

Orvostudományi Egyetem, Budapest

Urológiai Klinika¹

(igazgató: Romics Imre dr.)

Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Egyetem, Szeged

Központi Klinikai Mikrobiológiai Laboratórium²

(laboratóriumvezető: Nagy Erzsébet dr.)

Johan Béla Epidemiológiai Központ,

Bakteriológiai Osztály³

(osztályvezető: Czírók Éva dr.)

Semmelweis Orvostudományi Egyetem, Budapest

I. Sz. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika⁴

(igazgató: Papp Zoltán dr.)

Chlamydia trachomatis kimutatása ejakulátumból

Összehasonlító vizsgálatok PCR, LCR, amplifikált Gen Probe,
IF és ELISA módszerrel

Corradi Gyula dr.¹, Deák Judit dr.², Budai Irén dr.³, Nagy Bálint dr.⁴

ÖSSZEFOGLALÁS: A tanulmány célja, hogy a legújabb molekuláris biológiai módszerek felhasználásával újra értékeljük az ejakulátum *Chlamydia trachomatis* vizsgálatának lehetőségeit. A szerzők a *Chlamydia trachomatis* hétféle módszerrel [ELISA (két módszer), IF, PCR (két módszer), LCR és TMA] szimultán próbálták kimutatni ötven férfi ondójából. A férfiak meddő házasságuk miatt keresték fel a SOTE Urológiai Klinika Andrológiai Ambulanciáját, de genitális infekciók tekintetében tünetmentesek voltak. *Chlamydia trachomatis* három (6,0%) esetben került kimutatásra molekuláris biológiai módszerekkel. Az immunofluoreszcens módszer nem volt eléggé specifikus, az egyik ELISA módszer egy esetben pozitív, egy esetben határértéket mutatott, a másik ELISA módszer minden esetben negatív eredményt adott. Minden módszerrel ugyanazon betegek bizonyultak pozitívnak. A pozitív esetek incidenciája megegyezik a nemzetközi adatokkal. A szerzők az általuk kifejlesztett mintavételi eljárás bevezetését fontosnak tartják, ennek lényege az, hogy minimálisra csökkenti az ejakulátumban lévő baktericid, antigén lizáló hatásokat. Vizsgálóeljárásként a molekuláris biológiai módszerek valamelyikének alkalmazását javasolják.

COMPARISON OF METHODS (PCR, LCR, AMPLIFIED GENE PROBE, IF AND ELISA) IN THE DETECTION OF CHLAMYDIA TRACHOMATIS IN SEMEN

SUMMARY: The aim of the study to evaluate the new methods for the detection of *Chlamydia trachomatis* in semen. *Chlamydia trachomatis* was examined in 50 patients with 7 different methods simultaneously [ELISA (2 methods), IF, PCR (2 methods), LCR and TMA]. The patients otherwise asymptomatic for genital infection presented with infertility. *Chlamydia trachomatis* was detected in 3 cases (6 %). The immunofluorescent method was not enough specific, one of the ELISA methods showed negative results in all cases. Incidence of positive cases correlated with the literature data. The authors emphasize their own method for taking the sample to minimize the bactericid effects in the semen. They recommend any molecular biological method for the detection of *Chlamydia trachomatis*.

KEY WORDS: *Chlamydia trachomatis*, diagnosis, infertility

A Chlamydia infekciók jelentősége a meddőségben közismert (2).

Kevésbé ismert a gamétákra gyakorolt közvetett és közvetlen negatív hatás. A Chlamydia fertőzés következtében megváltozik az ejakulátum összetétele (pl. alacsony fruktózsztint, gamma-GT-szint, citromsavszint stb.) (27). A gyulladások következtében a különféle cytotoxikus anyagok is megjelennek, pl. szabadgyökök. Hasonló hatásúak a felszabaduló monokinek, limfokinek. Újabban elektronmikroszkópos felvételekkel is igazolták, hogy a *Chlamydia trachomatis* (*C. trachomatis*) megtapadhat a spermiumok felszínén, a felszíni membránt destruálhatja és bekerülhet az intracelluláris térbe (15). A fertőzött spermiumok a petesejtbe is behatolhatnak. Az elmondottakból érthető, hogy több okból is fontos az ejakulátum *C. trachomatis* fertőzöttségének kimutatása, mely technikailag nehéz, a mai napig sem teljesen megoldott feladat. Szövettenyésztésben az ejakulátum különböző komponensei károsítják az alkalmazott szövetkultúrát (14). Luminometriás méréseknél (DNS hibridizáció) az ondó aktivitása zavarja a mérést (6). Az ELISA módszer szenzitivitása nem elegendő ahhoz, hogy a rendkívül kis mennyiségben jelenlévő *C. trachomatis* antigént kimutassa (19, 20). Ezek a technikai okok magyarázzák, hogy kevés az ondó *C. trachomatis* fertőzöttségére vonatkozó irodalmi adat. Az ilyen irányú első hazai vizsgálatok eredményét 1989-ben publikáltuk (4, 17). Szövettenyésztési próbálkozásainkat a későbbiekben az immunfluoreszcens (IF), enzim immun assay (ELISA), majd DNS hibridizációs vizsgálatok követték (5, 6, 7, 8). Jelen munkánk célja, hogy e kérdéskör hazai szakértőinek együttműködésével a legújabb molekuláris biológiai módszerek felhasználásával újraértékeljük az ejakulátum *C. trachomatis* vizsgálatának lehetőségeit.

Betegek és vizsgálati módszerek

Ötven férfit vizsgáltunk, akik meddő házasság miatt jelentkeztek andrológiai vizsgálatra. Átlagos életkoruk 28,4 év (21–43 között) volt, meddő házasságuk legalább egy éve fennállott. Aktív gyulladásra utaló urogenitális panaszuk vagy tünetük nem volt. Az andrológiai vizsgálatokat a WHO előírásai szerint végeztük (27). Az alapvizsgálatok után szimultán vizsgálatokat végeztünk *C. trachomatis* kimutatására három laboratóriumban. Az ejakulátumot a betegek minimum két-, maximum négy-napos szexuális abstinencia után steril műanyag csövekbe ürítették, önkielégítés során. A vizsgálatához szükséges előkészületeket (carentiás idő, kézmosás, a genitálék alapos lemosása, az ondóürítés módja, valamint hogy a glansról lecsöppenő utolsó ondócspepp nem gyűjtendő a csőbe) anyaggyűjtési útmutató kézbe adásával standardizáltuk. A vizsgálati anyagot a páciensek egy órán belül a laboratóriumba szállították, a beérkező anyagot steril pipettával négy részre osztottuk, -20°C -ra fagyasztottuk, majd hűtőtáskákban a mikrobiológiai laboratóriumokba szállítottuk, ahol -70°C -on tárolták. A Johan Béla Epidemiológiai Központ Országos Bakteriológiai Osztályán az IF és ELISA (kétféle) vizsgálatokat, a Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Egyetem Központi Klinikai Mikrobiológiai Laboratórium a ligáz láncreakciós eljárást (LCR) és amplifikált nukleinsav hibridizációs módszert, a Semmelweis Orvostudományi Egyetem I. Sz. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika Molekuláris Diagnosztikai Laboratóriumában a polimeráz láncreakciós (PCR) tesztet végezték el. Az elvégzett hétféle vizsgálat kereskedelmi paraméterei a következők.

1. Amplicor *Chlamydia trachomatis* PCR Detection Kit, Roche Diagnostics System

2. *Chlamydia trachomatis* specifikus PCR, primer pár (INT, Corallsville, IA, USA) (1)

3. Transcription Mediated Amplification (TMA) Amplified Gene Probe 2

4. LCR *Chlamydia trachomatis* test, ABBOTT Laboratories

5. SYVA MikroTrac *Chlamydia trachomatis* direkt Specimen IF test, SYVA-Behring Diagnostics Inc.

6. DAKO IDEA *Chlamydia* EIA test, DAKO A/S

7. Sanofi Diagnostics Pasteur, *Chlamydia* Microplate ELISA

A fenti módszerekhez szükséges vegyszerek, kitek a kereskedelemben kaphatóak. Az ondómintákat-felolvasztás után a gyártók által rendszeresített feltáró oldatot tartalmazó transzport csövekbe helyeztük, az egyes gyártók által mellékelt mintavevő pálcákkal. A mintavevő pálcával felkevertük az ejakulátumot, majd a pálcát vattás végét a mintát tartalmazó cső belső falához érintettük, oly módon, hogy a vattapálcán főlegesen lecsöppenő ondó ne maradjon. Ezt követően a gyártók által megadott változó ideig és hőfokon tároltuk a mintákat, majd a vizsgálatokat az előírások szerint elvégeztük.

Eredmények

A hagyományos andrológiai vizsgálat eredménye a következő volt:

spermiumszám (millió/ml) $x \pm SD = 12,45 \pm 8,84$

motilitás (%) $x \pm SD = 58,0 \pm 25,2$

intenzív motilitás (%) $x \pm SD = 25,1 \pm 0,07$

normális morfológia (%) $x \pm SD = 33,1 \pm 15,9$

here volumen (ml, mindkét here) $x \pm SD (28,18 \pm 8,21$

A megvizsgált ötven minta közül egy esetben az LCR teszt nem adott értékelhető információt. Három ejakulátum bizonyult *C. trachomatis* pozitívnak, mind a négy molekuláris diagnosztikai módszerrel ugyanaz a három. A pozitív esetek közül kettő a normozoospermiás, egy az oligozoospermiás férfiak közül került ki. Az alkalmazott két ELISA technika közül az egyikben egy ejakulátum bizonyult biztosan pozitívnak, egy másik ejakulátum a pozitívitás határértéket adta. A másik ELISA technikával végzett vizsgálatok során pedig mind az ötven megvizsgált ejakulátum negatívnak bizonyult. Az IF technikával végzett vizsgálatok során a pozitív és negatív esetek biztonságosan nem voltak elkülöníthetők. Két esetben bizonyosnak véltük fluoreszkáló festékkel jelölt antigének jelenlétét, további nyolc-tíz esetben azonban nem tudtuk elkülöníteni a releváns fénylő részecskéket a kenetben látható nagymennyiségű fluoreszkáló egyéb részecskéktől. Így, ismételten vizsgálva a biztosan pozitívnak vélt két esetet, ezeket illetően is kétségeink merültek fel a biztos pozitívítást illetően.

Megbeszélés

A *C. trachomatis* ejakulátumban való jelenlétéről kevés irodalmi adat áll rendelkezésre. Egyes szerzők 1,6–10%-os előfordulási gyakoriságról számolnak be (11, 12, 13, 16, 22, 24, 25). Magasabb előfordulási gyakoriságra utalnak az ondóból kimutatott IgA, IgG típusú *Chlamydia*-ellenanyagok, melyek 10-25%-os incidenciát mutatnak (16, 25, 26). Különböző módszerekkel végzett saját vizsgálataink során 6,0-13,3% közötti gyakoriságot találtunk (4, 5, 6, 7, 17). A *C. trachomatis* fertőzöttség aránya – első megfigyeléseink óta (1989) – folyamatosan csökken. Az 1996-97-es év során az ELISA technikákkal mért pozitív esetek aránya 1-2%-ra csökkent (eddig nem publikált adatok). Hasonló tendencia figyelhető meg a húgycső, az endocervix minták fertőzöttségének vonatkozásában (3, 9, 10, 21). Az incidencia csökkenését a prevenció, a diagnosztika és a gyógyítás feltételeinek javulásával magyarázhatjuk.

Az ondó vizsgálatára használt különféle vizsgálóeljárásokat a következőképpen értékeljük.

A szövettenyésztés a bevezetőben felsorolt különböző technológiai nehézségek miatt nem vált be (14). Az IF módszer nem bizonyult szelektívnek. A nyolcvanas évek végén és a kilencvenes évek elején, a különböző ELISA technikák látszólag megoldották a kérdést, viszonylag sok volt a pozitív vizsgálati eredmény (magasabb volt a fertőzöttség aránya?) Sajnos standardként használható módszer nem állt rendelkezésre. Schachter 1997-ben elhangzott értékelése szerint, az ELISA technikák szenzitivitása és specificitása átlagosan 70–75%-ra tehető (19).

A diagnosztika javulását vártuk a molekuláris diagnosztikai módszerek bevezetésétől. 1995-ben Amplicor PCR kittel 6,3%-os ondófertőzöttséget észleltünk, a DNS hibridizációs módszerrel technikai nehézségeink voltak (6). Ilyen előzmények után határoztuk el, hogy a jelenleg elérhető legérzékenyebb molekuláris biológiai eljárásokat szimultán teszteljük, a régi egyéb eljárásokkal együtt. Jelenleg a *C. trachomatis* incidenciája 6,0 %-os volt, mind a négy molekuláris biológiai eljárással (gazdasági okok miatt nem volt lehetőségünk több százas szériákban szimultán vizsgálatokat végezni).

A 6%-os incidencia megfelel a jelenlegi átlagos európai fertőzöttség mértékének (10, 24). Az ejakulátum fertőzöttségére vonatkozó adatok között 1-2%-os értékek is szerepelnek. Weidner és mtsai 131 betege közül 26 (19,9%) ejakulátuma tartalmazott IgA típusú genus specifikus *Chlamydia*-ellenanyagot. Közülük két beteg ejakulátuma mutatott pozitív reakciót *Chlamydia* PCR-rel (24). Az ellenanyag-vizsgálatok tükrében kevésnek tűnik a pozitív PCR-próbák aránya. Feltételezzük, hogy az alacsony incidencia kialakulásában az ondó baktericid, antigén lizáló képességének is szerepe lehet. E hatás csökkentésére 1995 óta alkalmazzuk mintavevő eljárásunkat, melynek lényege, hogy a vizsgálatra kerülő *Chlamydia* antigéneket a lehető legrövidebb ideig tesszük ki a nagy mennyiségű ondó károsító hatásának. További előnye ennek a mintavételi eljárásnak, hogy a vatta által felszívott vizsgálati anyag mennyisége közel azonos, továbbá, hogy a mintavételi eljárás nagymértékben hasonlít a húgycső, vagy a cervikális minták vételéhez. Alternatív mintavételi eljárás végezhető mélyhűtés segítségével, ilyenkor a friss mintát azonnal lefagyasztjuk, és -70°C -on tároljuk. Felolvasztás után azonnal bemérjük az ejakulátumot a feltárási oldatba, így a természetes hőmérsékletű ondó baktericid hatását szintén a minimálisra csökkentjük.

A különféle nukleinsav-próbák teljesítőképességét összehasonlítva nem találtunk különbséget. Nagyobb szériában végzett külföldi vizsgálatok azt mutatják, hogy ezen technikák szenzitivitásában és specificitásában nincs érdemi különbség (18). Az Amplicor Roche, az ABBOTT LCx Chlamydia és a TMA Gene Probe előnyét abban látjuk, hogy ezek a kitek minden szükséges eszközzel ellátottak. A kereskedelemben kapható primerek felhasználásával végzett PCR (2. módszer) a legolcsóbb, de ez kívánja meg a legprofesszionálisabb személyzetet és felszerelést.

Összegezve az ejakulátum direkt *C. trachomatis* kimutatásában szerzett tapasztalatainkat, csak molekuláris biológiai módszer használatát mérlegelhetjük. Hazai viszonylatban néhány centrum üzemeltetését tartanánk célszerűnek. Kiegészítő módszerként az ondóminták szerológiai előszűrése megfontolandó, ugyanis *C. trachomatis* IgA-, IgG-antitestek jelenléte előszűrést jelenthetne. Ilyen irányú tapasztalatok már rendelkezésre állnak külföldön és saját ilyen irányú vizsgálataink is folyamatban vannak.

Egyéb vizsgálati módok, mint pl. vizeletszűrés és húgycső-diagnosztika, nem helyettesíti az ejakulátum vizsgálatát. Korábbi munkáinkban *in situ* DNS hibridizációs szövettani vizsgálattal igazoltuk, hogy a *C. trachomatis* antigén közvetlenül a prosztatából is bekerülhet az ejakulátumba, nemcsak húgycső-kontamináció révén (7, 8).

Az USA-ban végzett költséganalízisek igazolták, hogy az asymptotikus Chlamydia-hordozók által okozott egészségkárosodás és a gyógyítás költsége lényegesen nagyobb, mint a szűrés és a megelőzés együttes költsége (2). Ejakulátumvizsgálat hiányában folyamatos és jelentős kár éri az egészségügyet.

Köszönetnyilvánítás: Ezúton köszönjük az ABBOTT Diagnostics, Budapest; La Roche Hungaria Kft. a Behring + Syva Diagnostika és a Diagnosztikum Kft.-nek, hogy a kitéket rendelkezésünkre bocsátotta.

Irodalom

1. Brule van den C. J. A. et al.: Detection of *Chlamydia trachomatis* in semen of artificial insemination donors by the polymerase chain reaction. *Fertil Steril* 1993; 59: 1098–1104.
2. CDC Morbidity and Mortality Weekly Report, Recommendations for the Prevention and Management of *Chlamydia trachomatis* Infections. 1993: Department of Health and Human Services, CDC, Atlanta, Georgia
3. Chiarini, F. et al.: *Chlamydia trachomatis* genitourinary infections: Laboratory diagnosis and therapeutic aspects. Evaluation of in vitro and in vivo effectiveness of Azithromycin. *J. Chemother.* 1994; 6: 238–242.
4. Corradi Gy., Nagy B., Vajda Z.: Aszimptotikus chlamydiás az andrológiai gyakorlatban. *Urol. Nephrol. Szle.* 1989; 16: 31–32.
5. Corradi Gy., Molnár Gy., Bognár Cs.: Genitalis Chlamydia-fertőzés andrológiai betegekben. Vizsgálatok direkt antigén kimutatással és szerológiai módszerrel. *Orv. Hetil.* 1993; 134: 129–132.
6. Corradi Gy. et al.: Is seminal fluid a suitable specimen for detecting chlamydial infection in men? *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 1995; 42: 389–394.
7. Corradi Gy. et al.: A *Chlamydia trachomatis* kimutatása prosztatában. *Magy. Urol.* 1995; 1: 37–42.
8. Corradi Gy. et al.: Detection of *Chlamydia trachomatis* in the prostate by in situ hybridization and by transmission electron microscopy. *Int. J. Androl.* 1996; 19: 109–122.
9. Deák J., Nedelkovics Zs., Földes J.: Összehasonlító vizsgálatok a *Chlamydia trachomatis* fertőzések diagnosztikájában. *Orv. Hetil.* 1994; 135: 465–468.

10. Deák J. et al.: Epidemiology of genital chlamydia infections in Hungary. In: Proceedings Third Meeting of the European Society for Chlamydia Research, Editor A. Stary. Vienna, Austria 1997: 393–393.
11. Dieterle, S. et al.: Chlamydial immunoglobulin IgG and IgA antibodies in serum and semen are not associated with the presence of *Chlamydia trachomatis* DNA or rRNA in semen from male partners of infertile couples. Hum. Reprod. 1995; 10: 315–319.
12. Eggert-Kruse, W. et al.: Chlamydial serology in 1303 asymptomatic subfertile couples. Hum. Reprod. 1997; 12: 1464–1475.
13. Kjaergard, N. et al.: Microbiology of semen specimens from male attending a fertility clinic. APMIS 1997; 105: 566–570.
14. Mardh, P. A., Taylor-Robinson, D.: Chlamydial infections. Kiadó: Montedison Group, Farmitalia Carlo Erba AB, 1984: 12.
15. Mavrov, G., Bondarenko, G.: Ultrastructure of spermatozoa and desquamated epithelial cells in the ejaculates of patients with *Chlamydia trachomatis* genital infection. In: Proceedings Third Meeting of the European Society for Chlamydia Research, Editor A. Stary. Vienna, Austria 1997: 163.
16. Munoz, M. G., Jeramias, J., Witkin, S. S.: The 60 kDa heat shock protein in human semen: relationship with antibodies to spermatozoa and *Chlamydia trachomatis*. Hum. Reprod. 1996; 11: 2600–2603.
17. Nagy B. et al.: The occurrence of *Chlamydia trachomatis* in the semen of men participating in an IVF programme. Hum. Reprod. 1989; 4: 54–56.
18. Pasternack, R. et al.: Comparison of Roche Amplicor PCR, Roche Cobas Amplicor PCR and Abbott LCx chlamydia in the detection of genital *Chlamydia trachomatis* infections in women with urine specimens. In: Proceedings Third Meeting of the European Society for Chlamydia Research, Editor A. Stary. Vienna, Austria 1997: 285.
19. Schachter, J.: Evolution of diagnostic tests for *Chlamydia trachomatis* infections. In: Proceedings Third Meeting of the European Society for Chlamydia Research, Editor A. Stary. Vienna, Austria 1997: 243–246.
20. Taylor-Robinson, D.: The value of non-culture techniques for diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections: making the best of a bad job. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 1992; 11: 499–503.
21. Török L. et al.: A *Chlamydia trachomatis* szerepe az urogenitális rendszer megbetegedéseiben. Orv. Hetil., 1991; 132: 953–1008.
22. Yoshida, K., Kobayashi, N., Negishi, T.: *Chlamydia trachomatis* infection in the semen of asymptomatic infertile men: Detection of the antigen by in situ hybridization. Urol. Int. 1994; 53: 217–221.
23. Wolff, H. et al.: *Chlamydia trachomatis* induces an inflammatory response in the male genital tract and is associated with altered semen quality. Fertil. Steril. 1991; 55: 1017–1019.
24. Wiedner, W. et al.: Chlamydial antibodies in semen: search for silent chlamydial infections in asymptomatic andrological patients. Infection 1996; 24: 309–313.
25. Weidner, W. M. W.: Diagnostic workup and therapeutical management of the prostatitis syndrome. Eur. Urol. Today 1997; 7: 4–5.
26. Witkin, S.S., Klugman, L., Bongiovanni, A. M.: Relationship between an asymptomatic male genital tract exposure to *Chlamydia trachomatis* and an autoimmune response. Hum. Reprod. 1995; 10: 2952–2955.
27. WHO Laboratory Manual for the examination of human semen and cervical mucus interaction. Cambridge University Press, 1992