

Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy Hradec Králové
Katedra biologických a lékařských věd

Studijní program:
Zdravotnická bioanalytika, bakalářská práce 2007

**Diagnostika a terapie urogenitálních infekcí
způsobených *Chlamydia trachomatis***

Miroslava Hanzlíková

Vedoucí bakalářské práce:
MUDr. Miroslav Förstl a PharmDr. Petr Jílek, CSc.

MUDr. M. Smolodová
Ištil- Foutl

Poděkování:

Poděkování patří mým školitelům, paní Haně Kotlandové z Ústavu klinické imunologie a alergologie FN a LFUK Hradec Králové za precizně zhotovená schémata a panu Miroslavu Holečkovi z Ústavu klinické mikrobiologie FN a LFUK Hradec Králové za pomoc při zpracování dat.

OBSAH:

1. CÍL PRÁCE	str. 4
2. SOUHRN	str. 5
3. HISTORIE	str. 7
4. ETIOLOGIE A PATOGENEZA	str. 8
5. KLINICKÝ OBRAZ	str. 10
6. LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA	str. 13
6.1. Světelná mikroskopie	str. 13
6.2. Elektronová mikroskopie	str. 13
6.3. Kultivace	str. 13
6.4. Stanovení antigenu (<i>Studie 1</i>)	str. 14
6.5. Detekce genomu (<i>Studie 2</i>)	str. 16
6.6. Průkaz specifických protilátek, sérologie	str. 19
7. TERAPIE	str. 20
7.1. Antibiotika	str. 20
7.2. Podpůrná terapie (<i>Studie 3</i>)	str. 21
8. DISKUZE A ZÁVĚR	str. 24
9. LITERATURA	str. 25
10. OBRAZOVÁ PŘÍLOHA	str. 26

1. CÍL PRÁCE

Cílem práce byl pokus přehledně shrnout problematiku, která není ani pro odbornou veřejnost specializovaných lékařů dodnes zcela jasná a přehledná. Cíl pro bakalářskou práci jistě odvážný. Jak má ale tuto problematiku chápat laik, tedy konkrétní pacient, když ani u svého lékaře nebo dokonce v odborných člancích publikovaných v prestižních medicínských časopisech či na Internetu nenachází odpověď na ty nejzákladnější otázky:

Chlamydie, co to vůbec je, co mi vlastně hrozí?

Proč a jak zrovna já?

Jsou problémy s léčbou?

Jak to, že „je zase mám“?

Vyléčím se vůbec někdy?

(Partnerská věrnost...)

Diagnostice chlamydií se naše pracoviště věnuje dlouhodobě, ale „jen“ diagnostika opravdu nestačí. Časem se projevila nutnost spolupráce laboratoře s klinickým lékařem – tedy další jasný příklad, proč by výraz „Klinická mikrobiologie“ neměl být jen prázdným pojmem. Ano, většina dat byla zpracována lékaři (viz níže uvedené publikace), ale byla jsem celou dobu u této práce a můj školitel je zárukou, že jsem se na ní velmi aktivně formou shromažďování dat podílela.

2. SOUHRN

Diagnostika a terapie urogenitálních infekcí způsobených *Chlamydia trachomatis*

Práce stručně shrnuje problematiku urogenitálních chlamydiových infekcí. Zabývá se jejich etiologií i patogenezí, klinickým obrazem, diagnostickými možnostmi a terapií. Její součástí je stručný popis a výsledky tří již publikovaných studií zabývajících se imunofluorescenční diagnostikou antigenu, detekcí genomu polymerázovou řetězovou reakcí a samotnou terapií.

Diagnostics and therapy of urogenital infections caused by *Chlamydia trachomatis*

The study considers problems of urogenital infections caused by *Chlamydia trachomatis*. It deals with their etiology, pathogenesis, the clinical outcome, diagnostics and therapy. It contains the short description and results of three already published studies dealing with the detection of the antigen by the direct fluorescent procedure, the detection of the genome by polymerase chain reaction and the therapy.

Data použitá v této diplomové práci byla již použita při přípravě následujících odborných publikací:

Ad. Studie 1:

Förstl, M., Štěpánová, V., Mlynář, J., Plíšková, L., Fajfr, M., Šplího, M.:

Přímá diagnostika infekcí Chlamydia trachomatis – průkaz antigenu imunofluorescenční metodou.

Interní medicína pro praxi, 2004; 8: s. 412-415.

Förstl, M., Neumann, D., Štěpánová, V., Mlynář, J., Plíšková, L., Fajfr, M., Šplího, M.:

Chlamydia trachomatis: Aktuální pohled, možnosti a limity přímé diagnostiky.

Pediatric pro praxi, 2004; 4: s. 198-202.

Förstl, M., Štěpánová, V., Buchta, V., Kalousek, I., Špaček, J., Veselský, Z., Macek, P., Chrzová, M.:

Chlamydiové infekce urogenitálního traktu – výsledky přímé diagnostiky Chlamydia

Česká gynekologie, 2005; 2: s. 128-133

Förstl, M., Špaček, J., Buchta, V., Čermák, P., Kalousek, I.:

Diferenciální diagnostika zánětů pochvy a zevního genitálu, možnosti a limity mikrobiologického vyšetření.

Česká gynekologie, 2005; 1: s. 79-86

Ad. Studie 2:

Fajfr, M., Förstl, M., Štěpánová, V., Plíšková, L., Fajfrová, J., Valenta, Z., Šplího, M.:

Zkušenosti s detekcí chlamydií pomocí metody PCR.

Klinická mikrobiologie a infekční lékařství, 2005; 4: s. 133-137.

Ad. Studie 3:

Förstl, M., Kalousek, I., Navrátil, P., Štěpánová, V., Fajfr, M.:

Zkušenosti s enzymoterapií v rámci komplexní léčby urogenitálních infekcí Chlamydia trachomatis

Urologie pro praxi, 2006; 5: s. 243-245.

3. HISTORIE

První záznamy o výskytu trachomu pochází již ze starověké Číny a Egypta. Halberstaedter a Prowazek jako první objevili a popsali *Chlamydia trachomatis* v roce 1907 – tzv. Prowazekova tělíška ve stěru z víčka postiženého trachomem. V roce 1910 pak tato tělíška objevil Lindner i ve stěru z děložního hrdla pacientky s cervicitidou. Teprve v roce 1975 Wang a Grayston popsali přenos pohlavní cestou i významné komplikace. Rutinní diagnostika zaznamenala úspěchy dokonce až na konci 20. století.

4. ETIOLOGIE A PATOGENEZA (1, 6, 10, 11, 13)

Chlamydia trachomatis je gramnegativní bakterie. V lidském těle se množí v epitelu urogenitálního systému, spojivek, dýchacích cest, v makrofázích a u chronických infekcí se setkáme s poškozením kloubní výstelky nebo endotelu. Manifestace infekce v močových a pohlavních orgánech ji řadí mezi sexuálně přenosné nemoci, ale povinnému hlášení zatím nepodléhá.

Extracelulárně mají chlamydie podobu drobných infekčních elementárních tělísek (ET; 250–400 nm). Až v napadených buňkách, tedy intracelulárně, se ET transformuje v neinfekční, ale metabolicky aktivní retikulární tělísko (RT; 800-1200 nm). Již po 8–9 hod. probíhá první binární dělení, jehož výsledkem jsou po kondenzaci dvě nová ET. To vše za spotřeby „hostitelské ATP“ (adenosin tri fosfát), tedy energie (energetický parazitizmus). Výsledkem celého vývojového cyklu (obr. 1) může být až 10 000 nových infekčních elementárních tělísek v jediné buňce. K jejich uvolnění dochází buď při ruptuře buňky, nebo exocytózou, postupným uvolňováním tělísek z buňky, což je charakteristické pro chronickou formu infekce.

Pro člověka jsou z rodu *Chlamydia* patogenní 3 druhy, někteří autoři uvádějí dokonce 4 (tabulka 1 a 2). V této práci se dále zabýváme pouze druhem *Ch. trachomatis*, který lze dále dělit na 18 sérovarů – tomuto dělení odpovídá i klinická manifestace (tabulka 3).

Tabulka 1 – Chlamydie patogenní pro člověka a typické antigeny pro jejich diagnostiku, (dřívější klasifikace)

čeleď	<i>Chlamydiaceae</i>	
rod	<i>Chlamydia</i>	společný rodový lipopolysacharidový antigen
druh	<i>Chlamydia trachomatis</i> <i>Chlamydia pneumoniae</i> <i>Chlamydia psittaci</i> (<i>Chlamydia pecorum</i>)	proteinové antigeny – vnější membránové proteiny pro rozlišení druhů

Tabulka 2 – Nové rozdělení čeledi *Chlamydiaceae* do dvou rodů (1999)

rod	<i>Chlamydia</i>	LPS
druh	<i>Chlamydia trachomatis</i>	MOMP
rod	<i>Chlamydophila</i>	
druh	<i>Chlamydophila pneumoniae</i> <i>Chlamydophila psittaci</i> (<i>Chlamydophila pecorum</i>)	MOMP

(Faktem zůstává, že radikální změna v klasifikaci s ustavením nového rodu *Chlamydophila* z roku 1999 se v praxi dosud zcela nevžila.)

5. KLINICKÝ OBRAZ (1, 3, 5, 6, 7, 8)

Stručný přehled manifestace chlamydióz je uveden v tabulce č. 3. Stejnou formou je v tabulce č. 4 zpracován i přehled o správných odběrech materiálu pro jejich diagnostiku.

Zvláštní kapitolou v problematice chlamydií je dětské lékařství. V pediatrické praxi stojí *Ch. trachomatis* v popředí především pro možnost vertikálního přenosu z matky, tedy především jde o klinicky závažnou problematiku novorozeneckých konjunktivitid a pneumonií. Klinicky se tyto infekce získané v porodních cestách nejčastěji manifestují jako **akutní inkluzní konjunktivitida novorozenců** nebo jako **primární atypická pneumonie** (v praxi by měl být prováděn vždy sdružený odběr spojivka + materiál z dolních cest dýchacích), raritně snad i **zánět středního ucha**. S rostoucím věkem dětí nadále představují nebezpečí **konjunktivitidy a atypické pneumonie** až s obrazem fibrotického procesu, vzácností nejsou ani **kloubní manifestace**. Navíc je třeba u všech uvedených projevů počítat i s etiologií *Ch. pneumoniae* popř. s plicní manifestací *Ch. psitaci*. S **urogenitální infekcí** *Ch. trachomatis* se lze v dětském věku setkat jen raritně (přenos při společné koupeli nebo trestněprávní případy, ale se získáváním prvních sexuálních zkušeností adolescentů se situace zásadně mění.

Tabulka 3 – Onemocnění vyvolaná jednotlivými sérovary *Ch. trachomatis*.

sérovar	onemocnění
A, B, Ba, C	- trachom (endemický výskyt v tropech a subtropích, v ČR ne)
D, Da, E, F, G, H, I, Ia, J, K	<ul style="list-style-type: none"> - inkluzní konjunktivitida - uretritida (primární nekapavčitá nebo postgonokoková uretritida) - epididymitida, prostatitida - cervicitida, endometritida, bartolinitida, salpingitida - chronický zánět v malé pánvi, periapendicitida, perihepatitida - Fitz-Hugh-Curtisův syndrom (akutní perihepatitida) - Reiterův syndrom (konjunktivitida, uretritida a artritida popř. i mukokutánní léze) - reaktivní artritida - proktitida, faryngitida - chlamydiové infekce novorozenců (akutní inkluzní konjunktivitida, pneumonie i za několik měsíců, mesotitida) - pneumonie starších dětí a dospělých - ateroskleróza (?) - astma (?) - některé karcinomy (?)
L1, L2, L2a, L3	<ul style="list-style-type: none"> - lymfogranuloma venereum (endemický výskyt v tropech a subtropích, v ČR ne)

Tabulka 4 – Odběry materiálu na průkaz antigenu

děložní čípek a vagina	po důkladném odstranění hlenu (s ním je preparát nehodnotitelný) provést speciální odběrovou soupravou buď dva samostatné stěry, nebo jen jeden společný; získaný materiál nanést v tenké vrstvě na odmaštěné podložní sklo a nechat zachnout
ženská uretra	jeden zaschlý stěr na podložním skle
mužská uretra	pacient před odběrem 2-3 hodiny nemočí; z ústí močové trubice provést sterilní bakteriologickou kličkou razantní stěr epitelii z hloubky cca 4 cm a přenést jej krouživým pohybem do kapky fyziologického roztoku na podložním skle a nechat zachnout
moč	její hodnocení ať již IF, nebo PCR je přinejmenším sporné – chlamydie se množí v epiteliiích a sediment vzorku jich nemusí obsahovat dostatek (v případě, že je tento vzorek přesto doporučen, nesmí pacient před odběrem 2-3 hodiny močit a odebírá se první porce)
prostatický sekret, sperma	nátěry na sklíčku, sperma je jen obtížně hodnotitelné
oko – spojivka	výtěr z očí může být pro průkaz antigenu problematický materiál, ale jen při chybném odběru; pokud je setřeno dostatečné množství epitelii a jsou ze suchého odběrového tampónu řádně otisknuty (válivým pohybem) na podložní sklo, je odečet celkem snadný a podle porovnání se souběžně provedenou metodou PCR (opět suchý odběrový tampón) spolehlivý
dolní cesty dýchací – laváž (BAL), aspirát, sputum a u malých dětí žaludeční aspirát	sediment z laváží a aspirátů je sice vyšetřován až po centrifugaci, přesto je odečet velmi obtížný, protože nacházíme jen malé množství epitelii; IF vyšetření by mělo sloužit jen pro orientaci a vždy (!) by mělo být doplněno metodou PCR
extirpovaná uzlina	pouze u lymfogranuloma venereum

6. LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA (1, 2, 3, 6, 9, 12)

Naše laboratoř disponuje jak metodou přímého imunofluorescenčního (IF) průkazu antigenu, tak jsme schopni nálezy konfirmovat pomocí metody detekce genomu – polymerázovou řetězovou reakcí (PCR). Naše možnosti doplňuje metoda stanovení sérových protilátek proti lipopolysacharidovému antigenu rodu *Chlamydia*.

Komplexní hodnocení mikrobiologického materiálu založené na více metodikách je dnes už pro kvalitní laboratoř nezbytné, jedna jediná naprosto spolehlivá metoda opravdu neexistuje!!!

6.1. Světelná mikroskopie

(tuto metodu nevyužíváme)

V epitelích v preparátu ze stěru nebo seškrabu obarveném **Lugolovým roztokem** je možné nalézt charakteristické buněčné inkluze, u *Ch. trachomatis* totiž obsahují fagosomy napadené buňky jódem hnědě se barvící glykogen. K dispozici jsou i další barvicí techniky (**Giemsa-Romanowski, barvení dle Macchiavella, dle Gimeneze**).

(Fluorescenční mikroskop je využíván pro průkaz antigenů – viz ⁶§.4.)

6.2. Elektronová mikroskopie

(tuto metodu nevyužíváme)

V odůvodněných případech je k dispozici na specializovaných pracovištích.

(Národní referenční laboratoř pro přímou diagnostiku virů, bakterií a cizorodých buněk v klinickém materiálu pomocí elektronmikroskopických metod, Státní zdravotní ústav, Praha.)

6.3. Kultivace

(tuto metodu nevyužíváme)

S kultivací chlamydií se nejen v ČR vzhledem ke značné metodické i časové náročnosti takřka nesetkáme. Vyšetřovaný materiál lze kultivovat na žloutkovém vaku

kuřecího embrya, na buněčných kulturách (McCoy, HeLa), popř. ho očkovat do mozku, peritonea nebo nosu laboratorní myši.

6.4. Stanovení antigenu

Pro vyšetření přítomnosti antigenu *Ch. trachomatis* pomocí **přímé imunofluorescence (IF)** je třeba do laboratoře zaslat buď nefixovaný preparát na podložním skle, nebo materiál tekutý (laváž, aspirát, sputum; sperma). Doručený preparát se v laboratoři chemicky fixuje, pak „barví“ konjugátem (monoklonální druhová protilátka proti hlavnímu membránovému proteinu značená fluorescenčním barvivem) a po přidání kapky glycerolu a překrytí krycím sklíčkem se pomocí fluorescenčního mikroskopu hodnotí. Zpracování a vyhodnocení je otázkou několika hodin. (obr. 2, 3, 4, 5)

Pro stanovení antigenu dále připadají v úvahu i metody **enzymoimunoanalytické (EIA)**. Problematické je ale vyhodnocení reakce, protože naprosto chybí jakákoli kontrola, jsou-li vůbec přítomné buňky epitelu!

STUDIE 1:

*Cílem retrospektivní studie zpracované a publikované kolektivem našeho pracoviště bylo zjistit četnost přítomnosti antigenu *Ch. trachomatis* výše zmíněnou imunofluorescenční metodou ve vyšetřeném souboru vzorků od pacientů s podezřením na chlamydiovou infekci z východočeského regionu z let 1997–2003. Pro vyšetření **antigenu** byly použity komerční soupravy Pathfinder firmy BIO-RAD Chlamydia trachomatis direct specimen (Direct antigen detection system), které jsou určeny k detekci membránových proteinů elementárních i retikulárních tělísek všech sérotypů *Ch. trachomatis*. V uvedeném období byly k vyšetření doručeny **materiály z urogenitálního systému mužů a žen** (stěry z močových trubic; z děložního čípku a vagíny dohromady nebo zvlášť), **dále stěry ze spojivek a materiály z dolních cest dýchacích** (bronchoalveolární laváže, aspiráty a sputa – zde je třeba nejprve provést zkapalnění a koncentraci.*

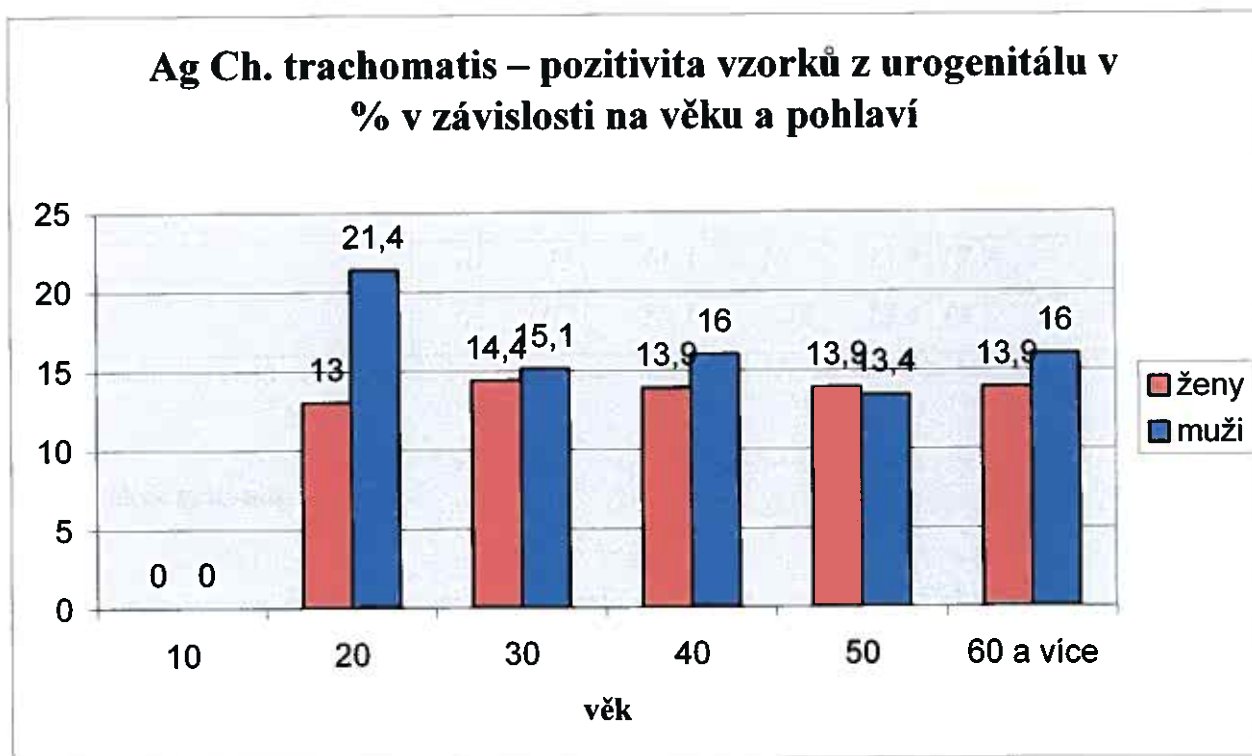
Výsledky

Pro stručnost jsou zde výsledky studie prezentovány jen formou jednoduchých čísel:

Tabulka 1 – Antigen Ch. trachomatis 1997–2003

vzorky	vyšetřeno celkem	pozitivní	pozitivita v %
všechny vzorky	6126	881	14,4
spojivky	340	48	14,1
dolní cesty dýchací	54	2	3,7
urogenitál ženy	3515	494	14,1
urogenitál muži	2217	337	15,2

Graf 1



Tabulka 2

Pozitivita vzorků od žen s podezřením na chlamydiovou urogenitální infekci v závislosti na věku

ženy věk	>10	>20	>30	>40	>50	60 a více
vyšetřeno celkem	4	92	1383	1131	567	338
pozitivních	0	12	199	157	79	47
promořenost (%)	0	13	14,4	13,9	13,9	13,9

Tabulka 3

Pozitivita vzorků od mužů s podezřením na chlamydiovou urogenitální infekci v závislosti na věku

muži věk	>10	>20	>30	>40	>50	60 a více
vyšetřeno celkem	6	28	803	700	417	263
pozitivních	0	6	121	112	56	42
promořenost (%)	0	21,4	15,1	16	13,4	16

Tabulka 4

Pozitivita v % v závislosti na věku a pohlaví

	>10	>20	>30	>40	>50	60 a více
ženy	0	13	14,4	13,9	13,9	13,9
muži	0	21,4	15,1	16	13,4	16

Všechny pozitivní případy ve druhém decéniu byly zaznamenány až po 15. roku života pacientů!

6.5. Detekce genomu

V současnosti se v diagnostice chlamydií stále více využívají molekulárně biologické metody – podle světových „guidelines“ je nutné použít amplifikační metody buď **polymerázové řetězové reakce (PCR)**, nebo **transkriptní mediované amplifikace (TMA)**. V úvahu přichází z metod amplifikačních ještě **ligázová řetězová reakce (LCR)**, nebo metody bez amplifikace, tzn. **genové sondy (GS)**.

V Laboratoři molekulární biologie (společné pracoviště ÚKBD a ÚKM FN Hradec Králové; vedoucí PharmDr. Lenka Plíšková) je pro detekci chlamydiových infekcí používána metoda tzv. „nested“ PCR, což je zjednodušeně řečeno dvojstupňová PCR. Takto

modifikovaná metoda je schopna zachytit mnohem menší počet kopií DNA nežli klasická PCR. V první reakci, trvající zpravidla 35 cyklů, jsou použity tzv. vnější primery (outer primer). Ve druhé, následné reakci jsou použity tzv. primery vnitřní (inner primer). Reakce trvá opět 35 cyklů a produkt je následně analyzován na agarovém gelu s ethidium bromidem pomocí elektroforézy.

Jako materiál slouží stěr na suchém sterilním odběrovém tampónu (popř. speciální komerční souprava), biopsie, moč, krev.

Výsledek lze získat řádově v hodinách, maximálně dnech.

STUDIE 2:

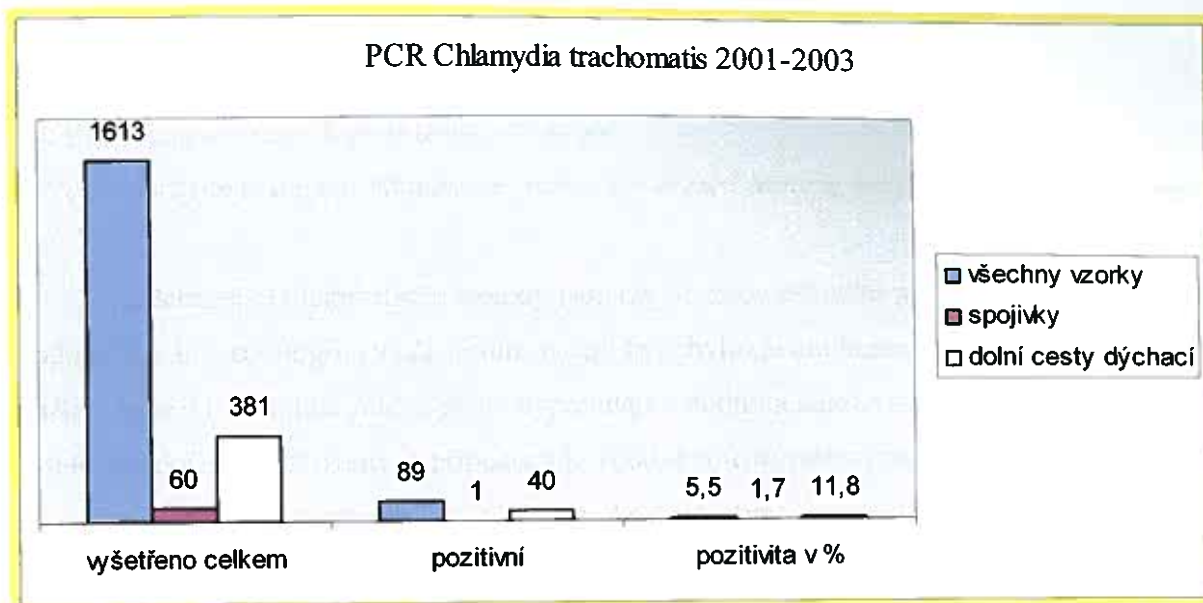
Cílem druhé retrospektivní studie bylo sumarizovat a zhodnotit výsledky pacientů vyšetřovaných pomocí metody PCR s podezřením na infekci způsobenou zástupci čeledi Clamydiaceae. Studie pracovala a daty získanými za tříleté období, v regionu východních Čech a diagnostikovanými na Oddělení molekulární genetiky společného pracoviště ÚKBD a ÚKM.

Celkem bylo za období v letech 2001 až 2003 vyšetřeno na Oddělení molekulární genetiky ÚKBD 1613 vzorků, z toho bylo 556 z FN Hradec Králové a 1057 z jiných nemocnic či zařízení.

Z celého souboru bylo celkem 90 vzorků pozitivních, 20 vzorků s nejasným výsledkem či hraniční hodnotou a u 28 vzorků nešlo vyšetření provést, 1478 vzorků bylo vyhodnoceno jako negativní (viz Graf 2)

I přes poměrně vysokou cenu jednotlivého vyšetření lze i na této malé studii dokumentovat vzrůstající počet vyšetření touto metodou. Bylo-li v roce 2001 provedeno 291 vyšetření, tak v roce 2002 to bylo již 526 a v roce 2003 dokonce 760 vyšetření.

Graf 2



Dále bylo zjištěno že bylo vyšetřeno celkem 662 vzorků od mužů, z nichž bylo 40 pozitivních (6,0 %) a 9 s nejasným výsledkem (1,4 %) a 951 vzorků od žen, kde bylo 50 pozitivních (5,3 %) a 11 s nejasným výsledkem (1,2 %).

Pozitivity vzorků viz následující tabulka:

Tabulka 5

vzorky	vyšetřeno celkem	pozitivní	pozitivita v %
všechny vzorky	1613	89	5,5
spojivky	60	1	1,7
dolní cesty dýchací	381	40	11,8

Spektrum vyšetřovaných vzorků – klinik si nejčastěji žádá vyšetření z moči, BALu (bronchoalveolární laváž) a z plné krve (viz Tabulka 5).

Maximum vyšetřovaných vzorků bylo z věkové skupiny 20-29letých (25 %) a 30-39letých (17 %). U žen věkové rozvrstvení vcelku koreluje s celkovými počty (29,8 % u věkové skupiny 20-29 let a 15,6 % u věkové skupiny 30-39 let), zatímco u mužů je viditelný rozdíl, kdy nejvíce vzorků pochází ze skupiny 0-9 let (19,8 %) následováno skupinou 30-39 letých (18,6 %).

Co se týká pozitivních výsledků, tak zde je jich nejvíce v celém souboru u věkových skupin 20-29 let (5,8 %) a 40-49 let (6,4 %). U žen bylo nejvíce pozitivních vzorků ve

věkových skupin 20-29 let (5,3%) a 10-19 let (7,5%). U mužů pak ve věkových skupinách 0-9 let (6,1 %) a 20-29 let (7,1 %).

6.6. Průkaz specifických protilátek, sérologie

(metodu využíváme, ale její výsledky nejsou součástí této práce a nebyly dosud publikovány)

Předcházející diagnostické metody jsou tzv. metody přímého průkazu. Pro nepřímou diagnostiku, tzv. sérologii, slouží sérum (nesmí být chylózní ani hemolytické!) získané ze srážlivé krve. U lokálních zánětů je ale vypovídající hodnota nálezu sérových protilátek problematická a v indikovaných případech je vhodné toto vyšetření ordinovat až po konzultaci konkrétního případu s klinickým mikrobiologem.

Metody typu komplement fixační reakce (KFR) nebo imunofluorescenční (IF) se již pro stanovení protilátek neuvžívají, sérologické laboratoře totiž ovládly **enzymoimunoanalýzy (EIA)**. Pro serologickou diagnostiku chlamydií existují komerčně vyráběné soupravy využívající buď rodový lipopolysacharidový antigen, nebo vnější membránové proteiny. Spolehlivější/přesnější jsou diagnostické soupravy využívající vnější membránové proteiny, protože ty jsou charakteristické pro konkrétní druh. Na druhé straně je nutné počítat s dvojnásobným zvýšením finančních nákladů, protože je prokázáno, že i *Ch. pneumoniae* vzácně vyvolá některé klinické projevy charakteristické pro *Ch. trachomatis* a naopak (konjunktivitida *Ch. pneumoniae*; pneumonie *Ch. trachomatis* u starších dětí a dospělých).

V praxi zatím není zcela doceněn význam metody **western blot** stejně jako význam slizničních IgA, jejichž průkaz se běžně neprovádí. Výsledky jsou podle vybavení laboratoře dostupné do několika hodin nebo dnů po odběru.

I když se v této práci vyšetřováním protilátek dále nezabýváme, tvoří u chlamydióz důležitou součást komplexního diagnostického spektra. Vždy je třeba si uvědomit:

- Tzv. „**diagnostické okno**“ – tedy dobu uběhlou od nákazy do vytvoření dostatečně vysokého množství volných sérových protilátek, které je již daná diagnostická souprava schopna detekovat. U lokálního zánětu navíc může být protilátková odpověď značně opožděná, pokud se dostatečná hladina protilátek vytvoří vůbec.

- Anamnestické protilátky třídy **IgG** nás pouze informují o tom, zda se s touto infekcí pacient v minulosti již setkal. Jejich negativita stejně jako pozitivita nevylučují ani nepotvrzují právě probíhající infekci.
- Pozitivita **IgM** nebo sérových **IgA** protilátek nás informuje o primoinfekci, reinfekci nebo o chronické infekci. Jejich negativita ale nikdy nevylučuje akutní lokální chlamydiózu, při které je ze stěru pozitivní antigen i průkaz nukleové kyseliny. Na druhé straně při chybném odběru nebo při chlamydiovém zánětu mimo dosah odběrové soupravy může být právě pozitivita IgM a IgA jediným vodítkem. Interpretačním problémem zůstává dlouhodobé přetrvávání těchto protilátek.

7. TERAPIE (4, 5, 6)

7.1. Antibiotika (ATB)

Léky vhodné k terapii chlamydióz musí splňovat následující kritéria. Chlamydie by na ně měly být citlivé, terapeutických hladin musí dosahovat v endosomech (přeměna RT na nová ET) a lze je podávat dlouhodobě (týdny).

Za lék volby u akutních stavů (a u těhotných a dětí) je dnes považován **azitromycin**, který je transportován makrofágy přímo do místa zánětu a má velmi dobrou farmakokinetiku, tkáňovou a buněčnou penetraci. Z makrolidů lze použít ještě roxitromycin, spiramycin a josamycin.

Další terapeutickou možností jsou antibiotika tetracyklinová, zejména **doxycyklin**. Lék je kontraindikován u dětí do 8mi let, těhotných a kojících, pozor na hepatotoxicitu, gastro a fototoxicitu.

Dále lze použít také chinolony, zejména **ciprofloxacin** a ofloxacin. Chinolony jsou kontraindikovány do 18ti let věku, v graviditě a laktaci. Náležitou pozornost je třeba věnovat i jejich dalším četným nežádoucím účinkům – indikace jsou proto vyhrazeny pro vážné a chronické stavy, v těchto případech je navíc volena kombinace s antibiotiky výše uvedenými, zejména s azitromycinem.

Zvláště u fibrotických procesů se podávají **kortikosteroidy**. Preferuje se dlouhodobá antibiotická léčba po dobu více týdnů, protože eradikace chlamydií *in vivo* je často obtížná, dochází pouze k jejich redukcí s rizikem vzniku perzistence. **Kontrolní výtěry** s dostatečným časovým odstupem (alespoň 4 týdny) musí být samozřejmostí!

7.2. Podpůrná terapie

STUDIE 3:

Cílem třetí práce publikované kolektivem naší laboratoře ve spolupráci s klinickými odborníky bylo v praxi ověřit dobré zkušenosti s podpůrnou enzymoterapií.

Do našeho sledování bylo zařazeno 32 pacientů (16 mužů a 16 žen z heterosexuálních partnerských párů) s nově zjištěnou akutní nekomplikovanou chlamydiovou urogenitální infekcí.

*Diagnostika byla provedena ve výtěrech z močové trubice mužů a z močové trubice i hrdla děložního žen pomocí přímého průkazu antigenu *Chlamydia trachomatis* komerční imunofluorescenční metodou.*

Všichni pacienti byli léčeni azitromycinem (AZT) v dávkách 1 x 500 mg/den po 3 dny, polovina párů navíc užívala jako podpůrnou léčbu ještě Wobenzym (W) v dávkách 3 x 5 tbl/den po 14 dní (Tabulka 6). Za 4 týdny po dobrání antibiotik byly provedeny u každého kontrolní výtěry.

Úspěšnost zvolené terapie: Pacienti léčeni pouze AZT – 9 pacientů negativních z 16, tedy úspěšnost léčby 56,25 % (muži 5 z 8, 62,5 %; ženy 4 z 8, 50 %). Pacienti léčeni AZT v kombinaci s W – 13 negativních pacientů z 16, tedy úspěšnost léčby 81,25 % (muži 6 z 8, 75 %; ženy 7 z 8, 87,5 %) (Tabulka 7 a Graf 3).

Tabulka 6 (vyňato ze Souhrnů údajů o přípravcích)

<p>azitromycin</p>	<ul style="list-style-type: none"> - makrolidové bakteriostatické antibiotikum II. generace - inhibice proteosyntézy bakteriální buňky - úzké antibakteriální spektrum - výjimečně dlouhý biologický poločas (60 hodin) - vysoký průnik do tkání a buněk - velmi dobrá tolerance
<p>Wobenzym</p>	<ul style="list-style-type: none"> - směs proteolytických enzymů s protizánětlivým účinkem (pankreatinum, papainum, bromelaina, lipasum, amylasum, trypsinum, chymotrypsinum, rutosidum trihydricum) - tzv. efekt vehikula (dosažení vyšší sérové i tkáňové koncentrace ATB při současném podávání) - imunomodulační efekt (proteinázy odbourávají cirkulující, shluklé i fixované imunokomplexy a brzdí jejich tvorbu, dále zvyšují fagocytární i cytolytickou aktivitu granulocytů, optimalizují produkci některých cytokinů jako je TNF alfa, IL 1 beta, IL 6, INF gama apod. - fibrinolytický a lipolytický efekt (aktivuje fibrinolýzu cestou aktivace plazminogenu, rozpouští mikrotromby a snižuje viskozitu krve, tzn. zlepšuje porušenou mikrocirkulaci) - antiflogistický efekt a antiedematózní účinek (redukce otoků zánětlivého i nezánnětlivého původu) - velmi dobrá tolerance

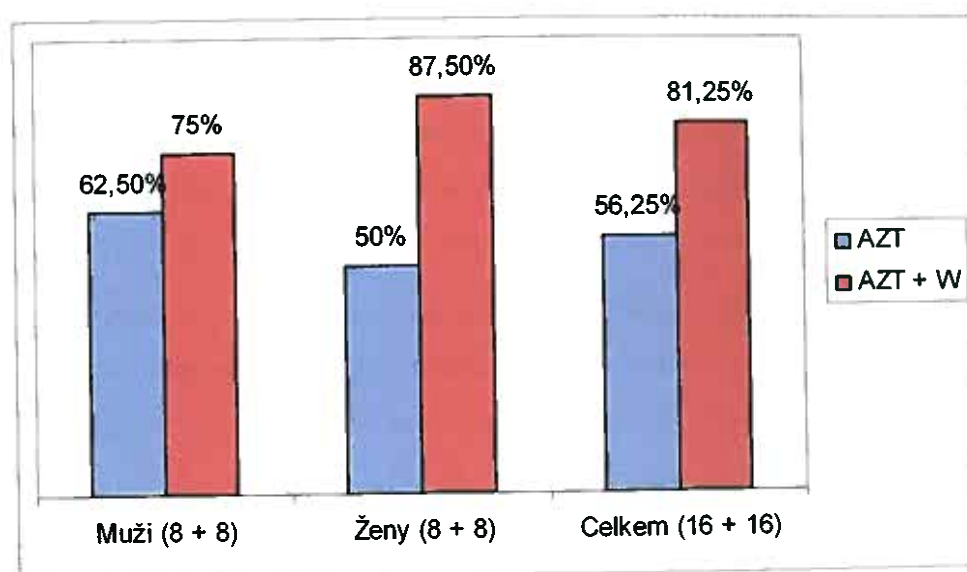
Tabulka 7

	Muži (16) (vyléčení/z kolika)	Ženy (16)	Celkem
AZT *	5/8	4/8	9/16
	62,5 %	50 %	56,25 %
AZT + W **	6/8	7/8	13/16
	75 %	87,5 %	81,25 %

*azitromycin 1 x 500 mg/den po 3 dny

** azitromycin 1 x 500 mg/den po 3 dny + Wobenzym 3 x 5 tbl/den po 14 dní

Graf 3



8. DISKUZE A ZÁVĚR

Přímá diagnostika infekcí *Chlamydia trachomatis* pomocí průkazu antigenu imunofluorescenční metodou je spolehlivá metoda, která měla a má své místo v diagnostickém spektru mikrobiologických laboratoří. Ke kontrole nebo confirmaci sporných výsledků je však bezpodmínečně nutné mít k dispozici vždy i další metody, např. PCR a průkaz protilátek.

Problematickou kapitolou nadále zůstávají chronické chlamydiózy ve vyšších etážích urogenitálního systému, kde existuje možnost negativního stěru z pro odběr dostupné etáže nižší – musíme připustit, že takové případy opravdu mohou přímé diagnostice unikát. Zde je nutné pro vyšší citlivost považovat za metodu volby PCR.

(Na tomto místě je třeba bohužel také zdůraznit, že dle našich zkušeností značný počet pozitivních nálezů antigenu zejména z menších laboratoří a méně vybavených laboratoří bohužel ne vždy odpovídá skutečnosti! Často jsme totiž v poslední době ošetřujícími lékaři vyzýváni k ověření jejich výsledků ze stejného odběru a mnohé často i „opakovaně pozitivní“ případy se na našem pracovišti metodou průkazu antigenu doplněnou navíc vyšetření nukleové kyseliny popř. i průkazem protilátek bohužel nepotvrdí...)

Terapii pouze azitromycinem (tedy „lékem volby“) již nelze bez výhrad doporučit jako lék volby urogenitálních chlamydiových infekcí. Ověřili jsme si vlastní praktické zkušenosti – tato terapie není univerzální, téměř polovina našich pacientů nebyla vyléčena a tvrzení o spolehlivém léku volby se tak jeví přinejmenším jako sporné

Kombinovaná terapie azitromycin + Wobenzym je pro akutní nekomplikované urogenitální chlamydiózy výrazně účinnější než samotná terapie AZT, i když ani ona není (a nemůže být) ve všech případech 100% zárukou úspěchu. Podstata tohoto účinku Wobenzymu by měla být podrobněji studována, zejména její možný vliv na reakci imunitního systému hostitele na chlamydiovou infekci.

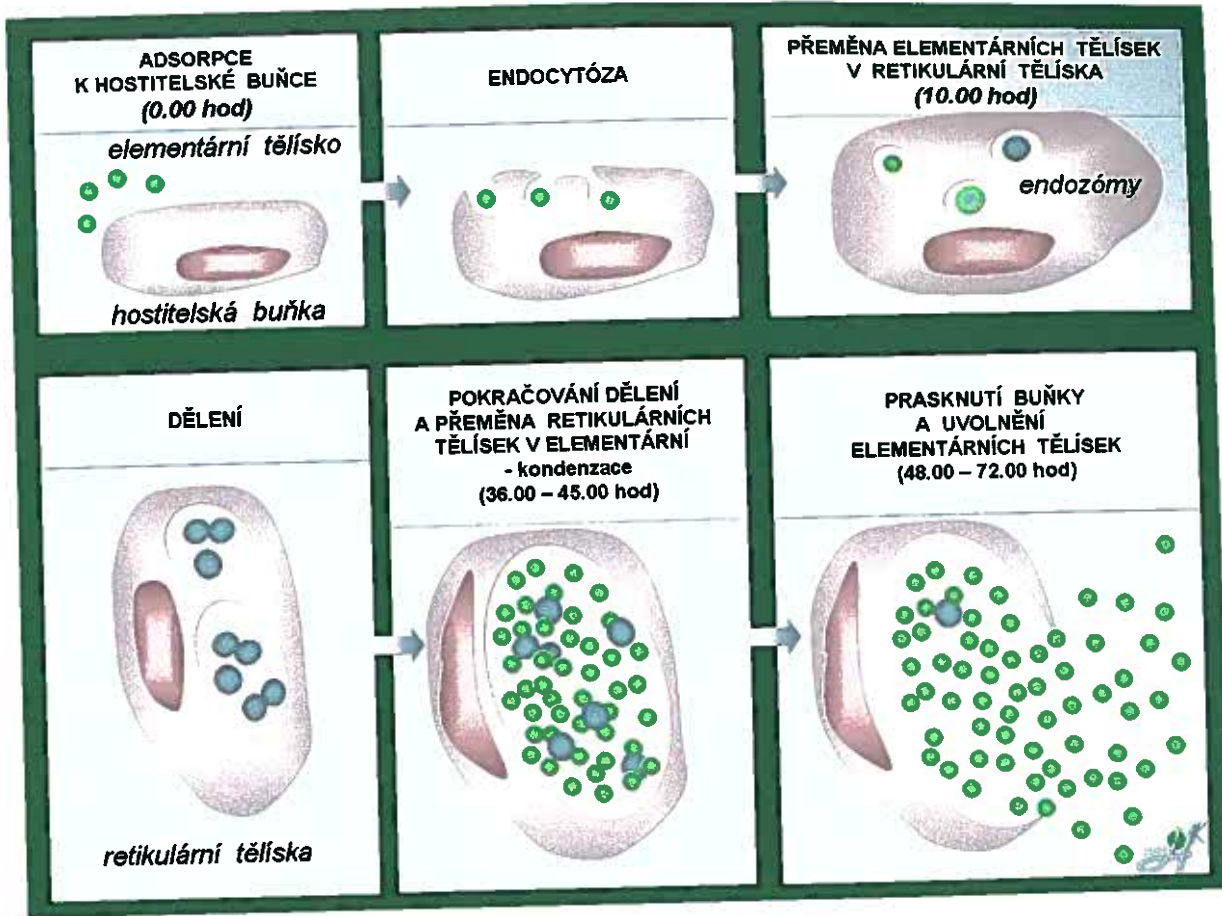
Kontrolní výtěry v dostatečném odstupu alespoň 4 týdny po léčbě jsou naprostou nutností pro hodnocení její úspěšnosti, spoléhat se pouze na ATB nebo na ústup příznaků u manifestní formy nelze.

9. LITERATURA

1. Bednář, M., Fraňková, V., Schindler, J., Souček, A., Vávra, J.: Lékařská mikrobiologie. Marvil, 1996: s. 325–333.
2. Cribb, P., Scapini, J.P., Serral, E.: One-tube Nested Polymerase Chain Reaction for Detection of *Chlamydia trachomatis*. Mem Inst Oswaldo Crus, Rio de Janeiro, September 2002; Vol.97(6): p. 897–900.
3. Gebouský, P., Kapla, J., Kosina, P.: Doporučené postupy pro praktické lékaře. 2002: <http://www.cls.cz/dp/2002/t230.rtf>
4. Jarčuška, P.: Liečba chlamýdiových infekcií. In: Medková, Z., Kalousek, I., Jarčuška, P.: Chlamydiové infekce. Triton Praha, 2001: s. 72–93.
5. Marešová, V.: Infekce močových cest. In: Havlík, J., et al.: Infekční nemoci. 2002, Galén: s. 99–103.
6. Medková, Z., Kalousek, I., Jarčuška, P.: Chlamydiové infekce. Triton Praha, 2001.
7. Ondrovčík, P.: Močové infekce. In: Votava, M., Ondrovčík, P.: Vybrané kapitoly z klinické mikrobiologie. Masarykova univerzita Brno, 2000: s. 61–66.
8. Ondrovčík, P.: Sexuálně přenosné nemoci. In: Votava, M., Ondrovčík, P.: Vybrané kapitoly z klinické mikrobiologie. Masarykova univerzita Brno, 2000: s. 66–74.
9. Ong, G.M., Wyatt, D.E., ONiell, H.J., McCaughey, C., Coyle, P.V.: A comparison of nested polymerase chain reaction and immunofluorescence for the diagnosis of respiratory infections in children with bronchiolitis, and the implications for a cohorting strategy. Journal of Hospital Infection, 2001; 49: p. 122–128.
10. Schachter, J., Ridgway, G.L., Collier, L.: Chlamydial diseases. In: Collier, L., Balows, A., Sussman, M.: Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections, Volume 3, Bacterial Infections. 9 ed., Arnold London, 1998: p. 977–994.
11. Smith, I.W.: Chlamydie. In: Greenwood, D., Slack, R.C.B., Peutherer, J.F., a kol.: Lékařská mikrobiologie. Grada, 1999: s. 369–377.
12. Votava, M.: Rod *Chlamydia*. In: Votava, M. a kol.: Lékařská mikrobiologie II – Přehled vyšetřovacích metod. Masarykova univerzita Brno, 2000: s. 204–05.
13. Woznicová, V.: Chlamydie. In: Votava, M. a kol.: Lékařská mikrobiologie speciální. Neptun, 2003: s. 173–176.

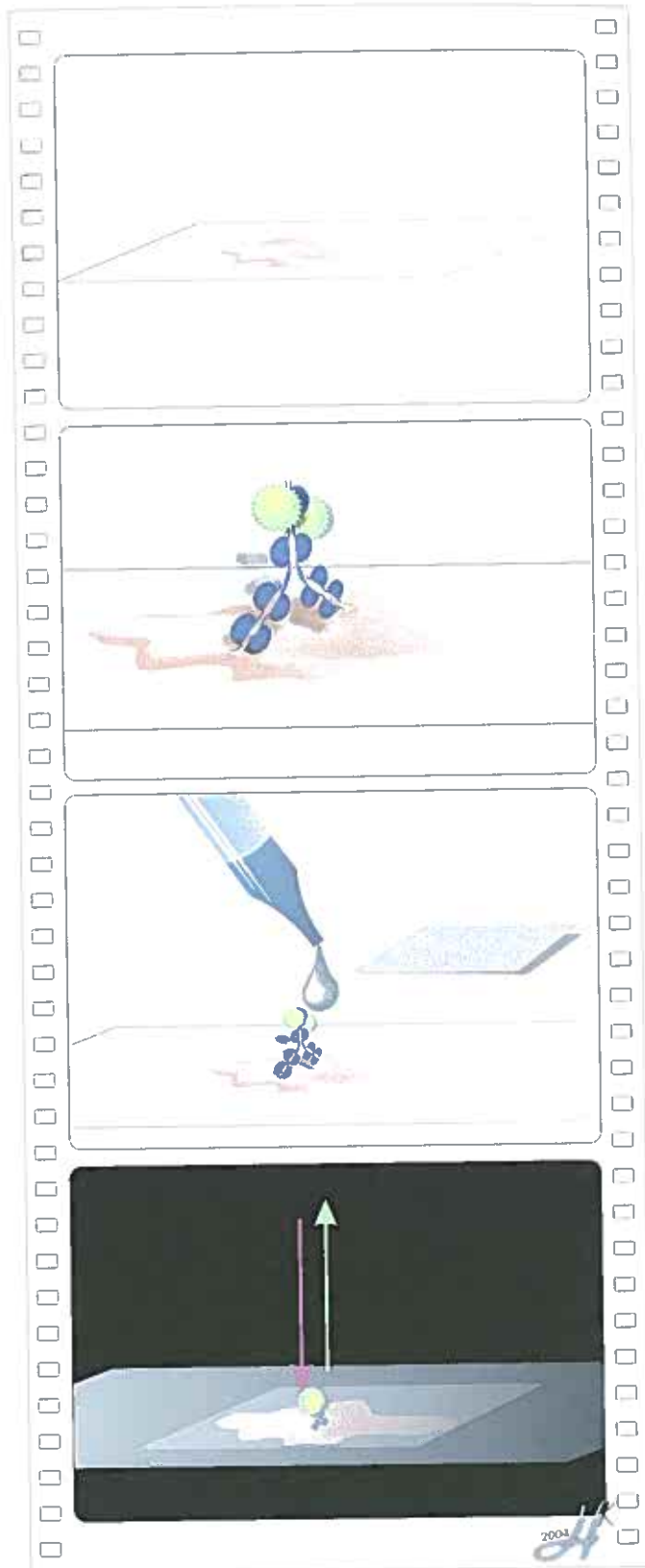
10. OBRAZOVÁ PŘÍLOHA

Obrázek 1 – Vývojový cyklus chlamydií.



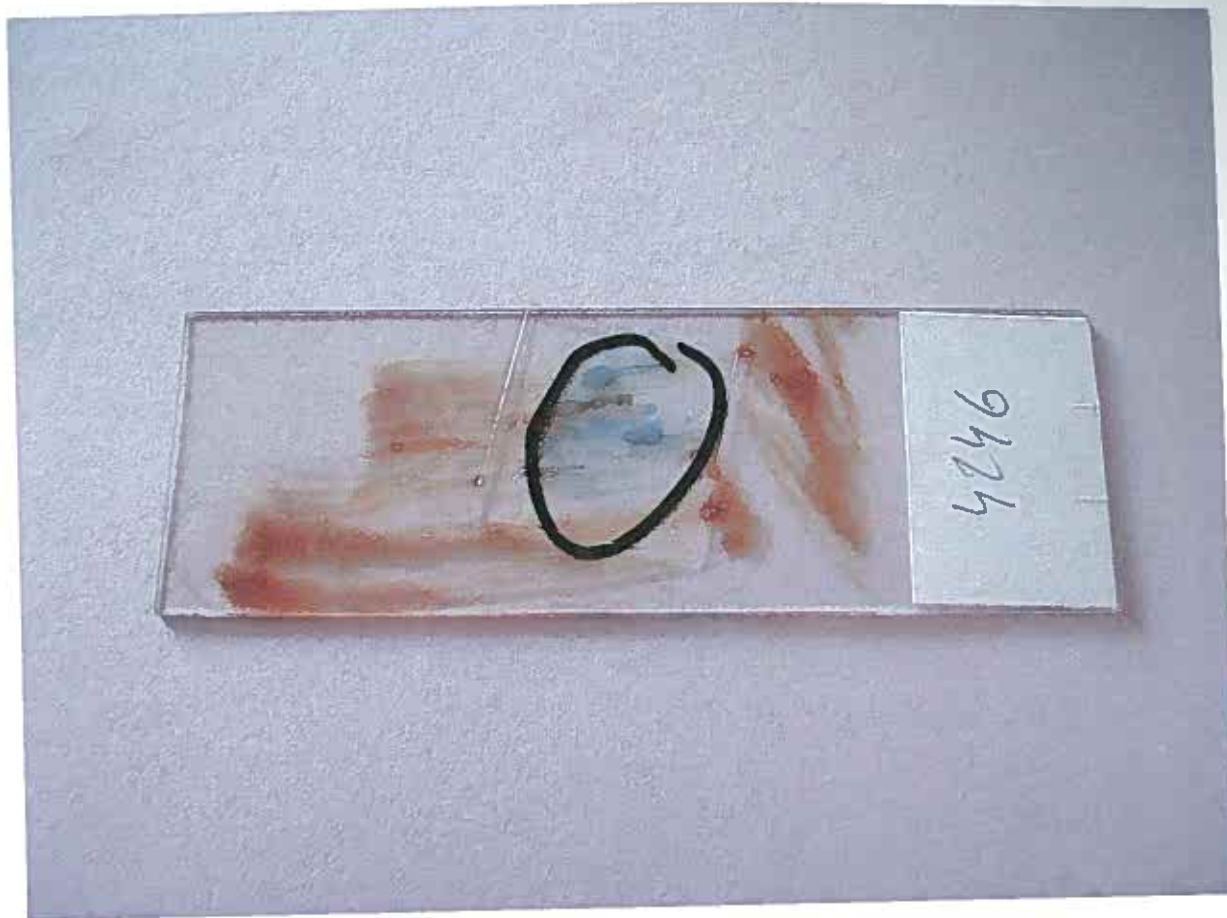
(Schéma Hana Kotlandová, ÚKIA FN a LFUK Hradec Králové)

Obrázek 2 – Princip detekce antigenu pomocí přímé imunofluorescence.



(Schéma Hana Kotlandová, ÚKIA FN a LFUK Hradec Králové)

Obrázek 3 – Preparát k odečtu; akutní zánět pochvy.



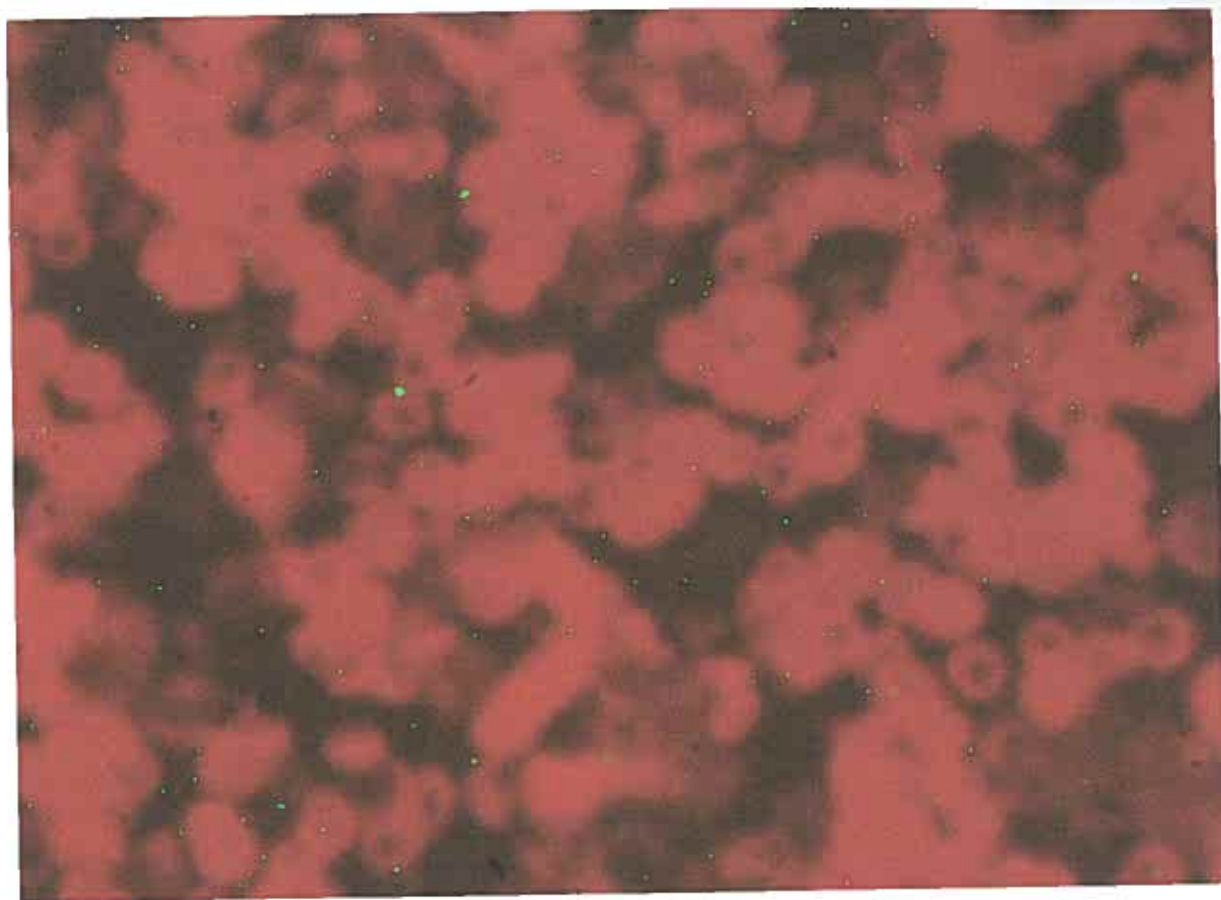
(Foto MUDr. Miroslav Förstl, ÚKM FN a LFUK Hradec Králové)

Obrázek 4 – Imunofluorescenční snímek, negativní nález z vagíny; zachyceny pouze epitelie a buněčné elementy



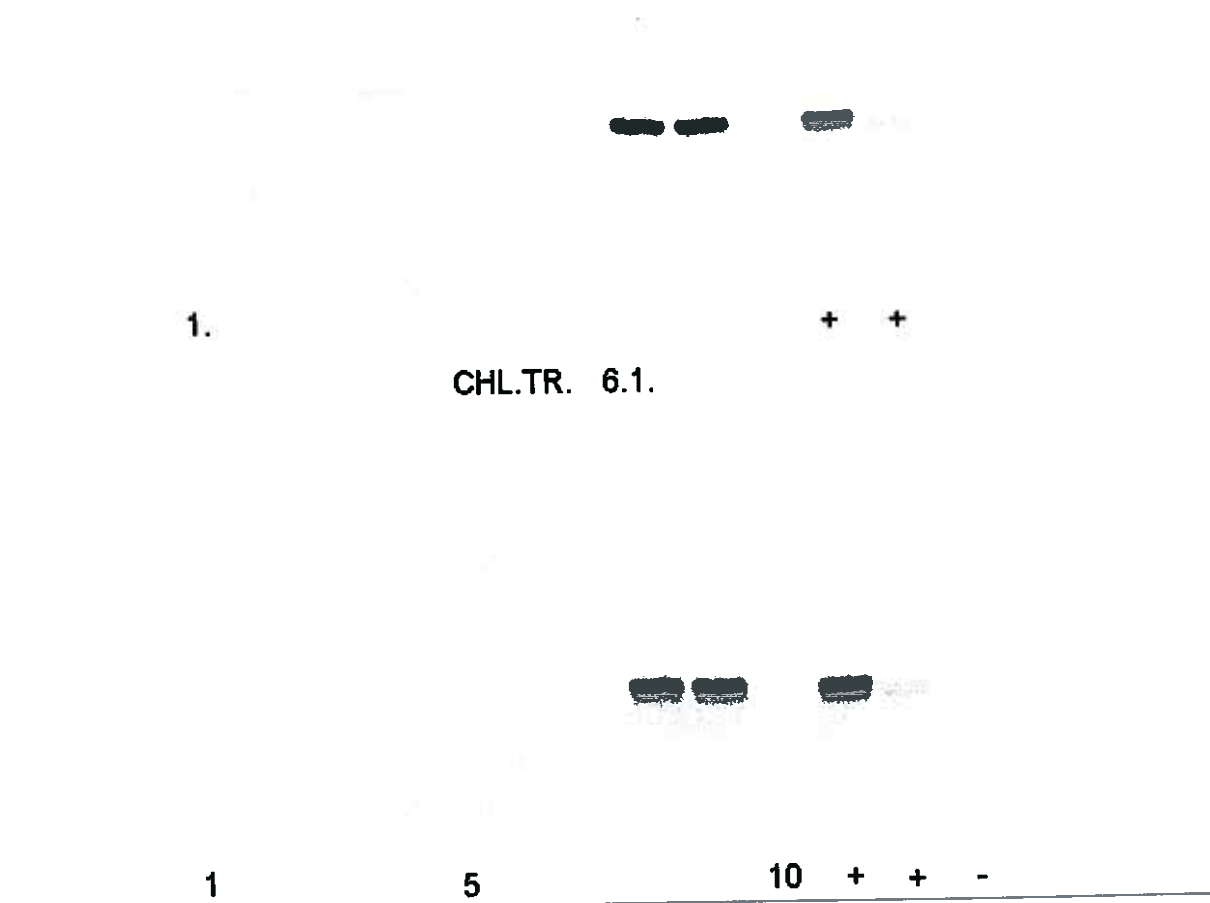
(Foto RNDr. Ctirad Andrýs, Ph.D., ÚKIA FN a LFUK Hradec Králové)

Obrázek 5 – Imunofluorescenční snímek, *Chl. trachomatis* masivně pozitivní výtěr ženské uretry (svítící body).



(Foto MUDr. Miroslav Förstl, ÚKM FN a LFUK Hradec Králové)

Obrázek 6 – PCR, výsledek detekce.



(Foto Mgr. Radka Bolehovská, Ph.D., ÚKBD FN a LFUK Hradec Králové)