) - 6,87$	Iohexol	Dorośli (n=40; 29 cukrzyca)	31
$GFR = 77,239 \times \text{cystatyna C [mg/L]} - 1,2623$	Iohexol	Dorośli (n=100)	32
$GFR = (78 / \text{cystatyna C [mg/L]}) + 4$	51Cr-EDTA	Chorzy po przeszczepie nerki (n=25)	33
$GFR = 99,434 \times \text{cystatyna C [mg/L]} - 1,5837$	Iohexol	Dorośli (n=100)	32
$GFR = 87,62 \times \text{cystatyna C [mg/L]} - 1,693 \times 0,94$ (kobiety)	Iohexol	Dorośli (n=451)	34
$GFR = (86,7 / \text{cystatyna C [mg/L]}) - 4,2$	99m-Tc-DTPA	Chorzy z cukrzycą (n=251)	35
$GFR = 66,8 \times \text{cystatyna C [mg/L]} - 1,30$	Iothalamat	Przewlekła choroba nerek (n=357)	36
$GFR = 76,6 \times \text{cystatyna C [mg/L]} - 1,16$	Iothalamat	Renal transplant recipients (n=103)	36
$GFR = (162 / \text{cystatyna C [mg/L]}) - 30$	Inulina	Przewlekła choroba nerek (n=184)	24
$\log GFR = 1,962 + [1,123 \times \log (1/\text{cystatyna C [mg/L]})]$	99m-Tc-DTPA	Przewlekła choroba nerek (n=536)	37
$GFR = 87,62 \times \text{cystatyna C [mg/L]} - 1,693 \times 1,376$ (wiek <14 years) $\times 0,94$ (kobiety)	Iohexol	Dzieci (n=85)	34
$GFR = 75,94 / \text{cystatyna C [mg/L]} - 1,17 \times 1,2$ (po przeszczepie nerki)	Iothalamat	Dzieci (n=103)	38
$GFR \text{ (ml/min)} = 63,2 \times [(SCr(\mu M)/96) - 0,35] \times$ $[(cysC \text{ (mg/l)}/1,2) - 0,56] \times$ $[(\text{masa ciała (kg)}/45)0,30] \times [\text{wiek (lata)}/14]0,40]$	51Cr-(EDTA)	100 dzieci lub młodych dorosłych (zakres wieku: 1,4-22,8 lat)	39

przez pomiar stężenia zarówno kreatyniny jak i cystatyny C. Pierwsze analizy wskazują na wyższość takiego postępowania nad wzorami generowanymi w oparciu o jeden z tych markerów. W tabeli 2 zestawiono najczęściej wykorzystywane wzory do estymacji filtracji w oparciu o stężenie cystatyny C.

Wymienione powyżej zastosowania cystatyny C w rozpoznawaniu upośledzenia filtracji kłębuszkowej dotyczyły sytuacji przewlekłego procesu uszkadzającego nerki. Tymczasem istotnym problemem klinicznym jest wczesne rozpoznawanie ostrych zmian filtracji kłębuszkowej w następstwie urazu toksycznego czy hemodynamicznego. Ze względu na małą czułość pomiar stężenia kreatyniny czy zastosowanie wzorów estymujących filtrację ma tutaj ograniczone zastosowanie. Pierwsze badania sugerują, iż pomiar stężenia cystatyny C może być pomocny we wczesnym wykrywaniu spadku filtracji po ekspozycji na kontrast jodowy⁽⁴⁰⁾, po zastosowaniu krążenia pozaustrojowego⁽⁴¹⁾, czy w następstwie podawania ne-

frotoksycznych leków⁽⁴²⁾. Zastosowania te wychodzą naprzeciw bardzo istotnym potrzebom klinicznym, ponieważ wczesne wykrycie toksyczności procedur czy leków może dać szansę na skuteczniejszą interwencję.

Cystatyna C jako biomarker

Podstawowa funkcja biologiczna cystatyny C, w tym szczególnie jej potencjalny udział w patogenezie miażdżycy i jej powikłań, daje podstawy do rozpatrywania roli cystatyny C jako markera ryzyka sercowo-naczyniowego. Pierwszym dużym prospektywnym badaniem obejmującym 726 chorych była analiza pacjentów z podejrzeniem ostrego zespołu wieńcowego⁽⁴³⁾. Wykazano w nim, iż wyższym stężeniom cystatyny C towarzyszy zwiększona śmiertelność z wszystkich przyczyn. Ryzyko ponownego zawału nie było zwiększone. W omówieniu wyników tego badania ograniczono się jedynie do interpretacji zwiększonej śmiertelności jako wyniku gorszej funkcji nerek. Wiadomo bowiem, iż gorsza funkcja wydalinicza nerek wiąże

się ze znacznie zwiększonym ryzykiem sercowo-naczyniowym.

Kolejne badanie (Cardiovascular Health Study) dotyczyło 4637 osób starszych wskazywało jednak na pewną niezależność ryzyka skojarzonego ze zwiększonym stężeniem cystatyny C i ryzyka zależnego od gorszej funkcji nerek. Wykazało ono, iż zależność pomiędzy stężeniem cystatyny C a śmiertelnością oraz ryzykiem udaru i zawału serca ma charakter liniowy. Wyższym stężeniom cystatyny towarzyszyło zwiększone ryzyko. Tymczasem analiza związku pomiędzy ryzykiem ze stężeniem kreatyniny miała charakter krzywej J, to jest zwiększone ryzyko skojarzone było zarówno z niskimi jak i wysokimi stężeniami kreatyniny⁽⁴⁴⁾.

Do dnia dzisiejszego uzyskano już przekonujące dane wskazujące na prognostyczną rolę cystatyny C w przewidywaniu ryzyka rozwoju niewydolności serca u osób starszych⁽⁴⁵⁾, przewlekłej choroby nerek i jej powikłań⁽⁴⁶⁾, choroby niedokrwiennej serca^(47, 48), udaru mózgu⁽⁴⁹⁾ i prawdopodobnie także miażdżycy tętnic obwodo-

wych⁽⁵⁰⁾. Co ciekawe podwyższone stężenia cystatyny C skojarzone były także ze zwiększoną chorobowością z przyczyn płucnych i infekcyjnych⁽⁵¹⁾.

W większości cytowanych prac związku podwyższonego stężenia cystatyny C z chorobowością czy śmiertelnością interpretowane są przez pryzmat upośledzonej funkcji wydalniczej nerek. To zmiany indukowane przez pogarszającą się funkcję nerek, których cystatyna C jest dowodem, mają być przyczyną obserwowanych zjawisk. W wielu jednak pracach związku

zwiększonej śmiertelności i chorobowości ze zwiększonym stężeniem cystatyny C pozostawały niezależne od czynności nerek określonej filtracją⁽⁵²⁾. Sugeruje to, iż cystatyna C może być samodzielnym markerem, a może także mediatorem procesu patologicznego w tkankach.

W ciągu ostatniego ćwierćwiecza dokonął się ogromny postęp w badaniach nad cystatyną C. Znalazła ona szerokie zastosowanie w diagnostyce przewlekłej choroby nerek, stała się użytecznym narzędziem badawczym wszędzie tam, gdzie ba-

daczom zależy na biochemicznym monitorowaniu zmian czynności nerek pod wpływem leku czy procedury. Stała się także cenionym markerem ryzyka sercowo-naczyniowego. Kontynuacja badań nad jej rolą jako mediatora procesu patologicznego i jednocześnie markera czynności wydalniczej nerek pozwoli zapewne głębiej zrozumieć rolę zmian środowiskowych wywoływanych dysfunkcją wydalniczą nerek w patofizjologii układu krążenia.

Pisma dostępne w redakcji.

Wartość diagnostyczna zautomatyzowanego i bardzo szybkiego testu *STA Liatest D-dimer* przeprowadzanego w analizatorze *STA-R*

Gregor Waser, Silvio Kathriner, Walter A. Wuillemin, Division of Hematology and Central Hematology Laboratory, Kantonsspital Luzerna, Szwajcaria

SŁOWA KLUCZOWE

oznaczanie dimeru D, zakrzepica żył głębokich, strategia diagnostyczna, *STA Liatest*

STRESZCZENIE

Cel: Celem niniejszego badania była ocena dokładności wskazań nowego zautomatyzowanego i bardzo szybkiego testu lateksowego do oznaczeń dimeru D, *STA Liatest D-Di* wykonywanego w analizatorze *STA-R* i porównanie jej z uznanymi testami do oznaczeń dimeru D.

Metody: Oznaczenia dimeru D przeprowadzono u 103 kolejnych pacjentów ambulatoryjnych z podejrzeniem zakrzepicy żył głębokich (ZŻG). Diagnostykę ZŻG stawiano na podstawie badania flebograficznego lub ultrasonografii dopplerowskiej. Stężenia dimeru D w osoczu mierzono z zastosowaniem testu *STA Liatest D-Di* w analizatorze krzepnięcia *STA-R*. Wyniki porównywano

z referencyjną metodą do oznaczeń dimeru D ELISA (*Asserachrom*®), zautomatyzowanym ilościowym lateksowym testem immunoturbidymetrycznym (*Tinaquant*®) oraz testem *VIDAS*®.

Wyniki: Do niniejszego badania zakwalifikowano całkowitą liczbę 103 pacjentów ambulatoryjnych. ZŻG wykryto u 46 pacjentów (44,6%). Dwa podwójne pomiary dimeru D w *STA Liatest D-Di* ujawniły odpowiednio doskonałą korelację ($r_s=0,996$) i niemal jednakową czułość (każde 98%), swoistość (49% i 50%), negatywną wartość predykcyjną (NPV; każdy 97%), pozytywną wartość predykcyjną (PPV; 61% i 62%) oraz wskaźnik wykluczenia (27% i 28%). Porównanie *STA Liatest D-Di* z pozostałymi testami do oznaczeń dimeru D wykazało wysoce znamienne korelacje ($r_s=0,951-0,979$), wysoce porównywalną regresję i doskonałą zgodność w klinicznej interpretacji wyników testów (współczynniki kappa 0,812–0,856). Po-

nadto, swoistość, NPV, PPV i wskaźnik wykluczenia przy poziomie odcięcia 500 ng/ml znajdowały się w tym samym zakresie dla *STA Liatest D-Di*, co parametry pozostałych testów do oznaczeń dimeru D.

Wnioski: Porównanie z testami do oznaczeń dimeru D *VIDAS*®, *Tinaquant*® i *Asserachrom*® wskazuje na przewagę testu *Liatest D-Di* wykonywanego w analizatorze krzepnięcia *STA-R*. Może on służyć do bezpiecznego wykluczania ZŻG u objawowych pacjentów ambulatoryjnych i zostać włączony do diagnostycznego algorytmu ZŻG obejmującego inne narzędzia diagnostyczne.

Skróty: ZŻG, zakrzepica żył głębokich; PPV, pozytywna wartość predykcyjna; NPV, negatywna wartość predykcyjna; ER, wskaźnik wykluczenia; CI, przedział ufności; ROC, krzywa zależna od operatora; AUC, pole pod krzywą ROC.

© 2004 Elsevier Ltd. Wszelkie prawa zastrzeżone.

WSTĘP

Zakrzepica żył głębokich (ZZG) jest często występującą chorobą, która nieleczone niesie znaczne ryzyko chorobowości i umieralności. Jej rozpoznanie stanowi trudne wyzwanie dla klinicysty. Obiektywne testy, takie jak flebografia czy ultrasonografia są kluczowe dla postawienia ostatecznego rozpoznania u pacjentów z określonymi dolegliwościami i objawami klinicznymi. Stosując obiektywne metody diagnostyczne spośród wszystkich pacjentów z podejrzeniem ZZG jedynie około jedna trzecia, lub nawet mniej, okazuje się mieć chorobę. W diagnostyce pacjentów podejrzanych o ZZG lata temu wprowadzono oznaczenie dimeru D, specyficznych produktów degradacji usieciowanej fibryny^[1] celem ograniczenia dalszych badań. Retrospektywne badania wykazały wysoką negatywną wartość predykcyjną wyników oznaczeń dimeru D poniżej pewnego punktu odcięcia w wykluczaniu ZZG^[2]. Ponadto, badania kliniczne dowiodły bezpieczeństwa zaniechania podawania leków przeciwkrzepliwych pacjentom z ujemnym wynikiem oznaczenia dimeru D i prawidłowym ultrasonografią^[3,4]. Do oznaczeń dimeru D dostępnych jest wiele testów, jednakże ich przydatność zależy od ich niezawodności i wartości diagnostycznej. Złotym standardem dla oznaczeń dimeru D są klasyczne testy immunoenzymatyczne. Jednak są one czasochłonne oraz nie odpowiednie do jednokrotnego użytku, czy też zastosowania w przypadkach nagłych. Wykazano, że kilka nowszych testów opartych na cząsteczkach lateksu charakteryzuje się akceptowalnie wysoką czułością i negatywną wartością predykcyjną^[5-10].

Celem niniejszego badania była ocena dokładności nowego zautomatyzowanego i bardzo szybkiego testu lateksowego do oznaczeń dimeru D w analizatorze STA-R oraz porównanie jej z uznanymi referencyjnymi testami do oznaczeń dimeru D, takimi jak bardzo szybki test immunoenzymatyczny VIDAS®, klasyczny test immunoenzymatyczny Asserachrom® oraz bardzo szybki test lateksowy Tinaquant®.

PACJENCI I METODY

Pacjenci

Do badania, po wyrażeniu świadomej zgody, włączono kolejnych pacjentów

ambulatoryjnych z podejrzeniem ZZG kończyn dolnych kierowanych na diagnostykę pomiędzy grudniem 1996 a styczniem 1998 roku do trzech centrów biorących w nim udział (dwie kliniki akademickie i jeden szpital uniwersytecki). Rozpoznanie potwierdzano lub wykluczano w ciągu 1 dnia od skierowania przez lekarza ogólnego w oparciu o procedury diagnostyczne opisane poniżej. Pacjentów wykluczano z badania z powodu jakiegokolwiek z następujących przyczyn: przyjmowania terapeutycznie lub profilaktycznie leków przeciwkrzepliwych przez ponad 24 godziny przed włączeniem do badania, ciąży czy hospitalizacji w ciągu poprzednich 3 dni. Protokół badawczy został zatwierdzony przez instytucjonalną komisję etyczną.

Rozpoznanie zakrzepicy żył głębokich

U każdego pacjenta doświadczony ultrasonografista wykonywał badanie flebograficzne lub badanie USG z zastosowaniem opcji dopplerowskich (*power-based color-coded duplex ultrasonography*)^[11]. Uznawano, że u pacjentów nie występowała ZZG, kiedy wyniki wstępnych badań diagnostycznych były prawidłowe, a kliniczny 3 miesięczny okres obserwacji był niepowikłany. ZZG klasyfikowano jako proksymalną, jeśli była zlokalizowana w żyłach podkolanowych i/lub biodrowo-udowych i jako dystalną, jeśli była zlokalizowana wyłącznie w żyłach łydki.

Próbki krwi

Krew pobierano przez nakłucie żyły zgięcia łokciowego igłą motylkową w rozmiarze 19. Po odrzuceniu pierwszych 5 ml, pobierano 9 ml krwi do 10 ml plastikowych probówek (Monovette®; Sarstedt, Nuembrecht, Niemcy) zawierających 1 ml 0,106 M cytrynian trisodowy. Po dwukrotnym wirowaniu przy 1500 x g po 10 min w 15-18°C, rozpipetowane do polipropylenowych probówek osocze w ciągu jednej godziny od pobrania krwi przenoszono do -70°C i przechowywano.

Oznaczenia dimeru D

Osoby wykonujące oznaczenia dimeru D nie posiadały wiedzy odnośnie stanu pa-

centów. STA Liatest® D-Di (Diagnostica Stago, Asnieres, Francja) jest nowym zautomatyzowanym i bardzo szybkim testem do oznaczeń dimeru D. Specjalne cząstki lateksu opłaszczone przeciwciałami w obecności D-dimerowych produktów degradacji fibryny wywołują aglutynację.

Test STA Liatest® D-Di wykonywano w analizatorze krzepnięcia STA-R®. Aglutynacja powoduje większe rozpraszanie światła, co jest rejestrowane jako wzrost gęstości optycznej.

Test VIDAS D-dimer (VIDAS D-dimer®, bio-Mérieux, Lyon, Francja) to zautomatyzowany ilościowy test immunoenzymatyczny wykonywany w immunoanalizatorze VIDAS, który umożliwia jednokrotne oznaczenia z gotowymi do użytku odczynnikami.

Tinaquant® D-dimer (Roche Diagnostic AG, Rotkreuz, Szwajcaria) jest zautomatyzowanym ilościowym lateksowym testem immunoturbidymetrycznym wykonywanym w aparacie do klinicznych analiz biochemicznych Hitachi (Roche Diagnostics).

Test Asserachrom® D-dimer ELISA (Diagnostica Stago, Asnieres, Francja) użyto do porównania. Wyniki przedstawiono w ng/ml (wyrażone w FEU – ekwiwalent fibrynogenu).

Analiza statystyczna

Dokładność wskazań takich jak czułość, swoistość, pozytywna wartość predykcyjna (PPV), negatywna wartość predykcyjna (NPV) oraz wskaźnik wykluczenia (ER) danych testów do oznaczeń dimeru D wyliczono stosując punkt odcięcia 500 ng/ml. Znamienne różnice dla tych wartości dokładności analizowano z zastosowaniem dokładnego testu Fishera przy wartości $p=0,05$. 95% przedziały ufności (CI) wyliczono zgodnie z rozkładem dwumianowym. Korelacje wyliczono na podstawie testu korelacji Spearmana, a analizę metodą regresji wykonano przy użyciu metody Passing-Bablok^[12]. Analizę przeprowadzoną metodą ROC (krzywej zależnej od operatora) i pola pod krzywą ROC (AUC) utworzonej poprzez sporządzenie wykresu czułości wobec 1-swoistości wykonano z zastosowaniem MedCalc®. Zgodność

pomiędzy dwoma testami w klasyfikowaniu pacjentów jako mających wynik ujemny lub dodatni szacowano poprzez wyliczenie współczynnika kappa^[13]. Wartość > 0,81 odzwierciedla doskonałą, 0,80–0,61 dobrą, 0,6–0,41 umiarkowaną, 0,4–0,21 mierną, a 0,2 niską zgodność^[14].

Wyniki

Do badania włączono 106 z całkowitej liczby 123 kolejnych pacjentów ambulatoryjnych z klinicznym podejrzeniem ZŻG. Siedemnastu pacjentów należało wykluczyć z powodu leczniczego lub profilaktycznego przyjmowania antykoagulantów przez ponad 24 godziny przed włączeniem do badania. Trzech pacjentów wykluczono z końcowej analizy, ponieważ nie było wystarczającej objętości osocza cytrynianowego do wszystkich testów laboratoryjnych. Zatem badana populacja składała się ze 103 pacjentów (51 mężczyzn i 52 kobiet). Średni wiek wynosił 56,3 lata (zakres od 21,6 do 87,9). Całkowita chorobowość na ZŻG wyniosła 44,7% (46/103 pacjentów). ZŻG dystalną stwierdzono u 14 (13,6%), a proksymalną u 32 (31,1%) pacjentów. Stężenia dimeru D różniły się statystycznie (p<0,001, test U Manna-Whitney'a) pomiędzy pacjentami z ZŻG dystalną a z ZŻG proksymalną: mediana (i zakres) wyników oznaczeń *STA Liatest* wyniosła odpowiednio 1085 ng/ml (470–18780) i 4163 ng/ml (525–32100). Czterech (3,9%) pacjentów z potwierdzeniem ZŻG wykazywało kliniczne oznaki

zatorowości płucnej. W trakcie 3 miesięcznego okresu obserwacji u żadnego z pacjentów nie rozwinęły się oznaki ani objawy ZŻG czy zatorowości płucnej. Szesnastu pacjentów otrzymywało drobnocząsteczkową heparynę w trakcie 24 godzin przed pobraniem krwi. Jednakże u żadnego z tych pacjentów nie pojawiły się fałszywie ujemne wyniki w żadnym z testów do oznaczeń dimeru D.

Po pierwsze ocenialiśmy wartość diagnostyczną nowego zautomatyzowanego i szybkiego testu lateksowego do oznaczeń dimeru D w analizatorze STA-R (*STA Liatest*). Analiza dwóch podwójnych pomiarów ze *STA Liatest* ujawniła doskonałą korelację i regresję: współczynnik korelacji wyniósł $r_s=0,996$ (95% CI: 0,995–0,997; p<0,0001), a prosta regresji przecinała oś y w punkcie 5 ng/ml (95% CI: od -4 do 15), przy nachyleniu 0,98 (95% CI: 0,97–0,99). Ponadto dokładność wskazań była całkowicie porównywalna pomiędzy dwoma pomiarami, odpowiednio przy czułości na poziomie 98%, swoistości 49% i 50%, NPV każde na poziomie 97%, PPV – 61% i 62% oraz wskaźniku wykluczenia 27% i 28%. Zgodność wyrażona przy pomocy współczynnika kappa wyniosła 0,929, z różniącymi się parami przy 480/520, 530/430 i 550/480 ng/ml, odpowiednio dla podwójnych oznaczeń *STA Liatest*. Do dalszej analizy wykorzystano średnią wartość obu pomiarów *STA Liatest*.

Następnie stwierdzono, że porównanie rzetelności *STA Liatest* z uznanymi

testami do oznaczeń dimeru D wypadła na korzyść tego pierwszego. Tabela 1 przedstawia czułość, swoistość, NPV, PPV oraz wskaźniki wykluczenia przy poziomie odcięcia 500 ng/ml dla *STA Liatest* i odnośnych testów do oznaczeń dimeru D. Punkt odcięcia dla czułości równej 100% wyniósł 460 ng/ml dla *STA Liatest*, 370 ng/ml dla *Asserachrom*, 540 ng/ml dla *Vidas* i 330 ng/ml dla *Tinaquant*. Z zastosowaniem *STA Liatest* jeden pacjent miał wartość dimeru D poniżej odcięcia 500 ng/ml (460 ng/ml). U tego pacjenta występowała ZŻG dystalna i jeszcze nie przyjmował leków przeciwkrzepliwych.

Stwierdzono dobrą zgodność pomiędzy *STA Liatest*, a odnośnymi pozostałymi testami do oznaczeń dimeru D z wysoce statystycznie znaczącą korelacją pomiędzy *STA Liatest* a pozostałymi testami ($r_s=0,951$ – $0,979$, p<0,0001). Ponadto proste regresje były wysoce porównywalne. Co więcej, analiza krzywych ROC, jak przedstawiono na Ryc. 1, wykazała porównywalne AUC dla oznaczeń dimeru D w *STA Liatest* (0,884, 95% CI: 0,806–0,939), *Asserachrom* (0,908, 95% CI: 0,835–0,956), *Vidas* (0,910, 95% CI: 0,837–0,957) i *Tinaquant* (0,901, 95% CI: 0,826–0,951). Tabela 2 ilustruje zgodność pomiędzy różnymi testami do oznaczeń dimeru D. Współczynniki kappa dla *STA Liatest* z pozostałymi wykonywanymi testami były następujące: 0,856 z *Vidas*, 0,812 z *Tinaquant* i 0,819 z *Asserachrom*.

Tabela 1. Kliniczna wartość diagnostyczna różnych testów do oznaczeń dimeru D przy punkcie odcięcia równym 500 ng/ml

	Czułość (%)	Swoistość (%)	PPV (%)	NPV (%)	Wskaźnik wykluczenia (%)
<i>Liatest</i>	97,8	50,9	61,6	96,7	28,2
95% CI	93,6–100	37,9–63,9	50,5–72,8	90,2–100	19,4–36,8
<i>Asserachrom</i>	95,7	61,4	66,7	94,6	34
95% CI	89,8–100	48,8–74	55,3–78	87,3–100	24,8–43,1
<i>VIDAS</i>	100	52,6	63	100	29,1
95% CI	94–100	39,7–65,6	51,9–74,1	90–100	20,4–37,9
<i>Tinaquant</i>	97,8	56,1	64,3	97	31,1
95% CI	93,6–100	43,3–69	53,1–75,6	91,1–100	22,1–40

Wartości przedstawiono jako odsetki i ich 95% przedziały ufności (95% CI). PPV, pozytywna wartość predykcyjna; NPV, negatywna wartość predykcyjna.

Rycina 1. Analiza dokładności wskazań czterech testów do oznaczeń dimeru D celem stwierdzenia obecności zakrzepicy żył głębokich. Metoda krzywej zależnej od operatora (ROC). *wskazuje wartość odcięcia równą 500 ng/ml

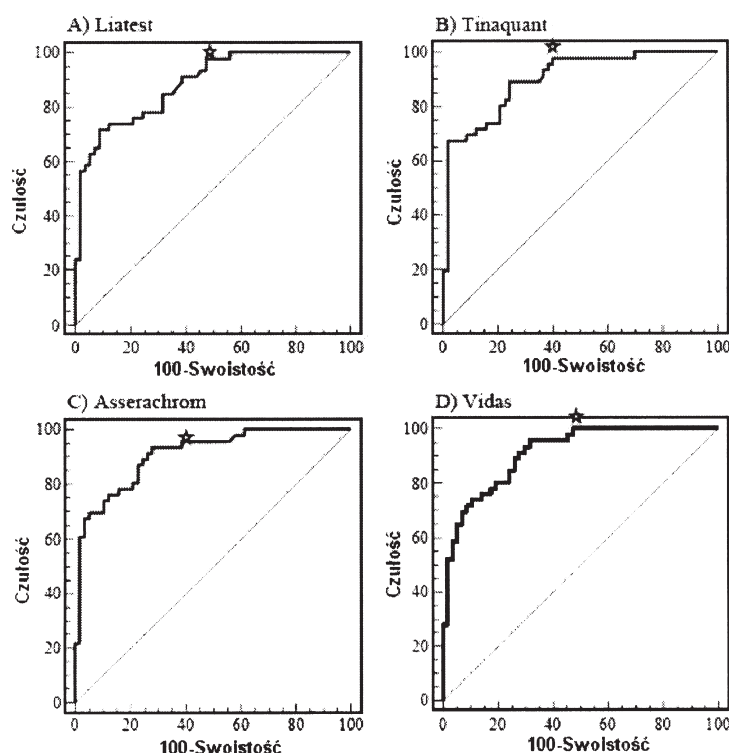


Tabela 2. Współczynniki kappa pomiędzy czterema testami do oznaczeń dimeru D

Liatest	Vidas	Asserachrom
Vidas	0,856	
Asserachrom	0,819	0,816
Tinaquant	0,812	0,815 0,825

DYSKUSJA

Celem niniejszego badania była ocena wartości diagnostycznej nowego zautomatyzowanego i bardzo szybkiego testu lateksowego do oznaczeń dimeru D w analizatorze STA-R oraz porównanie jej z uznanymi testami referencyjnymi. Wyniki wskazują, że pojedynczy pomiar STA Liatest® D-Di w analizatorze STA-R wyklucza rozpoznanie ZŻG u do 30% pacjentów ambulatoryjnych z klinicznymi oznakami i objawami ZŻG oraz że ten nowy test do oznaczeń dimeru D wykazuje przewagę nad uznanymi testami.

W większości pracowni koagulologicznych rutynowo przeprowadza się podwójne oznaczenia pewnych parametrów,

a następnie podaje średnią wartość z obu wyników. W niniejszym badaniu wykazano, że pojedynczy pomiar Liatest® D-Di daje takie same parametry dokładności, jak strategia podwójnych oznaczeń. Zgodnie z wiedzą autorów, niniejsze doniesienie jest pierwszym analizującym, możliwość uniknięcia podwójnych oznaczeń. Jest to szczególnie ważne z ekonomicznego punktu widzenia.

Na początku porównano nowy STA Liatest® D-Di z kilkoma uznanymi testami do oznaczeń dimeru D. Korelacja i parametry regresji, pomimo że nie identyczne, znajdowały się w jednakowym przedziale, nie wykazując znaczących różnic. Zasadniczo różne testy do

oznaczeń dimeru D mogą nie dawać jednakowych wyników z powodu obserwowanych różnic w swoistości przeciwciał, preferencji wobec produktów degradacji fibryny o małej lub dużej masie cząsteczkowej i/lub usieciowanych i nieusieciowanych pochodnych fibryny^[15]. Ponadto różnice pomiędzy testami może również spowodować zależna od czasu ekspresja neoepitopu podczas tworzenia i degradacji fibryny^[16]. Jedynie sporadycznie zdarza się, aby wyniki uzyskane przy użyciu różnych testów do oznaczeń dimeru D wykazywały ogromne różnice^[17]. Ostatnio ponownie położono nacisk na fakt, że nawet doskonała korelacja i regresja niekoniecznie musi oznaczać dobrej zgodności pomiędzy dwiema metodami^[18]. Dlatego w niniejszej pracy dodatkowo oceniano zgodność w odniesieniu dokładności klinicznej poprzez wyliczenie współczynników kappa pomiędzy każdą parą testów do oznaczeń dimeru D. Rezultaty wykazują doskonałą zgodność w klinicznej interpretacji wyników testów (Tabela 2).

Następnie oceniano wartość diagnostyczną wyrażoną przez czułość, swoistość, NPV, PPV oraz ER nowego bardzo szybkiego STA Liatest® D-Di w analizatorze STA-R. Okazała się ona znajdować w zakresie trzech innych testów do oznaczeń dimeru D – Vidas, Tinaquant i Asserachrom (Tabela 1). Ponadto niniejsze wyniki odnośnie czułości i NPV testu STA Liatest® D-Di są zgodne z publikowanymi wynikami dla pacjentów z podejrzeniem ZŻG^[19,20] oraz w badaniach nad wykluczeniem podejrzenia zatorowości płucnej u objawowych pacjentów ambulatoryjnych^[21,22], pomimo że jedynie w jednym badaniu^[19] test wykonywano w analizatorze STA-R – tak, jak w niniejszym badaniu – podczas gdy w innych pracach stosowano analizator albo STA albo STA Compact (oba z Diagnostica Stago).

Ponieważ wskazania odnośnie dokładności, takie jak wskaźnik wykluczenia, NPV i PPV zależą od częstości występowania choroby, to uogólnienia wniosków wypływających z niniejszego badania należy dokonywać ostrożnie. Chorobowość na ZŻG w niniejszym doniesieniu wyniosła 44,7%, co jest wysokim od-

setkiem w porównaniu do danych innych autorów^[6, 20, 23–27]. Jednakże stosowanie *STA Liatest® D-Di* w analizatorze *STA-R*, z przedstawioną czułością i swoistością, w grupie pacjentów z niską częstością występowania choroby spowodowałoby wyższą NPV i wyższy wskaźnik wykluczenia. Wtedy PPV obniży się, co jednak nie

jest wadą dla testu służącego do wykluczenia rozpoznania, a nie jego potwierdzenia.

Podsumowując, pojedyncze oznaczenie nowego zautomatyzowanego i bardzo szybkiego testu lateksowego do oznaczeń dimeru D, *STA Liatest® D-Di* w analizatorze *STA-R* okazuje się bezpiecznie wykluczać diagnozę ZZG u do 30% pacjentów

ambulatoryjnych z klinicznymi oznakami i objawami ZZG. W niniejszym badaniu porównanie wartości diagnostycznej tego nowego testu do oznaczeń dimeru D z testami *Vidas D-dimer*, *Tinaquant* i *Asserachrom D-dimer* wypada na korzyść tego pierwszego.

Piśmiennictwo dostępne w redakcji.

Diagnostyka zakażeń *chlamydją trachomatis*

Agata Józefiak, Pracownia Patofizjologii Szyjki Macicy, Szpital Ginekologiczno-Położniczy Akademii Medycznej w Poznaniu

Witold Kędzia, Klinika Onkologii Ginekologicznej Akademii Medycznej w Poznaniu

Chlamydia są Gram-ujemnymi bakteriami wewnątrzkomórkowymi o podobnej morfologii i wspólnym z riketsjami polisacharydowym antygenie grupowym. Do tej pory zidentyfikowano trzy ich gatunki patogenne dla ludzi: *C. trachomatis*, *C. pneumoniae* i *C. psittaci*. Ich komórka ma wielkość około 300 nm, zawiera nukleoid i stanowi cząsteczkę zakaźną tzw. ciała elementarne (EB – *elementary bodies*). W wyniku fagocytozy EB wnika do wrażliwych komórek gospodarza. Zwykle są to komórki nabłonka walcowatego spojówki oka i narządów płciowych. Fagosomy zawierające EB łączą się z lizosomami komórek gospodarza i przemieszczają się w pobliże jądra komórkowego. Następnie dochodzi do powstania ciała pierwotnego (RB – *reticulate body*, ciało siateczkowe, retikulocytarne). Wodniczka się powiększa, a zawarte w niej ciała RB ulegają wielokrotnym podziałom. Pojawiają się charakterystyczne małe cząsteczki opisywane jako ciała wtętowe. Niekiedy obok ciałek RB mogą być widoczne ciała pośrednie (IB – *intermediate body*). Pod koniec cyklu replikacji ciała retikulocytarne ponownie przekształcają się w formy podstawowe, które z komórek gospodarza są uwalniane na drodze egzocytozy lub w wyniku lizy komórek gospodarza.

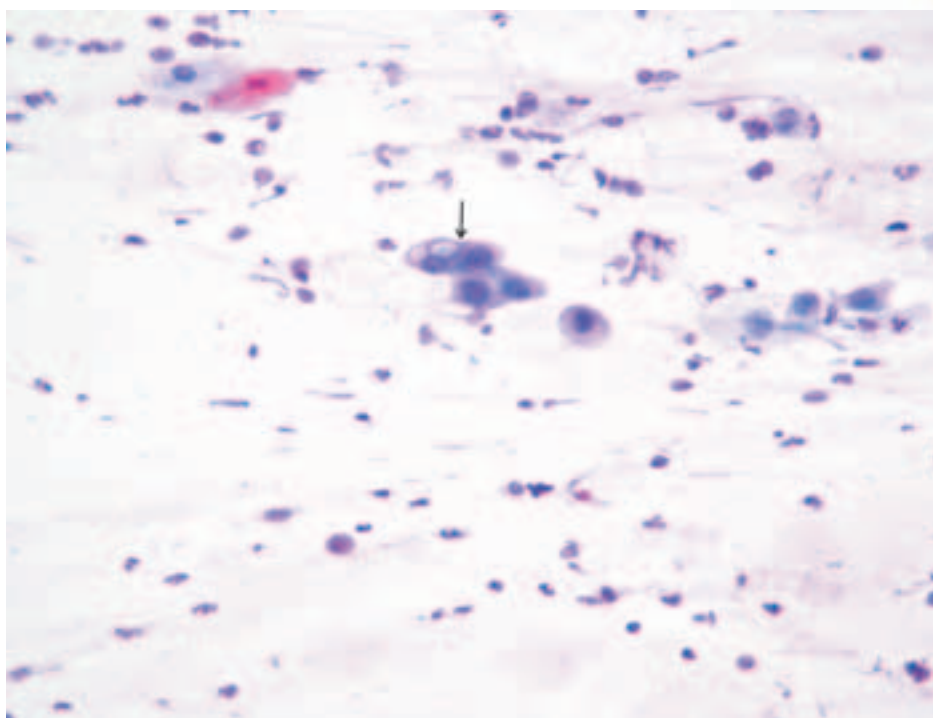
Gatunek *Chlamydia trachomatis* na podstawie antygenów typowo swoistych został podzielony na 15 setypów: serotypy A, B, Ba i C wywołują jaglicę (*trachoma*) zwaną także wtętowym zapaleniem spojówek, serotypy D, E, F, G, H, I, J i K odpowiedzialne są za zakażenie dróg moczowo-płciowych natomiast serotypy L1, L2 i L3 powodują ziarnicę weneryczną (LGV – *lymphogranuloma venereum*).

Jaglica jest jedną z głównych przyczyn ślepoty na świecie i zajmuje trzecie miejsce zaraz po zaćmie (*cataract*) oraz jaskrze (*glaukoma*). Według Światowej Organizacji Zdrowia (WHO – *World Health Organisation*), każdego roku na chorobę tę zapada 150 milionów osób, z czego 6 milionów traci wzrok. Choroba ta rozpoznawana jest w krajach północnej Afryki, Indiach, Azji Południowo-Wschodniej i na Środkowym Wschodzie. W Europie została praktycznie wyeliminowana na początku 20 wieku, głównie poprzez poprawę higieny osobistej. WHO zakłada całkowite jej wyeliminowanie do końca 2020 roku. Jaglica szerzy się wskutek bezpośredniego kontaktu z zakażoną wydzieliną spojówek, używania brudnych ręczników i odzieży osoby zakażonej. Choroba ta prowadzi do powstania blizn powodujących ślepotę. Uważa się, że neonatalne zakażenie oka noworodka *C. tra-*

chomatis oraz chlamydiowe zakażenie oka osoby dorosłej poprzez inokulację patogenu z narządów rozrodczych nie może prowadzić do rozwoju jaglicy.

Najwyższe wskaźniki rozpowszechnienia zakażeń dróg moczowo-płciowych przez *C. trachomatis* odnotowywane są w Afryce Sub-Saharyjskiej, a najniższe we wschodniej Azji i Pacyfiku. Według WHO każdego roku notowanych jest około 89 milionów nowych przypadków genitalnej infekcji *C. trachomatis*. Należy pamiętać, że powyższe dane epidemiologiczne często obejmują tylko pacjentów hospitalizowanych pochodzących z grup wysokiego ryzyka infekcji przenoszonych drogą płciową (STD – *sexual transmitted infections*). Szerzenie się tych zakażeń w populacji jest podtrzymywane przez nierozpoznawalne i nie leczone przypadki infekcji bezobjawowych zarówno u mężczyzn do 50% jak i kobiet do 70% wszystkich infekcji *C. trachomatis* narządów płciowych. Podaje się, że 2–30% mieszkańców krajów rozwiniętych jest zakażonych tym patogenem. Koszty związane z powikłaniami *C. trachomatis* w samej tylko Wielkiej Brytanii wynoszą co najmniej 50 milionów funtów rocznie.

LGV jest natomiast chorobą endemiczną, której występowanie ogranicza się do Afryki, Azji oraz Południowej Ame-



Ciała wtrętowe *C. trachomatis* oraz wakuolizacja jąder komórkowych. Obraz cytologiczny materiału z szyjki macicy. Zdjęcie z mikroskopu świetlnego. Autorzy: prof. Helena Kędzia i mgr Andrzej Gajewski

ryki i Karaibów. W Europie ostatnie przypadki zachorowań na LGV odnotowano w latach 2003/2004. Może przyjmować formę węzłową i uogólnioną znaną też jako Nicolas-Favre.

Jednostki chorobowe związane z infekcją *C. trachomatis*

Blisko 40% nierzęzątkowych zapaleń cewki moczowej (NGU – *non gonococcal urethritis*) wywołanych jest przez *C. trachomatis*. Na drodze wstępującej z pochwy i szyjki macicy może dotrzeć do jamy macicy oraz jajowodów i otaczających je tkanek. U około 50% kobiet z chlamydowym zakażeniem szyjki macicy występuje współistniejące zakażenie cewki moczowej. Cewka, natomiast jest jedynym miejscem infekcji *C. trachomatis* u 20% kobiet.

Zakażenie tym patogenem jest rozpatrywane głównie w aspekcie problemów rozrodczych, ponieważ nie leczone może prowadzić do ostrego zapalenia: przydatków, miednicy mniejszej (PID – *pelvic inflammatory disease*), a w konsekwencji do zrostów okołojajowodowych, zamknięcia jajowodów oraz ciąży pozamacicznej i bezpłodności. Uszkodzenie jajowodów może prowadzić także do ciąży pozamacicznej.

PID może być wywołany również przez mykoplazmy takie jak *mycoplasma genitalium*, endogenną mikrobiologiczną florę pochwy (bakterie anaerobowe i aerobowe), streptococci aerobowe i STI takie jak *C. trachomatis* i *Neisseria gonorrhoeae*. Jednak najczęstszą przyczynę rozwoju tej choroby jest zakażenie *C. trachomatis* (10–40%). Zapalenie miednicy mniejszej w 94% przypadków spowodowane jest infekcjami przenoszonymi przez kontakt płciowy. Badania przeprowadzone w Anglii i Walii wykazały, że PID dotyka ok. 1,7% kobiet w wieku reprodukcyjnym, a w grupie ryzyka są głównie osoby młode w wieku 16–24 lat. Około 30% pacjentek zakażonych tą bakterią skarży się na upławy mające postać ropnej i (lub) krwawej wydzieliny z szyjki macicy oraz bóle podbrzusza i krwawienia kontaktowe.

U mężczyzn zakażonych *C. trachomatis* występuje wyciek z cewki moczowej oraz bolesne oddawanie moczu, jednak często nasilenie objawów jest niewielkie lub pozostają one całkowicie w ukryciu. Zakażenie to może obejmować także odbytnicę i wywoływać wyciek oraz dyskomfort w obrębie odbytnicy i odbytu.

Powikłania infekcji *C. trachomatis* mogą prowadzić także do rozwoju wielu innych poważnych schorzeń, takich jak: zapalenie okołowątrobowe (zespół Fitz-Hugh i Curtisa – *perihepatitis*), czy zespołu Reitera, który łączy w sobie zapalenie cewki moczowej, stawów oraz spojówek i dotyczy znacznie częściej mężczyzn niż kobiety. U mężczyzn może także dojść do zapalenia jąder i najądrzy.

Infekcja ta jest także bardzo niebezpieczna dla noworodków urodzonych drogami natury przez kobiety z chlamydiozą. Dochodzi wówczas do rozwoju wtrętowego zapalenia spojówek i dróg oddechowych (*pneumonia*), które mogą być przyczyną śmiertelnego zejścia. Tylko prawidłowa i wczesna diagnostyka matek oraz noworodków może pozwolić na wdrożenie odpowiedniego leczenia i uniknięcia rozwoju wielu poważnych powikłań.

Laboratoryjna diagnostyka zakażeń *C. trachomatis*

Diagnostyka *C. trachomatis* powinna uwzględniać specyficzne cechy morfologiczne i biologię tych bakterii. Patogen ten jest bezwzględny pasożytem wewnątrzkomórkowym, dlatego hodowla na podłożach mikrobiologicznych nie znajduje tutaj zastosowania. Stosowane metody diagnostyczne opierają się na następujących zasadach:

- wizualizacji drobnoustroju w obrazie mikroskopowym,
- hodowli komórkowej,
- wykrywaniu specyficznych antygenów chlamydowych,
- testach serologicznych,
- badaniach molekularnych.

Wstępnej identyfikacji *C. trachomatis* w materiale klinicznym można dokonać analizując obraz w mikroskopie świetlnym. Wykładnikami infekcji są charakterystyczne ciała wtrętowe oraz wakuolizacja jąder komórkowych (fot. 1). Lepszej wizualizacji infekcji można dokonać poprzez zastosowanie dodatkowego barwienia Giemzą. Technika ta ma niewielką czułość i nie stanowi metody diagnostycznej. Niemniej jednak podejrzenie infekcji *C. trachomatis* powinno zawsze zostać odnotowane w wyniku badania cytologicznego.

Techniką która odznacza się zdecydowanie wyższą czułością 55–85% w odniesieniu do materiału z szyjki macicy jest hodowla komórkowa. Najczęściej stosowanymi liniami komórkowymi są komórki McCoy'a (fibroblasty mysie). Technika ta wymaga jednak materiału o bardzo dobrej jakości, zastosowania wyspecjalizowanej aparatury oraz dużego doświadczenia personelu. Ponadto jest bardzo pracochłonna. Nadal jest stosowana przez niektóre laboratoria badawcze i rekomendowana do weryfikacji wyników innych testów, jednak nie jest powszechnie stosowana przez laboratoria diagnostyczne. Metoda bardzo droga.

Innym badaniem umożliwiającym identyfikację *C. trachomatis* jest test immunofluorescencji bezpośredniej (DFA – *Direct Immunofluorescent Antibody*). W metodzie tej wykorzystuje się monoklonalne przeciwciała skierowane przeciwko białkom komórkowym, które łączą się z ciałkiem elementarnym chlamydii. Testy te są bardzo pracochłonne i odznaczają się niską czułością do 70% dla materiału z szyjki macicy. Nadaje się do analizy każdego materiału.

Znacznie prostsze w wykonaniu są testy immunoenzymatyczne (EIA) oparte na przeciwciałach skierowanych przeciwko powierzchniowym polisacharydom chlamydii. Metoda ta pozwala się zautomatyzować (płuczka i czytnik płytek Eliza). Niestety obarczona jest dużym ryzykiem wyników fałszywie dodatnich. Czułość do 70%.

Wśród najnowszych metod odznaczających się jak do tej pory najwyższą czułością (do 100%) należy wymienić reakcję łańcuchowej polimerazy (PCR – *polimerase chain reaction*) oraz reakcję łańcuchowej ligazy (LCR – *ligase chain reaction*). Techniki amplifikacji kwasów nukleinowych (NAAT – *nucleic acid amplification techniques*) wymagają dużego do-

świadczenia personelu. Niektóre dostępne podłoża transportowe pozwalają przechowywać materiał po pobraniu w temp. pokojowej nawet do 10 h. Tą metodą poza wymazami z szyjki macicy i cewki moczowej można także badać próbki moczu. Próbką materiału musi bezwzględnie zawierać materiał komórkowy. Z uwagi na trudności związane z pobraniem wymazu z cewki moczowej, u mężczyzn jako materiał do badań rekomenduje się próbki porannego moczu (pierwsza część porannego strumienia lub pacjent powinien się wstrzymać od oddania moczu ostatnie 2 godziny przed badaniem), natomiast u kobiet wymazy z kanału szyjki macicy lub próbki moczu (procedura pobrania jak u mężczyzn). Problem diagnostyczny mogą stanowić tutaj czynniki obecne w materiale diagnostycznym (inhibitory amplifikacji) hamujące reakcję. Powodem hamowania reakcji PCR może być nieprawidłowo pobrany materiał np. zawierający śluz lub leki. Koszty tej metody są dość wysokie, jednak można je obniżyć zbierając materiał i wykonując badania w seriach. Metoda ta posiada bardzo dużą czułość do 100% i swoistość ok. 99%.

Idealna czułość badania wynosi >90% przy swoistości >99%. Charakterystykę najbardziej zbliżoną do tych wartości mają metody NAAT. Wątpliwe wyniki ujemne w EIA należy potwierdzić metodą DFA lub NAAT. Dla zakażeń genitalnych *C. trachomatis* oznaczania przeciwciał w krwi nie ma wartości diagnostycznej.

Z uwagi na możliwość wystąpienia wielu poważnych powikłań diagnostyka *C. trachomatis* powinna zostać wykonana w przypadku nawet najmniejszego podejrzenia zakażenia tą bakterią. Niektórzy badacze sugerują wykonywanie testów diagnostycznych u osób aktywnych seksualnie co najmniej raz w roku. Chodzi tutaj głównie o osoby młode poniżej 25 roku

życia. Badanie takie bezwzględnie powinny wykonać pary, które dotyka problem bezpłodności. Ponadto u wszystkich osób, u których stwierdzono zakażenie *C. trachomatis* należy przeprowadzić badania w kierunku innych infekcji przenoszonych przez kontakt płciowy. Takie badanie wydaje się także celowym wykonać u noworodków kobiet z podejrzeniem infekcji *C. trachomatis* oraz zapaleniem płuc. Wówczas jako materiał do badań może posłużyć materiał z nosogardzieli. Oczywiście procedurę pobrania materiału do badań i transport należy ustalić uprzednio z danym laboratorium diagnostycznym.

Infekcja *C. trachomatis* stanowi bardzo poważny problem rozpatrywany głównie w aspekcie patologii rozrodu. Mimo iż ta część badań naukowych rozwija się bardzo intensywnie, informacje pochodzące z wielu krajów nadal nie pozwalają na utworzenie pełnych danych epidemiologicznych dotyczących częstości występowania i rozprzestrzeniania się genitalnych zakażeń *C. trachomatis* między innymi z uwagi na często stosowane metody diagnostyczne nie wystarczająco czule.

Piśmiennictwo:

1. Mirella G.: „Mikrobiologia i choroby zakaźne”, (21), 221–227, 2000.
2. Jean-Louis Blanc B., Boubli L.: „Ginekologia” (58), 460–462, 1995.
3. Słomko Z, Drews K.: „Zakażenia perinatalne”, (40), 532–537, 2001.
4. Zaremba M.L., Borowski J.: „Podstawy mikrobiologii lekarskiej”, (4), 269–271, 1994.
5. Majewski S.: „Wytyczne postępowania w zakażeniu dróg moczowo-płciowych przez *Chlamydia trachomatis*” *Medycyna Praktyczna*, (3), 1–3, 2003.
6. Moss T.R.: „International Handbook of Chlamydia”, 2006.

