Epidemiologie 4-07 25.10.2007 8:38 Str. 166
proLékaře.cz | 29.11.2026

Epidemiol. Mikrobiol. Imunol. 56, 2007, č. 4, s. 166–173

Současný průkaz DNA *Chlamydia pneumoniae* a *Chlamydia trachomatis* pomocí real-time PCR

Roubalová K.

NRL pro chlamydie, Centrum epidemiologie a mikrobiologie, Státní zdravotní ústav, Praha

Souhrn

Cíl práce: Navržení a validace real-time PCR, vhodné pro kvantitativní průkaz *C. pneumoniae* a *C. trachomatis* v klinických vzorcích.
Materiál a metody: Jako cílový úsek pro amplifikaci byla zvolena část genu pro 16S RNA. Pomocí klonování produktu reakce v bakteriálním plazmidu byl připraven rekombinantní kalibrátor a kombinovaný interní standard, který lze použít ve třech různých PCR. Pro validaci byly použity archivované izoláty DNA z různých klinických vzorků, izoláty DNA z dalších infekčních agens a kontrolní vzorky pro detekci DNA CT (QCMD) a CPN (Instand).
Výsledky: Byla ověřena specificita a reprodukovatelnost reakce. Analytická citlivost byla stanovena na 5–10 kopií bakteriálního genomu/reakci. 105 izolátů DNA z různých typů klinických vzorků (výtěry, moče, periferní krev, BAL) bylo vyšetřeno pomocí real-time PCR a konvenční PCR. Vzorky, které poskytly nesouhlasný výsledek, byly charakterizovány pomocí třetího nezávislého amplifikačního testu. Citlivost a specificita real-time PCR byla 89 % a 100 %. Metoda je vhodná pro screening i diagnostiku chlamydií.

Klíčová slova: *Chlamydia pneumoniae* – *Chlamydia trachomatis* – diagnostika – real-time PCR.

Summary

Roubalová K.: Simultaneous Detection of *Chlamydia pneumoniae* and *Chlamydia trachomatis* DNA by Real-time PCR

Study objective: Design and validation of a real-time PCR assay for quantitative detection of *C. pneumoniae* and *C. trachomatis* in clinical specimens.
Material and Methods: A part of the 16S RNA gene was selected as the target sequence for amplification. The reaction product was cloned in the bacterial plasmid and a recombinant calibrator and a combined internal standard were prepared, usable in three different PCR assays. Archived DNA isolates from various clinical specimens, DNA isolates from other infectious agents and control samples for DNA detection, CT (QCMD) and CPN (Instand), were used for validation.
Results: Reaction specificity and reproducibility were tested. The analytical sensitivity was set to 5–10 copies of the bacterial genome/reaction. As many as 105 DNA isolates from various types of clinical specimens (swabs, urine, peripheral blood and BAL fluid) were tested by real-time PCR and conventional PCR assays. The specimens that had not yielded concordant results were characterized by a third independent amplification test. The sensitivity and specificity of real-time PCR were 89 % and 100 %, respectively. The assay is suitable for both screening and diagnosis of *Chlamydia*.

Key words: *Chlamydia pneumoniae* – *Chlamydia trachomatis* – diagnosis – real-time PCR.

Čeleď Chlamydiaceae je tvořena skupinou gram-negativních bakterií, do níž patří kromě řady zvířecích species 3 významné lidské patogeny: *Chlamydia trachomatis, Chlamydia* (podle nové nomenklatury *Chlamydophyla) pneumonie* a *Chlamydia (Chlamydophyla) psittaci*. První dvě bakterie jsou vázány pouze na lidského hostitele, kdežto *Chlamydia psittaci* je ptačí druh, u nějž je možný mezidruhový přenos na člověka. Chlamydie se chovají jako obligátní intracelulární paraziti. Jejich charakteristickým znakem je dvoufázový životní cyklus, v němž se střídají metabolicky neaktivní infekční stadia – elementární tělíska (EB) s neinfekčními intracelulárními formami, schopnými replikace – retikulárními tělísky (RB).

Ta mohou perzistovat v infikovaných buňkách v klidové formě dlouhou dobu, chráněna před

proLékaře.cz | 29.11.2026

účinkem imunitních mechanismů hostitele, nebo antibiotik. Zmíněné vlastnosti chlamydií ovlivňují patogenezi infekce: asymptomatický průběh akutní infekce, dlouhodobou perzistenci v hostitelském organismu a tendenci ke chronicitě. Infekce chlamydiemi vyvolává specifickou imunitní odpověď, která však není trvalého charakteru a umožňuje reinfekce (přehled – viz 21,26). *Chlamydia trachomatis* (CT) je nejčastěji se vyskytujícím sexuálně přenosným bakteriálním infekčním agens. Je původcem infekcí urogenitálního traktu u žen i mužů a očních zánětů u dětí i dospělých [20]. Perinatální přenos infekce u těhotných žen může způsobit těžké konjunktivitidy, či pneumonie u novorozenců [8]. *Chlamydia pneumoniae* (CPN) patří mezi ubikvitně rozšířené respirační patogeny. Vyvolává onemocnění horních, či dolních cest dýchacích, sinusitis, otitis média nebo konjunktivitis [15] a je původcem 10–15 % komunitně získaných pneumonií [19]. Pro možnost perzistence a chronické infekce je CPN vztahována k různým chronickým zánětlivým onemocněním, např. k ateroskleróze [10], chronické obstrukční chorobě plic, bronchiálnímu astmatu [14, 23], nebo roztroušené skleróze [28].

Pro laboratorní diagnostiku chlamydiových infekcí jsou využívány sérologické testy (průkaz rodově- a typově-specifických protilátek metodami ELISA, či nepřímým mikroimunofluorescenčním testem (MIF, přehled viz 31) a metody přímého průkazu bakterií. Mezi ně patří kultivace CT na buněčných kulturách [1], průkaz specifických antigenů ve výtěrech nebo biopsiích pomocí imunohistochemického barvení, či ELISA [25] a průkaz bakteriální DNA hybridizačními, či amplifikačními metodami [1, 3, 5, 9, 25].

Amplifikační metody průkazu bakterální DNA jsou v současné době preferovány pro svou vysokou citlivost i specificitu. Nejvíce je rozšířena polymerázová řetězová reakce (PCR). Byla popsána řada variant PCR, využívajících k průkazu amplifikaci různých úseků bakteriálního genomu, nejčastěji specifických úseků genů pro hlavní vnější membránový protein (MOMP) nebo 16S RNA [4, 22, 27, 29], u CT i kryptického plazmidu [2, 17, 18]. V posledních letech nachází v diagnostice infekčních agens stále širší uplatnění PCR v reálném čase (real-time PCR, 16). Tato metoda je založena na kombinaci amplifikace vybraného úseku bakteriálního genomu a hybridizace vzniklých produktů (amplikonů) se specificky značenou sondou, která umožňuje kvantitativní chemiluminiscenční detekci amplikonů již v průběhu reakce. Výhodou této metody je možnost kvantifikace hledaného mikroba v klinickém vzorku, vysoká přesnost a reprodukovatelnost a v porovnání s klasickou PCR (kde se produkty reakce prokazují pomocí elektroforézy) podstatně nižší časová náročnost.

Cílem práce bylo vyvinout metodu real-time PCR pro průkaz DNA CT a CPN, charakterizovat její citlivost, specificitu a reprodukovatelnost a ověřit její diagnostickou účinnost na souboru vzorků od pacientů s různými projevy chlamydiové infekce.

Materiál a metody

Pacienti a vzorky

Pro ověřování citlivosti a diagnostické účinnosti metody byly použity: 1) vzorky pro externí kontrolu kvality metod průkazu DNA CT (QCMD 2005,2006) a CPN (Instand 2006); 2) izoláty DNA z periferní krve pacientů s ischemickou chorobou srdeční (infarkty myokardu, nestabilní angina pectoris); 3) izoláty DNA z periferní krve pacientů s diabetes mellitus II. typu; 4) izoláty DNA z bronchoalveolárních laváží (BAL) od imunodeficientních pacientů s akutní respirační tísní (dospělých příjemců allogenních transplantátů kostní dřeně, příjemců orgánových transplantátů, onkologických pacientů po chemoterapii); 5) vzorky moče od pacientů s urogenitálními infekcemi a 6) izoláty DNA, získané z výtěrů ze spojivkového vaku pacientů s konjunktivitidami. Jednalo se o zbytky anonymizovaných vzorků po rutinních diagnostických vyšetřeních, nebo o vzorky odebírané pro epidemiologické účely s informovaným souhlasem pacienta.

Izoláty DNA, dlohodobě skladované při -70°C, byly před použitím rozmraženy, zahřáty 5 min. na 95°C a krátce zcentrifugovány. V průběhu vyšetřování byly skladovány při -20°C. Vzorky močí byly buď čerstvé, nebo dlouhodobě skladované při -20°C.

Použité bakteriální a virové kmeny:

Laboratorní kmen *C. pneumoniae* 1360 byl získán od firmy Vircell (Granada, Španělsko). Laboratorní kmen *C.pneumoniae* W 6805 byl získán od prof. J.Schachtera (NIH, Seattle, USA). Pro testování specificity reakce byly použity následující bakteriální a virové kmeny: *C. psittaci* (Laboratoře Colindale, Londýn, Velká Británie) *Haemophilus influenzae, Neisseria gonorrhoeae, Streptococcus pneumoniae, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, E. coli,* (všechny poskytnuty Dr Urbáškovou z kmenové banky SZÚ, Praha), izolát DNA z *Neisseria menigitidis* (poskytnuta Dr Kalmusovou, SZÚ,) lidský cytomegalovirus (laboratorní kmen AD169), EB virus (latentně infikovaná buněčná lymfoblastoidní linie Raji), virus herpes simplex typu 1 (kmen Kadlečková) a typu 2 (kmen 610) a lidský herpesvirus 6 (kmen U1002, všechny virové kmeny pocházely z NRL pro herpetické viry, SZÚ). Pozitivní kontrola z *C. trachomatis* byla získána z pozitivních kontrolních vzorků (QCMD 2005,2006). DNA *Mycoplasma pneumoniae* byla získána z pozitivního výtěru z krku od pacienta s mykoplazmovou pneumonií.

Zpracování vzorků a izolace DNA.

DNA byla izolována pomocí kitu QuiAmp Blood Mini Kit, Quiagen (Anglie).Vzorky periferní krve byly odebírány do jednorázových odběrových zkumavek s EDTA a zpracovány do 24 hod: krev byla promíchána, sedimentována 1 hod při 37°C a buffy coat odebrán do čisté zkumavky. DNA byla izolována ze 200 μl buffy coatu a extrahována do 100 μl elučního pufru (AE, Quiagen). Výtěry z urethry, endocervixu, spojivek, či z krku byly prováděny dacronovým tamponem a transportovány v 0,5 ml transportního média pro chlamydie (Roche)

proLékaře.cz | 29.11.2026

Tab. 1. Sekvence použitých primerů a sond, amplifikační podmínky reakcí

Table 1. Sequences of the used primers and probes, reaction amplification conditions

Agens			Sekvence+značení	Amplifikační podmínky reakce	Koncentrace $MgCl_2$
CPN+CT 16S RNA	primery vnější	CPN-A	5'- GTGGGAACTCTAACGAGACT	95°C 3 min (95°C 30sec, 45°C 30sec, 72°C 1 min.) x35, 72°C 7 min	1,5 mM
		CPN-B	5'- CATCTCACGATCTTGCTACC		
	primery vnitřní	CPN-C	5'- CCGCAAGGACATATACACAGG	95°C 3 min (95°C 30sec, 50°C 30sec, 72°C 1 min.) x35, 72°C 7 min	1,5 mM
		CPN-D	5'- GCAGACTACAATCCGAACTGG		
	sondy	CPN-FL	5'-GGGACTTAACCCAACACCTC ACGGC - FL*	Real-time PCR: amplifikace: 95°C 10 min (95°C 10sec, 50°C 10sec, 72°C 20sec.) x 50, analýza křivky tání: 95°C 0,1 sec, 40°C 30 sec. a následný vzestup na 85°C, 0,1°C/sec.	3 mM
		CPN-LC	5'-LC640 RED- CGAGCTGACGACA GCCATGCAGC		
IS	primery	ISCPN1	5'- CCGCAAGGACATATACACAGG A TTCCTGTAACAACAAGTCAG	95°C 10 min (92°C 30sec, 50°C 30sec, 72°C 1 min.) x35, 72°C 7 min	1,5 mM
		ISCPN2	5'- GCAGACTACAATCCGAACTGG CTTCCCCAGAACAATAAGAAC		
	sondy	IS-FL	5'-AGCTGCTGTAGGCTGCCGAA CTGT -FL*		3 mM
		IS-LC	5'-LC705 RED - TGCGTGAGGTGA TGTAGAAGCCGC		
CPN - MOMP (Tong a Sillis,58)	primery vnější	CP1	5'-TTACAAGCCTTGCCTGTAGG	95°C 3 min (95°C 30sec, 45°C 30sec, 72°C 1 min.) x35, 72°C 7 min	1,5 mM
		CP2	5'-GCGATCCCAAATGTTTAAGGC		
	primery vnitřní	CP3	5'-TTATTAATTGATGGTACAATA	95°C 3 min (95°C 30sec, 50°C 30sec, 72°C 1 min.) x35, 72°C 7 min	1,5 mM
		CP4	5'-ATCTACGGCAGTAGTATAGTT		

* FL= fluorescein
* FL= fluorescein

nebo sterilního PBS. Po vytřepání do transportního média byl tampon odstraněn, z 0,2 ml vzorku izolována DNA a extrahována do 100 μl AE. Vzorky moče byly promíchány na Vortexu a 0,5 ml bylo centrifugováno 10 min při 10 000 rpm a pokojové teplotě. Sediment byl resuspendován v 0,2 ml supernatantu a použit pro izolaci DNA. Při vyšetření vzorků moče nebo výtěrů metodou Cobas Amplicor CT/NG bylo 0,5 ml původního vzorku zpracováno podle návodu výrobce a nakonec eluováno do 0,5 ml elučního roztoku (250 μl CT/NG Lysis Buffer a 250 μl CT/NG Specimen diluent, Roche). Kontrolní vzorky QCMD byly rozpuštěny v 1 ml destilované vody, 0,5 ml bylo centrifugováno 10 min při 10 000 rpm a pokojové teplotě a z peletu, resuspendovaného v 0,2 ml supernatantu, byla izolována DNA. Vzorky pro externí kontrolu kvality metod průkazu DNA CPN (Instand 2006) byly rozpuštěny v 0.5 ml destil. vody a dále zpracovány stejným způsobem. Izoláty DNA byly skladovány při -20°C.

Amplifikace bakteriálního genomu
Konvenční PCR

5 μl templátu (izolované DNA) bylo přidáváno k 20 μl reakční směsi, obsahující reakční pufr (20 mM Tris/HCl pH8,4 a 50 mM KCl, Invitrogen, Groningen, Holandsko), 12,5 pmol každého primeru, 0,25 mM koncentraci každého deoxynukleotid-trifosfátu (dATP, dTTP, dGTP, dCTP, Invitek, Berlín, Německo) a 1.25U Taq polymerázy (Platinum Taq-polymerase, Invitrogen). Koncentrace $MgCl_2$ a reakční podmínky odpovídaly zvolenému typu primerů (viz tabulka1). Reakce byly prováděny v termocykleru GeneAmp 2400 nebo 9600 (Applied Biosystems). Produkty reakce byly analyzovány elektroforézou v 3% agarózovém gelu po obarvení etidium bromidem (EtBr).

Real-time PCR

5 μl templátu bylo přidáváno k 15 μl reakční směsi, obsahující: Reakční směs (Fast Start Master Hybridization Probes, Roche), 3 mM $MgCl_2$ 0,66 μM koncentraci každého primeru, 0,2 μM koncentraci každé hybridizační sondy (2 sondy pro chlamydiovou DNA a 2 sondy pro vnitřní standard) a 500 kopií vnitřního standardu (viz dále). Amplifikace probíhala v LightCycleru 1.0 (Roche) Reakční podmínky jsou uvedeny v tab.1.

Průkaz DNA C. trachomatis pomocí PCR s kolorimetrickou detekcí produktu reakce (COBAS Amplicor CT/NG)

Tento komerční test byl používán pro rutinní průkaz DNA CT v moči, výtěrech a ve vzorcích pro externí kontrolu kvality. Test byl proveden na automatu COBAS podle instrukcí výrobce.

Použité primery a sondy

Primery a sondy pro real-time PCR byly odvozeny z části genu pro 16S RNA, společné pro CPN a CT (genová banka, NC 005043). Pro real-time PCR byly použity FRET sondy značené fluoresceinem a LC 640 red (Roche). Pro detekci vnitřního standardu byly použity rovněž FRET sondy, značené fluores-

proLékaře.cz | 29.11.2026

ceinem a LC 750 red (Roche). Sondy byly navrženy a připraveny firmou TIB Molbiol, Berlín, Německo. Pro konvenční PCR byly použity jednak primery, odvozené z genu pro 16 S RNA [22], jednak primery odvozené z genu pro MOMP [29]. Sekvence všech primerů a sond jsou shrnuty v tabulce 1.

Příprava rekombinantních standardů

Příprava externí kontroly (kalibrátoru): Zvolený úsek bakteriální DNA, amplifikovaný pomocí primerů CPNa,CPNb (268 pb) byl vložen do plazmidu pCR 2.1. (TOPO TA Cloning Kit, Invitrogen) s použitím postupu, doporučeného výrobcem kitu. Získaný rekombinantní plazmid (KCPN) byl pomnožen v *E. coli* a vyčištěn pomocí Invisorb Plasmid Midi Kit (Invitek) a následné izopyknické centrifugace na gradientu CsCl. Výtěžek DNA byl stanoven měřením absorbance vzorku při 260 a 280 nm na UV-spektrofotometru. Počet kopií rekombinantního plazmidu ve vzorku byl stanoven na základě znalosti velikosti získaného plazmidu (4168 pb).

Příprava vnitřního standardu: Při přípravě vnitřního standardu pro real-time PCR jsme použili plazmid ISCT, připravený jako vnitřní standard pro real-time PCR na průkaz DNA cytomegaloviru [24] a CT. Jednalo se o plazmid pC2.1, do nějž byla vložena 80 pb dlouhá sekvence, odvozená z genomu viru Rousova sarkomu a ohraničená primery pro amplifikaci části genu UL83 CMV a primery pro amplifikaci kryptického plazmidu CT. 10^5 kopií plazmidu ISCT bylo použito jako templát v PCR s kombi-primery ISCPN1, ISCPN2 (složení primerů a podmínky PCR - viz tabulka 1). Produkt reakce (286 pb) byl klonován v *E. coli* pomocí vektoru pCR2.1. Z rekombinantních klonů byl izolován plazmid ISCPN (viz výše). Pro detekci amplifikace vnitřního standardu v real-time PCR byly použity FRET sondy, odvozené z DNA viru Rousova sarkomu (viz tabulka 1).

Stanovení citlivosti a specificity reakce.

Vzorky byly hodnoceny jako pozitivní, či negativní, pokud poskytly shodný výsledek ve dvou nezávislých amplifikačních testech (konvenční a real-time PCR). Vzorky, které ukázaly v obou testech rozdílný výsledek, byly hodnoceny na základě třetího amplifikačního testu, při němž byl amplifikován rozdílný úsek bakteriálního genomu. Pro stanovení DNA CT byl použit COBAS Amplicor CT/NG (Roche), pro stanovení CPN nested PCR, amplifikující část genu pro hlavní vnější membránový protein [29]. Citlivost testů byla hodnocena jako počet pozitivních výsledků, získaný vyšetřením všech pozitivních vzorků, vyjádřený v %. Specificita testů byla hodnocena jako počet negativních výsledků, získaný vyšetřením všech negativních vzorků, vyjádřený v %.

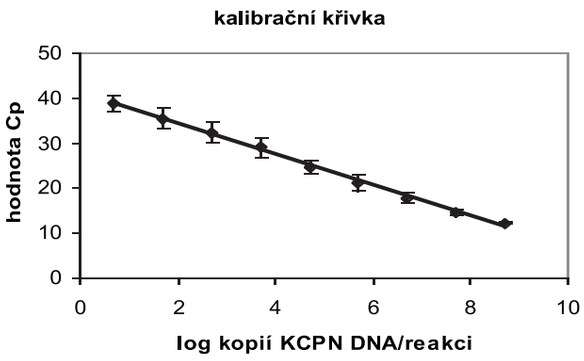
Výsledky

Příprava rekombinantních kontrol a standardů

Výtěžek DNA po purifikaci plazmidu KCPN byl 39,7 μg/ml a odpovídal koncentraci 8,7x 10^{12} kopií/ml. Výtěžek plazmidu ISCPN byl 118 μg DNA, což odpovídá množství 3x10^{13} kopií/ml. Protože ISCPN obsahuje sekvence primerů pro amplifikaci pp65 CMV, kryptického plazmidu pro *C. trachomatis* i genu pro chlamydiovou 16S RNA, lze jej použít pro všechny tři typy PCR. Standardy byly uchovávány v alikvotech při -20°C.

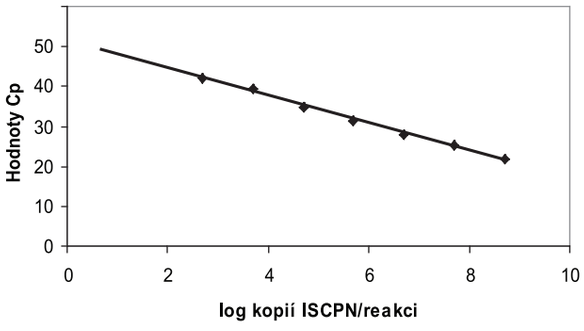
Stanovení analytické citlivosti a ověření specificity real-time PCR

Plazmid KCPN byl použit pro sestrojení kalibrační křivky (viz obr. 1), pomocí níž byla stanovena analytická citlivost reakce 5–10 kopií. Reakce probíhá lineárně až do 10^8 kopií cílové DNA/reakci. Stejným způsobem byl titrován i vnitřní standard



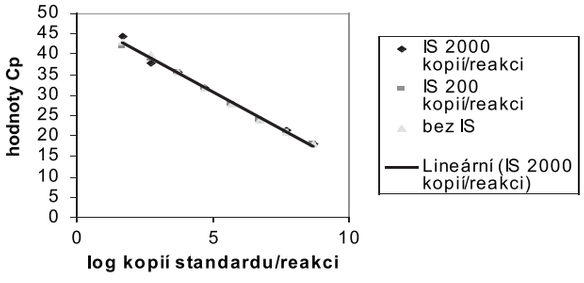
Obr. 1. Titrace kalibrátoru KCPN

Fig. 1. KPCN calibrator titration



Obr. 2. Titrace vnitřního standardu

Fig. 2. Internal standard titration



Obr. 3. Titrace kalibrátoru za přítomnosti různého množství vnitřního standardu

Fig. 3. Calibrator titration in the presence of variable quantities of the internal standard

proLékaře.cz | 29.11.2026

ISCPN: Porovnání kalibračních křivek KCPN a ISCPN ukázalo, že ISCPN se při reakci amplifikuje se stejnou účinností, jako KCPN (obr. 2). Za přítomnosti vnitřního standardu spolu s cílovou sekvencí DNA dochází při PCR ke kompetici, která může vést k poklesu citlivosti reakce. Proto byl kalibrátor KCPN následně titrován za přítomnosti různých množství vnitřního standardu (viz obr. 3). Získané kalibrační křivky ukazují, že přítomnost vnitřního standardu (200–2000 kopií) nesnižuje významně citlivost reakce. Pro rutinní aplikace bylo nadále do PCR přidáváno 500 kopií vnitřního standardu/reakci. Pro stanovení variability testu byla v reakci opakovaně kvantifikována pozitivní kontrola, získaná z genomické DNA CPN (laboratorní kmen C 1360, Vircell). Variabilita v rámci jednoho testu byla 0,33 %, variabilita mezi jednotlivými testy 3.6 % (viz tabulka 2).

Tab. 2. Stanovení reproducibility 16S RNA real-time PCR

Table 2. Reproducibility of 16S RNA real-time PCR

	Počet měření	Průměr Cp[1]	Směrodat. odchylka	Variační koef.
Variabilita v rámci jednoho testu	n=4	25,74	0,0837	0,33%
Variabilita mezi jednotlivými testy:	n=8	26,86	0,9691	3,60%

[1] = crossing point, amplifikační cyklus, při němž dojde k vzestupu luminiscence
[1] = crossing point, amplification cycle, in which luminiscence increases

Tab. 3. Porovnání záchytu DNA chlamydií v klinických vzorcích pomocí konvenční PCR a real-time PCR amplifikující úsek genu pro 16S RNA (n=105)

Table 3. Comparison of chlamydial DNA detection in clinical specimens (n = 105) by conventional PCR and real-time PCR amplifying the 16S RNA sequence.

	Real-time PCR	
Konvenční PCR	Pozitivní	Negativní
pozitivní	28	8[1]
negativní	4[2]	65

[1] 4 vzorky falešně pozitivní v nested PCR, 4 vzorky falešně negativní v real-time PCR
[2] 4 vzorky falešně negativní v konvenční PCR
[1] 4 false positive samples in nested PCR, 4 false negative samples in real-time PCR
[2] 4 false negative samples in conventional PCR

Pro ověření specificity testu byly v 16S RNA real-time PCR použity jako templáty izoláty DNA z různých patogenů, nejčastěji se podílejících na infekcích dolních a horních cest dýchacích, nebo infekcích genitourinárního traktu (viz Materiál a metody). Pozitivní signál dávala v reakci pouze DNA izolovaná z CPN nebo CT.

Ověření diagnostické účinnosti

Celkem 105 klinických vzorků bylo paralelně testováno pomocí real-time a konvenční nested PCR. Výsledky jsou shrnuty v tab. 3. Nesouhlasný výsledek byl získán u 12 vzorků: 8 z nich bylo na základě třetího nezávislého amplifikačního testu určeno jako pozitivní, 4 byly určeny jako negativní. Srovnání citlivosti a specificity obou testů je ukázáno v tabulce 4: Pomocí obou metod

Tab. 4. Stanovení citlivosti a specificity 16S real-time PCR na základě vyšetření klinických vzorků

Table 4. Sensitivity and specificity of the 16S real-time PCR in clinical specimens

Metoda	Počet testovaných pozitivních vzorků	Počet pozitivních výsledků	Citlivost (%)	Počet testovaných negativních vzorků	Počet negativních výsledků	Specificita (%)
Konvenční PCR	36	32	88,9	69	65	94,2%
Real-time PCR	36	32	88,9	69	65	100

Tab. 5. Porovnání záchytu chlamydiové DNA z různých druhů klinických materiálů

Table 5. Comparison of chlamydial DNA detection from various types of clinical specimens

Typ vzorku	Počet vyšetření	Počet pozitivních vzorků	Citlivost (%)		Specificita (%)	
			Konvenční PCR	Real-time PCR	Konvenční PCR	Real-time PCR
Bronchoalveolární laváž	40	4	100	100	88,9	100
Periferní krev (buffy coat)	24	4	100	100	100	100
Moč	12	8	87,5	87,5	100	100
Výtěr – krk a nos	7	3	100	60	100	100
Výtěr – spojivkový vak	18	16	81,3	87,5	100	100

Epidemiologie 4-07 25.10.2007 8:38 Str. 171
proLékaře.cz | 29.11.2026

byly získány 4 falešně negativní výsledky z 36 testovaných pozitivních vzorků. (U obou testů vykazovaly falešnou negativitu různé vzorky.) Citlivost obou testů byla tedy shodná. Falešně pozitivní výsledky poskytla pouze konvenční PCR. Specificita 16S RNA real-time PCR byla 100 %. Tabulka 5 ukazuje výsledky porovnání citlivosti a specificity obou testů u různých typů klinických vzorků. Specificita 16S RNA real-time PCR byla velmi dobrá u všech typů vyšetřovaných vzorků. Konvenční PCR poskytla falešně pozitivní výsledek u 2/36 negativních vzorků BAL. Citlivost 16S RNA real-time PCR byla snížena u vzorků výtěrů z krku a nosu. U konvenční PCR byla citlivost nižší u výtěrů ze spojivky. U ostatních vzorků byla citlivost obou testů stejná. Pro ověření diagnostické účinnosti byly použity i panely vzorků pro externí kontrolu kvality: 10 vzorků pro kontrolu kvality amplifikace DNA CT (QCMD 2006) a 4 vzorky pro kontrolu amplifikace DNA CPN (Instand 2006). V QCMD 2006 bylo správně určeno všech 10 kontrolních vzorků. U vzorků INSTAND 2006 byl slabě pozitivní vzorek č.3 (200 ICU (inclusion-forming units) /ml) určen jako negativní jak v16S RNA real-time PCR, tak v konvenční PCR. Množství DNA v tomto vzorku bylo na dolní hranici citlivosti testu a jako negativní ho určilo 17 z 28 zúčastněných laboratoří. Nelze tudíž vyloučit, že negativní výsledek byl důsledkem degradace DNA.

Diskuse

Přes velký rozvoj metodických přístupů, jehož jsme svědky v posledních 10 letech, zůstává diagnostika chlamydií stále nedořešeným problémem. Vzhledem k nejednoznačné interpretaci sérologických nálezů se u většiny onemocnění s podezřením na chlamydiovou infekci doporučuje provést přímý průkaz bakterií. Ani zde však nemáme k dispozici test, který by byl dostatečně spolehlivý. Metody založené na amplifikaci bakteriální DNA mají výhodu vysoké citlivosti i specificity, jejich prediktivní hodnota však v mnohých případech není jasně stanovena [3, 9, 25]. U CT, která je v mnohých zemích epidemiologicky sledovaným agens s implementovanými screeningovými programy, jsou amplifikační metody již dobře zavedeny v rutinní diagnostice. Od poloviny 90. let, kdy se objevily první komerčně dostupné testy, byla vyvinuta celá řada metodických přístupů, využívajících různé metody amplifikace. U CPN je vývoj spolehlivých komerčně dostupných testů zatím na začátku a žádný z testů, které jsou u nás dostupné nebyl dosud dostatečně validován [3, 9].

V naší laboratoři jsme pro detekci DNA CT používali od r.2003, kdy se přestal dodávat LCx test Abbott, komerční PCR COBAS Amplicor (Roche). Tato metoda je spolehlivá a dobře reprodukovatelná, její prováděcí charakteristiky odpovídají požadavkům rutinní diagnostiky [6, 13, 30], má však i řadu nevýhod: je ekonomicky náročná s vysokými náklady na ingredience a požadavkem na nákladné přístrojové vybavení, je značně citlivá na inhibitory reakce (viz dále) a je vhodná pouze pro některé typy vzorků. Protože prokazuje úsek na kryptickém plazmidu, který je přítomen v CT ve variabilním počtu kopií [18], není tato reakce vhodná pro kvantifikaci bakteriální DNA v klinických vzorcích. Kryptický plazmid není nezbytný pro replikaci bakterií a u některých kmenů může tudíž dojít k jeho ztrátě, aniž by to ovlivnilo patogenní vlastnosti bakterie. U takovýchto kmenů může PCR založená na amplifikaci kryptického plazmidu poskytovat falešně negativní výsledky. Široké využívání takových metod ve screeningových programech zdá se může vést k selekci těchto variantních kmenů [12]. Proto jsme vyvinuli alternativní real-time PCR, založenou na amplifikaci genomické DNA. Jako cílovou sekvenci jsme zvolili úsek genu pro 16S RNA. Tento gen byl v minulosti použit pro amplifikační detekci chlamydií již několikrát [3, 22]. Jeho výhodou je možnost současného průkazu CPN i CT, a dále vysoká konzervativnost, díky níž je pravděpodobnost falešné negativity reakce v důsledku genetické variability prokazované sekvence DNA nízká. U CT je tento gen přítomen ve dvou kopiích, takže jeho využití jako cílové sekvence zvyšuje citlivost PCR. Konzervativnost tohoto genu má však i negativní stránku: gen pro 16S RNA má podobnou strukturu u různých bakteriálních kmenů a je s ním spojeno určité riziko nižší specificity reakce [11]. Specificitu naší real-time PCR jsme ověřili funkčním testem, v němž jsme jako templát použili DNA izolovanou z druhů bakterií, které mohou při diagnostice chlamydií nejčastěji kontaminovat klinické vzorky, a následně jsme ji potvrdili i při testování klinických vzorků. Pomocí rekombinantního kalibrátoru byla citlivost reakce stanovena na 5–10 kopií cílové DNA/reakci. Tato citlivost je srovnatelná s konvenční nested PCR, kterou jsme až dosud používali pro detekci CPN i s citlivostí komerčních kitů na detekci genomické DNA CT.

Častou příčinou falešných negativit při detekci nukleových kyselin amplifikačními metodami je přítomnost inhibitorů reakce ve vzorcích. Tyto inhibitory lze odstranit pomocí různých metod purifikace DNA, v některých případech zmražením a rozmražením [7], nebo naředěním vzorku (což ovšem může vést k nedostatečné citlivosti testu). U některých vzorků se však inhibitory nepodaří odstranit ani při purifikaci DNA. Typy

Epidemiologie 4-07 25.10.2007 8:38 Str. 172
proLékaře.cz | 29.11.2026

vzorků, které jsou nejčastěji používány pro diagnostiku chlamydií (vzorky močí, BAL, sputa či výtěry) jsou na inhibitory PCR zvláště bohaté a real-time PCR, vzhledem k malému objemu reakční směsi, je na přítomnost inhibitorů velmi citlivá. Proto je nezbytné kontrolovat přítomnost inhibitorů PCR pomocí vnitřního standardu, tj. cizorodé DNA, která se přidává do reakční směsi a amplifikuje souběžně s cílovou DNA. Optimálním přístupem je zařazení vnitřního standardu do reakce již v preanalytické fázi, tzn. ještě před purifikací DNA. Takto je možno kontrolovat nejen inhibici PCR, ale i účinnost izolace DNA. Naším záměrem bylo připravit vnitřní standard s touto možností využití. Protože klinické vzorky jsou často vyšetřovány na více infekčních agens, je výhodou mít k dispozici vnitřní standard, který je amplifikovatelný ve více reakcích. Proto jsme připravili standard, nesoucí cílové sekvence pro amplifikaci DNA cytomegaloviru, CT i CPN, který je použitelný pro všechny 3 reakce. Aby kompetice nevedla ke snížení citlivosti reakce, upravili jsme koncentrace jednotlivých složek reakce, ověřili jsme, že interní standard se amplifikuje se stejnou účinností jako cílová bakteriální DNA, optimalizovali jsme množství interního standardu, přidávaného do reakce a standard jsme konstruovali takovým způsobem, aby velikost amplifikovaného úseku na vnitřním standardu byla o něco větší, než velikost amplifikovaného úseku na cílové DNA. Při testování klinických vzorků jsme zjistili inhibici u 10 % z nich.

Závěr

Navržená 16S RNA real-time PCR pro detekci DNA *C. pneumoniae* a *C. trachomatis* splňuje parametry, potřebné pro její diagnostické využití a je vhodná pro rutinní vyšetřování klinických vzorků, pro provádění screeningových vyšetření i pro epidemiologické studie.

Poděkování.

Tato práce byla řešena v rámci grantu IGA MZ ČR č. 1A8259-3/2004

Literatura

1. **Black, C.** Current methods of laboratory diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infection. Clin Microbiol Rev 1997, 10, 160–184.
2. **Blocker, M., Krysiak, R., Behets, F.** Quantification of *Chlamydia trachomatis* elementary bodies in urine by Ligase Chain Reaction. J Clin Microbiol 2002, 40, 3631–3634.
3. **Boman, J., Gaydosh, C., Quinn, T.** Molecular diagnosis of *Chlamydia pneumoniae* infection. J Clin Microbiol 1999, 37, 3791–3799.
4. **Boman, J., Gaydos, C. A.** Polymerase chain reaction detection of *Chlamydia pneumoniae* in circulating white blood cells. J Infect Dis 2000, 181, Suppl. 3, S452– S454.
5. Centers for disease control and prevention. Screening tests to detect *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoae* infections – 2002. MMRW 2002, 51, RR-15, 1–38.
6. **Chalker, V., Vaughan, H., Patel, P. et al.** External quality assesment for detection of Chlamydia trachomatis. J Clin Microbiol 2005, 43, 1341–1347.
7. **Chong, S., Jang, D., Song, X. et al.** Specimen processing and concentration of *Chlamydia trachomatis* added can influence false-negative rates in LCx assay but not in the APTIMA combo2 assay when testing for inhibitors. J Clin Microbiol 2003, 41, 778–782.
8. **Darville, T.** *Chlamydia trachomatis* infections in neonates and young children. Semin Pediatr Infect Dis 2005, 16, 235–244.
9. **Dowell, S., Peeling, R., Boman, J. et al.** Standardizing *Chlamydia pneumoniae* assays: Recomendations from the centers for disease control and prevention (USA) and the laboratory centre for diasease control (Canada). Clin Infect Dis 2001, 33, 492–503.
10. **Grayston, T.** Background of current knowledge of *Chlamydia pneumoniae* and atherosclerosis. J Infect Dis 2000, 181, Suppl 3, S402–S410.
11. **Hebb, J., Cohen, C., Astete, S. et al.** Detection of novel organisms associated with salpingitis by use of 16S DNA polymerase chain reaction. J Infect Dis 2004, 190, 2109–2120.
12. **Príkazský, V., Fabiánová, K., Roubalová, K.** Varianta *Chlamydia trachomatis* s delecí (ztrátou části DNA) na kryptickém plazmidu: důsledky pro použití diagnostických testů. Zprávy CEM 2006, 15, 515.
13. **Johnson, R. E., Green, T. A., Schachter, J., Jones, R. B. et al.** Evaluation of nucleic acid amplification tests as reference tests for *Chlamydia trachomatis* infections in asymptomatic men. J Clin Microbiol 2001, 38, 4382–4386.
14. **Johnston, S., Martin, R.** Chlamydophila pneumoniae and M*ycoplasma pneumoniae*: a role in asthma pathogenesis? Am J Resp Crit Care Med 2005, 172, 1078–1089.
15. **Kauppinen, M., Saikku, P.** Pneumonia due to *Chlamydia pneumoniae:* prevalence, clinical features diagnosis and treatment. Clin Infect Dis 1995, 21 suppl. 3, S244–S252.
16. **Kuoppa, Y., Boman, J., Scott, L. et al.** Quantitative detection of respiratory *Chlamydia pneumoniae* infection by real-time PCR. J Clin Microbiol 2002, 40, 2273–2274.
17. **Loffelholz, M., Jirsa, S., Teske, R., Woods, J.** Effect of endocervical specimen adequacy on ligase chain reaction detection of *Chlamydia trachomatis*. J Clin Microbiol 2001, 39, 3838–3841.
18. **Mahony, J. B., Luinstra, K. E., Sellors, J. W., Chernesky, M. A.** Comparison of plasmid-and chromosome-based polymerase chain reaction assays for detecting *Chlamydia trachomatis* nucleic acids. J Clin Microbiol 1993, 31, 1753–1758.
19. **Marrie, T., Poulin-Costello, M., Beecroft, M., Herman-Gnjidic, Z.** Etiology of immunity acquired pneumonia in treated in an ambulatory setting. Respir Med 2005, 99, 60–65.
20. **Morré, S. A., Rozendaal, L., vanValkengoed, I. et al.** Urogenital *Chlamydia trachomatis* serovars in men and women with symptomatic and asymptomatic infection:

Epidemiologie 4-07 25.10.2007 8:38 Str. 173
proLékaře.cz | 29.11.2026

An association with clinical manifestation? J Clin Microbiol 2000, 38, 2292–2296.
21. **Moulder, J.** Interaction of Chlamydiae and host cell in vitro. *Microbiol Rev* 1991, 55, 143–190.
22. **Nystrom-Rosander, C., Thelin, S., Hjelm, E., Linquist, O., Pahlson, C., Friman, G.** High incidence of *Chlamydia pneumoniae* in sclerotic heart valves of patients undergoing aortic valve replacement. Scan J Infec Dis 1997, 29, 361–365.
23. **Park, S. J., Lee, Y. C., Rhee, Y. K., Lee, H. B.** Seroprevalence of *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* in stable asthma and chronic obstructive pulmonary disease. J Korean med Sci 2005, 20, 225–228.
24. **Pumannova, M., Roubalova, K., Vitek, A., Sajdova, J.** Comparison of quantitative competitive polymerase chain reaction-enzyme-linked immunosorbent assay with LightCycler-based polymerase chain reaction for measuring cytomegalovirus DNA in patients after hematopoietic stem cell transplantation. Diagnost Microbiol Infect Dis, 2006; 54: 115–120.
25. Recomendations for the prevention and management of *Chlamydia trachomatis* infections. MMRW 1993; 42: RR–12, 1–32.
26. **Schachter, J.** Pathogenesis of chlamydial infections. Pathol Immunopathol Res 1989, 8, 206–220.
27. **Schachter, J., Hook, E., Martin, D. et al.** Confirming positive results of nucleic acid amplification tests (NAATs) for *Chlamydia trachomatis*: All NAATs are not created equal. J Clin Microbiol 2005, 43, 1372–1373.
28. **Sriram, S., Ljunggren-Rose, A., Yao, S. Y., Whetsell, W. O.** Detection of Chlamydial Bodies and Antigens in the Central Nervous System of Patients with Multiple Sclerosis. J Infect Dis 2005, 192, 1219–28.
29. **Tong, C. Y. W., Sillis, M.** Detection of *Chlamydia pneumoniae* and *Chlamydia psitacii* in sputum samples by PCR. J Clin Pathol 1993, 46, 313–317.
30. **VanderPol, B., Quinn, T., Gaydos, C. A, et al.** Multicenter evaluation of the Amplicor and automated COBAS Amplicor CT/NG tests for detection of *Chlamydia trachomatis*. *J* Clin Microbiol 2000, 38, 1105–1112.
31. **Wang, S.** The microimmunofluorescence test for *Chlamydia pneumoniae* infection: technique and interpretation. J Infect Dis 2000, 181, Suppl 3, S421–S425.

Do redakce došlo 6. 3. 2007

RNDr K. Roubalová, CSc.
NRL pro chlamydie
SZÚ
Šrobárova 48
100 42 Praha 10
e-mail: herpesvir@szu.cz

TESTY

TEST Z EPIDEMIOLOGIE

1. Chorý v jednotlivých klinických štádiách ochorenia je nákazlivý:
a) vždy koncom inkubačnej doby
b) koncom inkubačnej doby len pri niektorých ochoreniach
c) v štádiu rekonvalescencie pri solídnej imunite
d) v štádiu rekonvalescencie pri nesterilnej imunite

2. Nosič patogénnych zárodkov:
a) môže mať určité klinické príznaky
b) reaguje na prítomnosť patogénov biochemickými a imunologickými zmenami
c) nereaguje na prítomnosť patogénov

3. Chronické nosičstvo sa vyskytuje pri:
a) vírusovej hepatitíde A
b) vírusovej hepatitíde B
c) vírusovej hepatitíde C
d) meningokokovej infekcii
e) brušnom týfuse

4.Vírusová hepatitída B sa môže preniesť:
a) z matky na dieťa počas pôrodu
b) krvnými derivátmi
c) rôznymi potravinami
d) vodou
e) sexuálnym stykom

5. Infekcia HIV sa môže preniesť:
a) pri heterosexuálnom styku
b) parenterálne, transfúziou ...
c) pri bežnom spoločenskom styku s chorým
d) z matky na dieťa počas pôrodu
e) z matky na dieťa pri kojení
f) predmetmi dennej potreby

Správná odpovědi: 1 b,d, 2 b, 3 b,c,e, 4 a,b,e, 5 a,b,d,e