

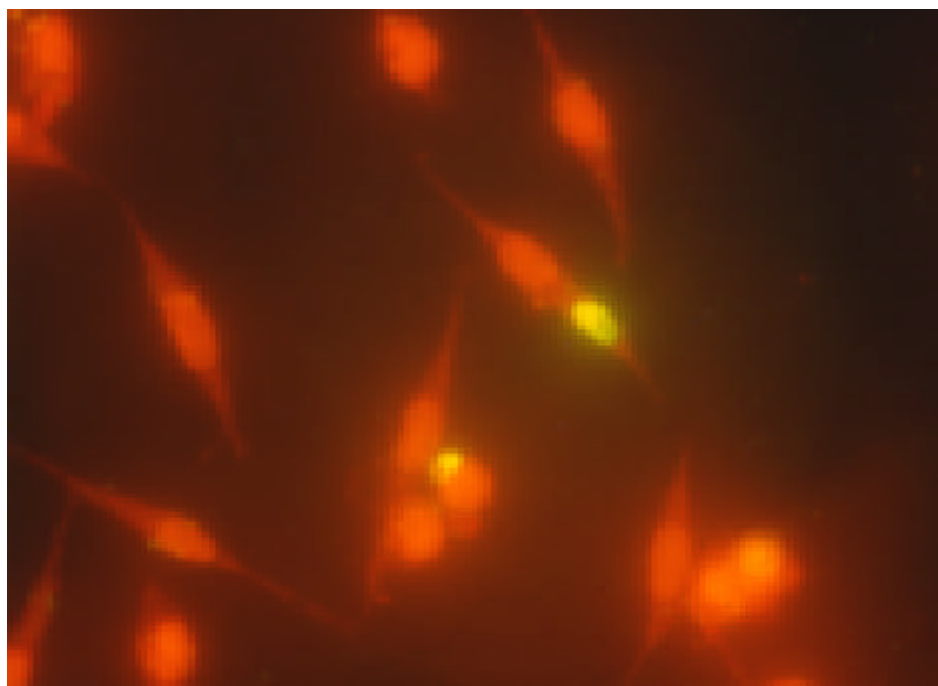


CAPIO diagnostik

Detektion av sexuellt överförbara sjukdomar med DNA-teknik

Klamydia, gonorré och Mycoplasma genitalium

Av Helena Enroth
Med.Dr., Klinisk Mikrobiologi, Capiro Diagnostik AB
helena.enroth@capio.se



Inklusioner av klamydiabakterien lyser äppelgrönt mot en bakgrund av brun-röda celler.

Chlamydia trachomatis- och *Neisseria gonorrhoeae*-infektioner är de två vanligaste och mest kända sexuellt överförbara sjukdomarna. Bakterien *Mycoplasma genitalium* är en relativt ”ny” bakterie som isolerades första gången i början av 80-talet hos uretritpatienter. Sedan dess har kli-

niska prevalensstudier utförts i flera länder där förekomsten av bakterien i urin, uretra eller cervix-prover hos framförallt symptomatiska STD-patienter har undersökts. Alla tre agens har associerats med infertilitet och SARA (Sexually Acquired Reactive Arthritis).

>> fortsättning sid 8-9

I DETTA NUMMER

▼ sid 2

Radiologi

Utökat förtroende i Västra Götaland

▼ sid 3

1,6 miljoner klubben -
En klubb med stort hjärta

▼ sid 4-5

Capios

Forskningsstiftelse med patientfokus

▼ sid 6-7

En kundtjänst för alla frågor

▼ sid 10-11

Indikationsrutan & Frågelådan

▼ sid 12

Öppet hus i Eskilstuna

Detektion av sexuellt överförbara Klamydia, gonorrhé och

Av Helena Enroth, Med.Dr., Klinisk mikrobiologi
helena.enroth@capio.se

Chlamydia trachomatis

Klamydiabakterien, *C. trachomatis*, är gramnegativa, obligat intracellulära bakterier som formar karakteristiska intracellulära inklusioner som kan observeras i cellkulturer. *C. trachomatis* orsakar cervicit, uretrit, salpingit, proktit och endometrit hos kvinnor och uretrit, epidymit och proktit hos män. Det har uppskattats att 70-80% av kvinnorna och upp till 50% av männen är symptomfria trots infektionen. Många klamydiainfektioner hos kvinnor är därför obehandlade vilket kan leda till inflammation i äggledarna och vara en av orsakerna till infertilitet.

Mikroorganismen kan också överföras vid förlossningen och ge barnet konjunktivit och/eller pneumoni. Även vuxna individer kan få klamydia konjunktivit.

Neisseria gonorrhoeae

Gonokocker, *N. gonorrhoeae*, är gramnegativa diplokokker som kan ses i utstryk från uretra eller cervix, ofta tillsammans med neutrofiler. Odling av *N. gonorrhoeae* kan vara svårt att utföra eftersom bakterien är transportkänslig.

N. gonorrhoeae orsakar akut uretrit hos män, som obehandlad kan utvecklas till epidymit, prostatit, och uretrastriktur. Hos kvinnor är cervixinfektioner det vanligaste. En komplikation hos kvinnor är bäckeninflammation (pelvic inflammatory disease) som kan vara en bidragande orsak till infertilitet.

Asymtomatiska infektioner förekommer oftare hos kvinnor än hos män. I sällsynta fall kan gonorrhé ge septisk artrit med broskdegeneration som följd.

Mycoplasma genitalium

Bakterien *M. genitalium* tros orsaka uretrit och cervicit, den smittar sexu-

ellt och är vanligt förekommande. Bakterien orsakar symptom som påminner om andra sexuellt överförbara sjukdomar så som klamydia och gonorrhé. Prevalensen av bakterien uppskattas till omkring 5% vid provtagning på STD-mottagning.

Komplikationer av uretrit och cervicit kan vara salpingit och utomkvedshavandeskap hos kvinnor, epidymit och kanske prostatit hos män.

M. genitalium omfattas inte av Smittskyddslagen men kontaktspårning och antibakteriell behandling rekommenderas.

Detektion av Chlamydia trachomatis och Neisseria gonorrhoeae

Utvecklingen av amplifieringsmetoder för att detektera *C. trachomatis* och *N. gonorrhoeae*, jämfört med detektion genom odling och serologiska test, har framförallt två fördelar: ökad känslighet och att fler olika provtyper kan analyseras.

Flera olika molekylärbiologiska test finns på marknaden, alla använder sig av amplifieringstekniker så som LCR (ligase chain reaction), PCR (polymerase chain reaction) och SDA (strand displacement amplification).

Inom Capio Diagnostik används för närvarande PCR i Eskilstuna och en nyligen införd SDA-teknik i Skövde som ersätter LCR-tekniken. Båda dessa metoder anses likvärdiga vad gäller prestanda och används för mångfaldigande och detektion av arvsmassan hos *C. trachomatis* och *N. gonorrhoeae* i kliniska prover så som urin och pinnprover från cervix och uretra.

Det nya detektionssystemet, BDProbeTec™, är ett semiautomatiskt DNA-probe system för påvisning av *Chlamydia trachomatis* och



Helena Enroth är Med.Dr., och arbetar vid Capio Diagnostiks laboratorium vid Kärnsljukhuset i Skövde.

Neisseria gonorrhoeae från genitala prover. Systemet bygger på Strand Displacement Amplification (SDA) teknologi för direkt kvalitativ påvisning av *Chlamydia trachomatis* och *Neisseria gonorrhoeae*.

Metoden kan delas in i tre delar: generering av mål-DNA, exponentiell SDA-amplifiering och detektion.

Mål-DNA

Förutom kromosomalt DNA innehåller varje *C. trachomatis*-organism ca 10 kopior av en plasmid. Plasmiden finns hos alla serovarer av *C. trachomatis* men inte bland andra Chlamydiaarter. SDA-metoden baseras på amplifiering av en ca 100 baspar lång nukleinsyrasekvens som finns i plasmiden. Målsekvensen hos *N. gonorrhoeae* är en 103 baspar lång

a sjukdomar med DNA-teknik

Mycoplasma genitalium

robiologi, Capio Diagnostik AB
capio.se

sekvens i kromosomalt DNA.

Urinproverna centrifugeras så att en pellet av celler koncentreras i botten på röret. Lyseringslösning tillsätts till pelleten och till uretrapinnarna för att cellerna i provet ska gå sönder. Cervixproverna transporteras i lyseringslösningen så dessa är färdiga för värmebehandling. Alla proverna lyseras sedan vid 114° för att DNAt inne i bakterierna ska frigöras innan amplifieringssteget startas.

Exponentiell SDA-amplifiering och detektion

SDA är en amplifieringsmetod för DNA där amplifiering och detektion av mål-DNA sker med hjälp av specifika amplifieringsprimers och en specifik fluorescensmärkt detektorprobe. Reagensen för SDA-metoden finns torkad i mikrotiterbrunnarna där reaktionen sen sker.

Det förbehandlade provet som innehåller det frigjorda DNAt tillsätts till brunnar i en 96-håls platta (primingplatta) som innehåller primers för amplifiering, detektorprobe, nukleotider samt buffert och stabiliseringsmedel som behövs för att nya kopior av mål-DNA ska kunna byggas upp.

Efter inkubering vid 72.5 grader flyttas reaktionsblandningen till en annan 96-håls platta (amplifieringsplatta) som innehåller två olika enzymer (DNA polymeras och restriktionsenzym) som behövs för att SDA-reaktionen skall ske. Denna brunn innehåller dessutom nukleotider (dNTP), buffert och stabiliseringsmedel. Amplifieringsbrunnarna försluts med plastfilm och inkuberas därefter på en temperaturreglerad fluorescensläsare.

Reaktionen som sker är en isothermal cykling vid 52.5 grader där avläsning av amplifierad produkt sker i brunnarna på 96-håls plattan en gång

per minut under 60 minuter. De avlästa värdena plottas i ett diagram i realtid (exponentiell tillväxt av produkt under 60 minuter).

Signalen från brunnarna normaliseras och plottas mot tid, därefter kan arean under kurvan beräknas. Arean under kurvan kallas MOTA-värde (Method Other Than Acceleration) och jämförs därefter med en algoritm för hur den exponentiella tillväxten ska se ut.

En godkänd kurva, efter jämförelse med algoritm, och ett MOTA-värde >2000 ger ett positivt resultat, d v s amplifiering av den specifika produkten har varit specifik och exponentiell. MOTA-värden <2000 avläses som

negativt, d v s ingen amplifiering har skett i amplifieringsbrunnen.

Till varje prov som testas sätts även en brunn med amplifieringskontroll för att se om något i provet inhiberar (hämmar) SDA-reaktionen. Om ett urinprov är inhiberat så prepareras ett nytt prov från ursprungsurinen. Om ett cervixprov eller uretraprov är inhiberat analyseras det lyserade provet om ännu en gång. Om inget tydligt resultat kan utläsas rekommenderas att ett nytt prov tas.

Inhibition av pinnprov från kvinnor kan ofta undvikas om rengöringspinnen som finns med i testet noga används innan provtagning. ■■

Referenser

Klamydiainfektionerna ökar - hur vänder vi trenden?

Stenqvist K, Höglund D, Löwhagen G-B, Andersson-Ellström A, Milsom I. Läkartidningen 2002;99(48):4860-4866.

Detection of Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae by enzyme immunoassay, culture, and three nucleic acid amplification tests.

van Dyck E, Ieven M, Pattyn S, van Damme L, Laga M. J Clin Micro 2001; 39 (5):1751-1756.

Evaluation of the specificities of five DNA amplification methods for the detection of Neisseria gonorrhoeae.

Palmer HM, Mallison H, Wood RL, Herring AJ. J Clin Micro 2003;41(2):835-837.

Evaluation of a strand displacement amplification assay (BD ProbeTec-SDA) for detection of Neisseria gonorrhoeae in urine specimens.

Akduman D, Ehret JM, Messina K, Ragsdale S, Judson FN. J Clin Micro 2002;40(1):281-283.

Mycoplasma genitalium – en viktig och vanlig sexuellt överförd sjukdom.

Anagrus C, Loré B. Läkartidningen 2002;99(48):4858-4859.

Occurrence and treatment of Mycoplasma genitalium in patients visiting STD clinics in Sweden.

Johannisson G, Enström Y, Löwhagen G-B, Nagy V, Ryberg K, Seeberg S, Welinder-Olsson C. International Journal of STD & AIDS 2000;11:324-326.

Mycoplasma genitalium in non-gonococcal urethritis – a study in Swedish male STD patients.

Björelid E, Lidbrink P, Skov Jensen J. International Journal of STD & AIDS 2000;11:292-296.