

LABORATORIUM DIAGNOSE VAN INFECTIES MET MICRO-ORGANISMEN VAN HET GENUS CHLAMYDIA

Maes Brigitte

10 december 2002

ACHTERGROND

Geschiedenis

C. trachomatis: herkend in 1907

C. psittaci: herkend in 1930

C. pneumoniae: 1965 (TW-183) – 1983 (AR-39) – 1989 (TWAR = *C. pneumoniae*)

C. pecorum: herkend in 1992

Microbiologie

Orde: Chlamydiales

familie: Chlamydiaceae

genus: Chlamydia

species : *C. trachomatis*

genus : Chlamydophila

species : *C. psittaci*

species : *C. pneumoniae*

Obligaat intracellulaire organismen met twee onderscheiden levensfasen:

- 1) Intracellulair – replicerend - niet-infectieus (reticulaire lichaampjes)
- 2) Extracellulair – niet-replicerend – infectieus (elementaire lichaampjes)

Reservoir en transmissie:

C. trachomatis: genitale en respiratoire tractus en conjunctivae van de mens – via sexueel contact, hand-oog-contact, (perinataal)

C. psittaci: vogels – via inhalatie van besmette stofdeeltjes

C. pneumoniae: respiratoir epitheel van de mens – via inhalatie van respiratoire droplets

Epidemiologie

C. pneumoniae:

- wereldwijd verspreid, (tropen, ontwikkelingslanden > westerse wereld)
- prevalentie van Ab stijgt met leeftijd, snelle stijging tussen leeftijden 5 en 20 jaar, tot 70 % bij oudere bevolking
- geen levenslange immuniteit, reïnfectie mogelijk
- infectie vanuit asymptomatische dragers is frequent

C. trachomatis:

- sexueel overdraagbare aandoening
- 10⁷ nieuwe infecties per jaar in Europa
- verspreiding moeilijk te documenteren en te controleren want veelal asymptomatisch (70% à 80 % van infecties bij vrouwen, 50 % van infecties bij mannen)
- veroorzaakt 20 à 50 % van PID (leidend tot infertiliteit en ectopische zwangerschap)
- kost-effectiviteitsstudies inzake screening van asymptomatische dragers (welke test te gebruiken?)

Kliniek

C. pneumoniae:

- asymptomatisch
- hoge luchtweginfecties: pharyngitis, sinusitis, otitis
- lage luchtweginfecties: bronchitis, pneumonie
- gemiddeld 10 % van pneumonieën
- endocarditis, myocarditis, erythema nodosum, acuut nierfalen
- meningitis, encefalitis
- arthritis
- chronische infectie: associatie met atherosclerose, Multiple Sclerosis, Ziekte van Alzheimer

C. trachomatis: verschillende serotypes met verschillende kliniek:

- vrouwen: urethritis, cervicitis, PID, ectopische zwangerschap, infertiliteit
- mannen: urethritis, epididymitis, infertiliteit, arthritis
- neonati : respiratoire infectie en conjunctivitis
- lymphogranuloma venereum (LGV) (tropen)
- trachoma (tropen)

DIAGNOSTIEK

Cultuur

- technisch complex
- lage opbrengst

Antigen detectie met species-specifieke Mabs

- lage gevoeligheid
- arbeidsintensief, expertise vereist
- enkel bruikbaar op cel culturen

Serologie

- Micro-immunofluorescentie (MIF) met gezuiverde elementaire lichaampjes: species-specifiek, hoge sensitiviteit, 'gouden standaard'
- Complement fixatie (CF) met Chlamydia LPS: genus-specifiek

IgM: - verschijnen pas 3 weken na onset en verdwijnen weer snel (uitz.)

- verschijnen meestal niet bij reïnfectie

IgG: verschijnen pas 6 à 8 weken na onset

CF: - kan bij primaire infectie quasi onmiddellijk positief zijn dankzij snelle ontwikkeling van LPS antilichamen

- frequent negatief bij reïnfectie

TEST	POSITIEF RESULTAAT
MIF met specifiek antigen	
<i>Acute antibodies</i>	Viervoudige titer stijging IgM \geq 16 IgG \geq 512
<i>Vooraf bestaande antibodies</i>	IgG 8 - 256
Complement fixatie	
<i>Acute antibodies</i>	Viervoudige titer stijging \geq 64

Contra Chlamydia serologie:

- meeste oudere en COPD patiënten hebben blijvende IgG tot meerdere jaren na infectie (soms \geq 512)
 - o diagnose o.b.v. eenmalig hoge IgG waarde wordt sterk ontraden (lage predictieve waarde)
 - o gepaarde stalen nodig om titer stijging aan te tonen
- retrospectieve diagnose
- MIF en CF zijn arbeidsintensief
- MIF is gouden standaard maar is onderhevig aan subjectiviteit en vereist zekere expertise
- Diagnostische waarde van Chlamydia serologie:
Beperkt tot:
 - pneumonie bij kinderen: IgM (MIF)
 - acute fase van LGV: viervoudige IgG titer stijging (MIF)
- geen criteria voor chronische infectie

Contra CF:

- kan geen onderscheid maken tussen verschillende Ig klassen
- is meestal negatief bij reïnfectie
- slechts zeer beperkte gevoeligheid (10 % à 70%) niet specifiek voor species, kruisreactiviteit
- Aanbevelingen van de Centers for Disease Control and Prevention (USA) en Laboratory for Disease Control (Canada) inzake *C. pneumoniae* diagnostiek (2001): CF dient verlaten te worden

PCR

C. pneumoniae:

- geen commercieel beschikbare methode
- in-house methodes: gebrek aan standaardisatie (staalname en -verwerking, DNA extractie, primerdesign, amplificatie condities, detectie van amplificatieproduct, preventie van vals positieve en vals negatieve) bvb. detectie in atheroma's: 0 à 80%.
- Sensitiviteit? Specificiteit?
- Consensus: detectie moet gebeuren op oropharyngeale of nasopharyngeale wissers

- Aanbevelingen van de Centers for Disease Control and Prevention (USA) en Laboratory for Disease Control (Canada) inzake C. pneumoniae diagnostiek (2001):
 - o validatie vereist van elke nieuwe PCR methode ten opzichte van 1 van de 4 gepubliceerde methodes die voldoen aan de gestelde validatiecriteria
 - o TaqMan PCR is superieur aan andere PCR methodes (hogere sensitiviteit en specificiteit, lagere kans op contaminatie)

C. trachomatis:

- commerciële beschikbare methode, goedgekeurd door FDA: Amplicor (Roche)
- sensitiviteit: 90 %, specificiteit: 99 à 100 %, voor urogenitale wissers en urine

SITUATIE LAG UZ-LEUVEN: oktober 2001 – september 2002

Serologie: CF

PCR:

C. pneumoniae: in house TaqMan methode, Qiagen DNA-extractie kit
 C. trachomatis: Amplicor

Serologie:

- aantal uitgevoerde analyses: Tabel 1
- Niet-gepaarde stalen (uitz.: 16 patiënten: Tabel 2)
- 740/741 negatief, 1 extra-muros staal met titer ≥ 128

PCR:

C. pneumoniae:

- aantal uitgevoerde analyses: Tabel 1
- BAL-vochten en sputa, geen wissers
- resultaten: 1/209 stalen zeer zwak positief

C. trachomatis:

- urogenitale wissers en urinestalen
- aantal uitgevoerde analyses: Tabel 1
- resultaten: Tabel 3
- correlatie met CF resultaten cfr. Tabel 4

CONCLUSIES EN VOORSTELLEN:

1) Complement Fixatie test dient verlaten en al dan niet vervangen te worden. Alternatieven:

- o MIF
- o Nieuwe ELISAs: even gevoelig als MIF, gemakkelijker

2) Gezien de beperkte diagnostische waarde van serologie nieuwe serologische test reserveren voor bepaalde stalen: bvb.

- stalen van kinderen: IgM
- stalen van volwassenen in afwachting van validatie van de PCR methode
- geen stalen van gynecologische en urologische patiënten

Overleg met klinici nodig!

Hoe dan ook steeds gepaarde stalen!!

3) C. pneumoniae PCR:

- overleg met klinici inzake het op te sturen staaltype: wissers i.p.v. vochten !
 eventueel tijdelijk in parallel, in studieverband

- bestaande methode valideren ten opzichte van goed scorende gepubliceerde methode voor eventuele sensitiviteitsverbetering
 - o US CDC en Canadian LCDC
 - o 1 van recente TaqMan methodes

3) C. trachomatis PCR: kan de staalname verbeterd worden ? (eerst geloosde urine?)

STAND VAN ZAKEN APRIL 2003:

- overleg met clinici is gebeurd:
 - o Pneumologen/pediaters/infectiologen houden niet aan serologische testen vooral niet vanwege het retrospectief karakter ervan; zijn ook niet uitermate geïnteresseerd in de PCR resultaten gezien de ervaring wijst op een zeer lage frequentie van Chlamydia pneumonieën.
 - o Gynecologen houden wel aan serologische testen en zijn met name vooral geïnteresseerd in IgG bepalingen ten einde aanwijzingen te bekomen voor een vroegere C. trachomatis infectie in het kader van het infertiliteitsonderzoek. De resultaten zijn van belang in het bepalen van het tijdstip van een laparoscopie.
- Complement fixatie voor Chlamydia wordt niet meer uitgevoerd.
- Voor C. trachomatis IgG werden verschillende ELISA's uitgetest (cfr. Katrien Lagrou) waarvan er één in gebruik zal genomen worden.

REFERENTIES

Kuo CC, Jackson LA, Campbell LA, Grayston JT. Chlamydia pneumoniae (TWAR). Clin Microbiol Rev. 1995 Oct;8(4):451-61. Review.

Dowell SF, Peeling RW, Boman J, Carlone GM, Fields BS, Guarner J, Hammerschlag MR, Jackson LA, Kuo CC, Maass M, Messmer TO, Talkington DF, Tondella ML, Zaki SR; C. pneumoniae Workshop Participants. Standardizing Chlamydia pneumoniae assays: recommendations from the Centers for Disease Control and Prevention (USA) and the Laboratory Centre for Disease Control (Canada). Clin Infect Dis 2001 Aug 15;33(4):492-503

Verkooyen RP, Willemsse D, Hiep-van Casteren SC, Joulandan SA, Snijder RJ, van den Bosch JM, van Helden HP, Peeters MF, Verbrugh HA. Evaluation of PCR, culture, and serology for diagnosis of Chlamydia pneumoniae respiratory infections. J Clin Microbiol. 1998 Aug;36(8):2301-7.

Hermann C, Graf K, Groh A, Straube E, Hartung T. Comparison of eleven commercial tests for Chlamydia pneumoniae-specific immunoglobulin G in asymptomatic healthy individuals. J Clin Microbiol. 2002 May;40(5):1603-9.

Tondella ML, Talkington DF, Holloway BP, Dowell SF, Cowley K, Soriano-Gabarro M, Elkind MS, Fields BS. Development and evaluation of real-time PCR-based fluorescence assays for detection of Chlamydia pneumoniae. J Clin Microbiol. 2002 Feb;40(2):575-83.

Apfalter P, Blasi F, Boman J, Gaydos CA, Kundi M, Maass M, Makristathis A, Meijer A, Nadrchal R, Persson K, Rotter ML, Tong CY, Stanek G, Hirschl AM. Multicenter comparison trial of DNA extraction methods and PCR assays for detection of Chlamydia pneumoniae in endarterectomy specimens. J Clin Microbiol. 2001 Feb;39(2):519-24.

Black CM. Current methods of laboratory diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections.
Clin Microbiol Rev 1997 Jan;10(1):160-84.