



**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ**  
**ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА**

**Јелена Тошић Пајић**

**ДИЈАГНОСТИЧКЕ ПЕРФОРМАНСЕ И**  
**ЕКОНОМСКИ АСПЕКТИ ТЕСТОВА ЗА ДЕТЕКЦИЈУ**  
*Chlamydia-e trachomatis*

**Докторска дисертација**

**Ментор: др сци. мед. Марија Шорак, доцент**

**Крагујевац, 2019. године**

## ИДЕНТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

<b><i>I Аутор</i></b>
Име и презиме: Јелена Тошић Пајић
Датум и место рођења: 20. 10. 1981. Крагујевац
Садашње запослење: /
<b><i>II Докторска дисертација</i></b>
Наслов: „Дијагностичке перформансе и економски аспекти тестова за детекцију <i>Chlamydia-e trachomatis</i> “
Број страница: 122
Број слика: 9
Број библиографских података: 229
Установа и место где је рад израђен: Институт за јавно здравље у Крагујевцу
Научна област (УДК): Медицина
Ментор: др сци. мед. Марија Шорак, доцент
<b><i>III Оцена и одбрана</i></b>
Датум пријаве теме: 06.11.2017.
Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације: IV-03-449/20 од 06.06.2018.
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата: <ol style="list-style-type: none"><li>1. Проф. др Нела Ђонових ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хигијена и екологија, председник;</li><li>2. Проф. др Бранислава Коцић, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Нишу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан;</li><li>3. Проф. др Горан Бабић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Гинекологија и акушерство, члан.</li></ol>
Комисија за оцену и одбрану докторске/уметничке дисертације: <ol style="list-style-type: none"><li>1. Проф. др Марина Костић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Фармакологија и токсикологије, председник;</li><li>2. Проф. др Бранислава Коцић, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Нишу, за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан;</li><li>3. Проф. др Горан Бабић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Гинекологија и акушерство, члан.</li></ol>
Датум одбране дисертације:

## САЖЕТАК

*C. trachomatis* је најчешћа сексуално преносива бактеријска инфекција у свету. Процењује се да хламидија сексуалним путем инфицира преко 100 милиона људи сваке године широм света. Акутне инфекције доњег гениталног тракта изазване *C. trachomatis* (уретритис код мушкараца, цервититис и уретритис код жена) су углавном асимптоматске те стога инфекције најчешће пролазе недијагностиковане и нелечене, а као последица тога код 20%-40% случајева инфекција се шири у горњи генитални тракт. У горњем гениталном тракту, и поред активације имунолошких механизма одбране, хламидије успевају да опстану захваљујући својој изузетној способности избегавања имунског одговора домаћина, што може довести до озбиљних оштећења и компликација везаних за репродуктивно здравље жена.

Асимптоматска природа инфекције као и специфичан развојни циклус хламидија представљају прави изазов за постављање дијагнозе акутне хламидијалне инфекције. За успешну дијагнозу хламидијалних инфекција неопходно је направити добар одабир теста који обезбеђује високу сензитивност и специфичност, али и брзину извођења теста, што су по препорукама европског и америчког центра за контролу болести свакако тестови амплификације нуклеинских киселина. Данас је доступан већи број комерцијалних PCR и RT-PCR тестова које карактерише висока сензитивност и специфичност. Међутим, висока цена економских трошкова ових тестова, уз техничку комплексност везану за простор, кадар и опрему, условили су да је за већину дијагностичких лабораторија у земљама са нижим приходима овај стандард недостижан. Тако је у избору оптималног дијагностичког приступа неопходно одабрати тест који има задовољавајуће, не само дијагностичке, већ и економске перформансе. Основни циљ овог истраживања је утврђивање дијагностичке ефикасности четири појединачна теста (DIF, VT, IgA и IgG), као и комбинације поменутих тестова, у односу на RT-PCR методу која представља златни стандард за постављање дијагнозе акутне хламидијалне инфекције. Поред испитивања дијагностичке ефикасности студија пружа увид и у економску анализу поменутих тестова у односу на RT-PCR методу.

Резултати наше студије указују на слабо слагање резултата добијених помоћу златног стандарда (RT-PCR) са резултатима добијеним употребом скрининг тестова (DIF,

BT, IgA и IgG). Од свих анализираних тестова најбоље слагање у односу на златни стандард показује брзи тест латералне хроматографије (BT). Комбинацијом тестова по критеријуму „позитивна два или више теста“ и „позитиван било који тест“ нисмо поправили слагањерезултата у односу на појединачне скрининг тестове.

Анализирајући дијагностичку ефикасност појединачних скрининг тестова утврдили смо да BT повећани анализираних параметара показује најбољу дијагностичку ефикасност, док тест директне имунофлуоресценције и серумски ниво IgA и IgG антитела, у односу на BT, показују боље уравнотежен однос сензитивности и специфичности. Комбинацијом тестова по критеријуму „позитивна два или више теста“ и „позитиван било који тест“ нисмо успели да поправимо дијагностичку ефикасносту односу на појединачне скрининг тестове, односно BT који је појединачно имао најбоље параметре дијагностичке ефикасности. Сходно томе, ове комбинације тестова се не могу препоручити за дијагнозу акутне хламидијалне инфекције. Ипак, комбинација DIF/IgA (позитиван било који тест) која показује добро избалансиран однос сензитивности и специфичности уз супериорну сензитивност од 100% те се и поред ниске позитивне предиктивне вредности може користити у ситуацијама које захтевају високу сензитивност. Интересантан податак је да смо ROC анализом серумског нивоа IgA и IgG антитела на хламидијални MOMP антиген и одређивањем нових *cut-off* вредности (на основу карактеристика ROC криве) поправили дијагностичку ефикасност ових тестова у односу на резултате добијене на основу *cut-off* вредности препоручених од стране произвођача теста. Исто можемо да кажемо и за обе групе комбинација IgA+IgG теста (позитивна оба теста) и комбинације IgA/IgG (позитиван било који тест).

Економска анализа указује да су, за дати сценарио, најмањи укупни трошкови по пацијенту код коришћења брзог теста, те је стога примена овог теста доминантна економска стратегија, а прве алтернативе су серолошке методе. Примена комбинације тестова није исплатива економска стратегија јер су укупни трошкови по пацијенту већи од трошкова примене појединачних тестова. Имајући у виду претходну анализу дијагностичке ефикасности комбинованих тестова, таквом праксом се једино увећавају трошкови анализе, без битно унапређених дијагностичких перформанси. Иако су дијагностичке перформансе свих тестова, како појединачних, тако и комбинованих, у

односу на PCR методу знатно слабије, њена висока почетна цена, у условима трошкова националног здравственог система, не може да се компензује бољим дијагностичким резултатима у укупном економском профилу датог сценарија.

## ABSTRACT

*C. trachomatis* is the most common sexually transmitted bacterial infection in the world. It is estimated that chlamydia sexually infects more than 100 million people every year worldwide. Acute infections of the lower genital tract caused by *C. trachomatis* (urethritis in men, cervicitis and urethritis in women) are mostly asymptomatic, and therefore infections commonly passed undiagnosed and untreated. As a consequence, in 20% -40% of cases, the infection spreads to the upper genital tract. Despite the activation of immune defense mechanisms in the upper genital tract, chlamydia is able to survive owing to its remarkable ability to avoid the host immune response, which can lead to serious damage and complications related to the reproductive health of women.

The asymptomatic nature of the infection as well as the specific developmental cycle of chlamydia is a real challenge for establishing the diagnosis of an acute chlamydial infection. For a successful diagnosis of chlamydial infections it is necessary to make a good selection of the test which provides high sensitivity and specificity, as well as the speed of the test, which, according to the recommendations of the European and American Center for Disease Control, are certainly nucleic acid amplification tests. A number of commercial PCR and RT-PCR tests are available today, characterized by high sensitivity and specificity. However, the high price of the economic costs of these tests, with the technical complexity of space, personnel and equipment, has made it uncertain for the most diagnostic laboratories in low-income countries. In the selection of an optimal diagnostic approach, it is necessary to select a test that has satisfactory, not only diagnostic, but also the economic performances. The main objective of this study is to determine the diagnostic efficacy of four individual tests (DIF, BT, IgA and IgG), as well as combinations of these tests in relation to the RT-PCR method, which represents the golden standard for diagnosing an acute chlamydial infection. In addition to testing the diagnostic efficiency, the study provides an insight into the economic analysis of the tests mentioned above in relation to the RT-PCR method.

The results of our study indicate poor agreement between the results obtained by using the screening tests (DIF, BT, IgA and IgG) in relation to the golden standard (RT-PCR). Of the all analyzed tests, the best matching in relation to the golden standard shows a rapid test of the lateral chromatography (RT). We did not correct the matching of the results in relation to the

individual screening tests by combining the tests with the criteria "positive two or more tests" and "positive any test".

Analyzing the diagnostic efficiency of individual screening tests, we have established that RT shows the best diagnostic efficacy in most of the analyzed parameters, while the direct immunofluorescence test and serum IgA and IgG antibody levels in comparison to RT show a more balanced relation of sensitivity and specificity. By combining the tests using the criteria "positive two or more tests" and "positive any test", we were unable to improve the diagnostic efficiency in relation to individual screening tests that is RT, which individually had the best parameters of diagnostic efficiency. Consequently, these test combinations cannot be recommended for the diagnosis of an acute chlamydial infection. However, the combination of DIF/IgA (positive any test) that shows a well balanced sensitivity and specificity ratio with superior sensitivity of 100%, and despite a low positive predictive value, can be used in situations requiring high sensitivity. An interesting fact is that the ROC analysis of the serum IgA and IgG antibody levels to the chlamydial MOMR antigen and the determination of new cut-offs (based on the characteristics of the ROC curve) corrected the diagnostic efficacy of these tests in relation to the results obtained from the cut-off values recommended by the test manufacturers. The same can be said for both groups of combination IgA + IgG test (positive both tests) and IgA / IgG combinations (positive any test).

Economic analysis indicates that for the given scenario, the lowest total cost per patient is in the use of a rapid test, and therefore the application of this test is the dominant economic strategy, and the first alternatives are serological methods. Using a combination of tests is not a cost-effective economic strategy because the total cost per patient is greater than the cost of using individual tests. Taking into account the previous analysis of the diagnostic efficiency of combined tests, such practice only increases the cost of analysis, without significantly improved diagnostic performance. Although the diagnostic performances of all the tests, both individual and combined are considerably lower compared to the PCR method, its high starting price, in the terms of costs of the national healthcare system, cannot be compensated for better diagnostic results in the overall economic profile of the given scenario.

## **ЗАХВАЛНИЦА**

*Срдечно се захваљујем, свом ментору доц. др Марији Шорак на помоћи, саветима и подршци у сваком тренутку као и на изузетној сарадњи током израде ове докторске дисертације.*

*Посебну и неизмерну захвалност упућујем проф. др Дејану Баскићу, дивној особи и стручњаку, на великом залагању, подршци и помоћи приликом реализације рада.*

*Захваљујем се проф. др Драгану Миловановићу на несебичном преношењу својих искустава и знања око израде Економске анализе дисертације. Такође, захвалност дујем и свим запосленима на Институту за јавно здравље у Крајевцу на колегијалности током спровођења студије.*

*Велику захвалност дујем свом суругоу Ненаду, свекру и свекрви на помоћи, разумевању и подршци све ове године.*

*Својим децама Димитрију, Слободану и Војину поред захвалности дујем и извињење за све пропуштене прилике и непрочитане приче...*

***Својој породици, тајци  
и усмени на оца***



# САДРЖАЈ

САДРЖАЈ .....	1
ЛИСТА СКРАЋЕНИЦА .....	7
<b>1. УВОД.....</b>	<b>9</b>
<b>1.1. Основне карактеристике <i>C. trachomatis</i> .....</b>	<b>9</b>
1.1.1. Морфологија <i>C. trachomatis</i> .....	9
1.1.2. Класификација <i>C. Trachomatis</i> на биотипове и серотипове .....	12
1.1.3. Развојни циклус <i>C. Trachomatis</i> .....	12
1.1.4. Перзистентна хламидијална инфекција.....	14
<b>1.2. Патогенеза хламидијалне инфекције .....</b>	<b>15</b>
1.2.1. Целуларни модел патогенезе.....	16
1.2.2. Имунолошки модел патогенезе.....	17
<b>1.3. Епидемиолошки трендови хламидијалне инфекције.....</b>	<b>20</b>
1.3.1. Епидемиологија хламидијалне инфекције у Сједињеним Америчким Државама...21	
1.3.2. Епидемиологија хламидијалне инфекције у Европи.....22	
1.3.3. Епидемиологија хламидијалне инфекције у Србији .....	22
<b>1.4. Клиничке манифестације и компликације хламидијалне инфекције.....</b>	<b>23</b>
1.4.1. Инфекција код жена .....	23
1.4.2. Инфекција код жена за време трудноће .....	24
1.4.3. Постпарталне и неонаталне инфекције .....	24
1.4.4. Инфекције код мушкараца.....	24
<b>1.5. Тестови за дијагнозу хламидијалне инфекције .....</b>	<b>25</b>
1.5.1. Култура ћелија као референтни метод .....	27
1.5.2. Детекција антигена.....	28
1.5.2.1. Тести директне имунофлуоресценције (DIF) .....	29
1.5.2.2. Брзи имунохроматографски тестови (BT) .....	30
1.5.3. Детекција антитела.....	30
1.5.3.1. Детекција серумског нивоа IgA и IgG антитела .....	31
1.5.4. RT PCR.....	32
<b>1.6. Препоруке CDC и ECDC за дијагнозу акутне хламидијалне инфекције .....</b>	<b>34</b>

<b>2. ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ СТУДИЈЕ .....</b>	<b>35</b>
<b>3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ .....</b>	<b>37</b>
<b>3.1. Популација која се истражује .....</b>	<b>37</b>
<b>3.2. Узорковање .....</b>	<b>37</b>
<b>3.3. Скрининг тестови.....</b>	<b>39</b>
3.3.1. Тест директне имунофлуоресценције за квалитативно одређивање хламидијалних антигена (DIF).....	39
3.3.2. Брзи имунохроматографски тест за квалитативно одређивање хламидијалних антигена.....	40
3.3.3. Одређивање серумског нивоа антитела на хламидијални MOMP антиген .....	42
<b>3.4. Дијагностички тест RT-PCR .....</b>	<b>44</b>
3.4.1. Припрема узорака и реагенаса .....	44
3.4.2. Протокол.....	45
3.4.3. Амплификација.....	46
3.4.4. Анализа података.....	46
3.4.5. Интерпретација резултата.....	46
<b>3.5. Економска анализа.....</b>	<b>48</b>
<b>3.6. Статистичка обрада података.....</b>	<b>49</b>
<b>4. РЕЗУЛТАТИ.....</b>	<b>52</b>
<b>4.1. Слагање резултата RT-PCR теста за детекцију <i>C. trachomatis</i> са резултатима добијеним употребом других дијагностичких тестова (DIF, VT, ELISA).....</b>	<b>52</b>
4.1.1. Слагање резултата RT-PCR теста за детекцију <i>C. trachomatis</i> са резултатима добијеним употребом тестова за детекцију хламидијалних антигена (DIF, VT) .....	53
4.1.2. Слагање резултата RT-PCR теста за детекцију <i>C. trachomatis</i> са резултатима добијеним употребом ELISA тестова за детекцију серумског нивоа IgA i IgG антитела на хламидијални MOMP антиген.....	56
4.1.3. Слагање резултата RT-PCR теста за детекцију <i>C. trachomatis</i> са резултатима добијеним комбинацијом тестова – позитивна два или више теста, позитиван било који тест .....	59
4.1.3.1. Слагање резултата RT-PCR теста за детекцију <i>C. trachomatis</i> са резултатима добијеним комбинацијом тестова – позитивна два или више тестова .....	60

4.1.3.2. Слањање резултата RT-PCR шесћа за детекцију <i>C. trachomatis</i> са резултатима добијеним комбинацијом шесћова – позитиван било који шесћ .....	64
<b>4.2. Дијагностичка ефикасност тестова .....</b>	<b>68</b>
4.2.1. Дијагностичка ефикасност појединачних тестова (DIF, BT, ELISA).....	68
4.2.2. Дијагностичка ефикасност комбинације тестова - „позитивна два или више теста“ ..	70
4.2.3. Дијагностичка ефикасност комбинације тестова - „позитиван било који тест“ .....	72
<b>4.3. ROC анализа серумског нивоа IgA и IgG антитела на хламидијални МOMP антиген.....</b>	<b>75</b>
<b>4.4. Економска анализа.....</b>	<b>82</b>
<b>5. ДИСКУСИЈА.....</b>	<b>87</b>
<b>6. ЗАКЉУЧЦИ .....</b>	<b>100</b>
<b>7. ЛИТЕРАТУРА.....</b>	<b>102</b>
<b>8. БИОГРАФИЈА .....</b>	<b>121</b>
<b>9. БИБЛИОГРАФИЈА .....</b>	<b>122</b>

## СПИСАК СЛИКА

<b>Слика 1.</b> Развојни циклус <i>C. trachomatis</i> (Извор: Robert C. Brunham and José Rey-Ladino. Immunology Of Chlamydia infection: Implications For A Chlamydia Trachomatis Vaccine. Nat Rev Immunol. 2005;5:149-61.) .....	13
<b>Слика 2.</b> Целуларни модел патогенезе (Извор: Toni Darville, Thomas J. Hiltke. Pathogenesis of Genital Tract Disease Due to <i>C. trachomatis</i> . J Infect Dis. 2010;15;201 Suppl 2:S114-25.).....	16
<b>Слика 3.</b> Имунолошки модел патогенезе Th1 (Извор: Toni Darville, Thomas J. Hiltke. Pathogenesis of Genital Tract Disease Due to <i>C. trachomatis</i> . J Infect Dis. 2010;15;201 Suppl 2:S114-25.) .....	17
<b>Слика 4.</b> Имунолошки модел патогенезе Treg (Извор: Toni Darville, Thomas J. Hiltke. Pathogenesis of Genital Tract Disease Due to <i>C. trachomatis</i> . J Infect Dis. 2010;15;201 Suppl 2:S114-25.) .....	18
<b>Слика 5.</b> Имунолошки модел патогенезе Th17 (Извор: Toni Darville, Thomas J. Hiltke. Pathogenesis of Genital Tract Disease Due to <i>C. trachomatis</i> . J Infect Dis. 2010;15;201 Suppl 2:S114-25.) .....	19
<b>Слика 6</b> Тест директне имуофлуоресценције за квалитативно одређивање хламидијалних антигена – позитиван налаз .....	40

<b>Слика 7</b> Брзи имунохорматографски тест за квалитативно одреживање хламидијалних антигена: А – позитиван налаз; Б – негативан налаз .....	41
<b>Слика 8.</b> Одређивање серумског нивоа антитела на хламидијални МОМР антиген (ELISA): Колона IgA, ред А - негативна контрола, ред В – позитивна контрола, ред С – <i>Cut-off</i> , ред D – негативан налаз, ред Е – позитиван налаз; Колона IgG, ред А – стандард 1, ред В – стандард 2, ред С – стандард 3, ред D – негативан налаз, ред Е – позитиван налаз.....	43
<b>Слика 9.</b> RT PCR тест – квалитативно откривање ДНК <i>C. trachomatis</i> позитиван налаз – Ct вредност присутна на FAM каналу.....	47

## СПИСАК ГРАФИКОНА

<b>Графикон 1.</b> Упоредни резултати тестова за детекцију <i>C. trachomatis</i> .....	52
<b>Графикон 2.</b> Слагање резултата RT-PCR теста за детекцију <i>C. trachomatis</i> са резултатима добијеним тестом директне имунофлуоресценције .....	54
<b>Графикон 3.</b> Слагање резултата RT-PCR теста за детекцију <i>C. trachomatis</i> са резултатима добијеним брзим тестом.....	55
<b>Графикон 4.</b> Слагање резултата RT-PCR теста за детекцију <i>C. trachomatis</i> са резултатима добијеним употребом ELISA теста за детекцију серумског нивоа IgA антитела на хламидијални МОМР антиген .....	57
<b>Графикон 5.</b> Слагање резултата RT-PCR теста за детекцију <i>C. trachomatis</i> са резултатима добијеним употребом ELISA теста за детекцију серумског нивоа IgG антитела на хламидијални МОМР антиген .....	58
<b>Графикон 6.</b> Слагање резултата RT-PCR теста за детекцију <i>C. trachomatis</i> са резултатима добијеним комбинацијом „позитивна два или више теста“....	61
<b>Графикон 7.</b> Слагање резултата RT-PCR теста за детекцију <i>C. trachomatis</i> са резултатима добијеним комбинацијом „позитивна два или више теста“....	63
<b>Графикон 8.</b> Слагање резултата RT-PCR теста за детекцију <i>C. trachomatis</i> са резултатима добијеним комбинацијом „позитиван било који тест“.....	65
<b>Графикон 9.</b> Слагање резултата RT-PCR теста за детекцију <i>C. trachomatis</i> са резултатима добијеним комбинацијом „позитиван било који тест“.....	67
<b>Графикон 10.</b> ROC крива серумског нивоа IgA антитела на хламидијални МОМР антиген .....	76
<b>Графикон 11.</b> ROC крива серумског нивоа IgG антитела на хламидијални МОМР антиген .....	78

## СПИСАК ШЕМА

<b>Шема 1.</b> Сценарио дијагностике и лечења хламидијалне инфекције генитуорунарног тракта у условима рутинске клиничке праксе у примарној здравственој заштити .....	48
--	----

## СПИСАК ТАБЕЛА

<b>Табела 1.</b> Формуле за израчунавање параметара дијагностичке ефикасности.....	50
<b>Табела 2.</b> Слагање резултата RT-PCR теста за детекцију <i>C. trachomatis</i> са резултатима добијеним тестом директне имуофлуоресценције .....	55
<b>Табела 3.</b> Слагање резултата RT-PCR теста за детекцију <i>C. trachomatis</i> са резултатима добијеним брзим тестом.....	56
<b>Табела 4.</b> Слагање резултата RT-PCR теста за детекцију <i>C. trachomatis</i> са резултатима добијеним употребом ELISA теста за детекцију серумског нивоа IgA антитела на хламидијални MOMP антиген .....	58
<b>Табела 5.</b> Слагање резултата RT-PCR теста за детекцију <i>C. trachomatis</i> са резултатима добијеним употребом ELISA теста за детекцију серумског нивоа IgG антитела на хламидијални MOMP антиген .....	59
<b>Табела 6.</b> Слагање резултата RT-PCR теста за детекцију <i>C. trachomatis</i> са резултатима добијеним комбинацијом „позитивна два или више теста“ .....	62
<b>Табела 7.</b> Слагање резултата RT-PCR теста за детекцију <i>C. trachomatis</i> са резултатима добијеним комбинацијом „позитивна два или више теста“ .....	64
<b>Табела 8.</b> Слагање резултата RT-PCR теста за детекцију <i>C. trachomatis</i> са резултатима добијеним комбинацијом „позитивн било који тест“ .....	66
<b>Табела 9.</b> Слагање резултата RT-PCR теста за детекцију <i>C. trachomatis</i> са резултатима добијеним комбинацијом „позитивн било који тест“ .....	68
<b>Табела 10.</b> Дијагностичка ефикасност појединачних тестова (DIF, BT, ELISA) за детекцију <i>C. trachomatis</i> .....	69
<b>Табела 11.</b> Дијагностичка ефикасност комбинације тестова „позитивна два или више теста“ за детекцију <i>C. trachomatis</i> .....	71
<b>Табела 12.</b> Дијагностичка ефикасност комбинације тестова "позитиван било кој тест" за детекцију <i>C. trachomatis</i> .....	73
<b>Табела 13.</b> Упоредна анализа резултата тестова слагања и параметара дијагностичке ефикасности појединачних тестова и комбинација тестова „позитивна два или више теста“, позитиван било који тест.....	75
<b>Табела 14.</b> Дијагностичка ефикасност IgA антитела на хламидијални MOMP антиген на основу Cut- off вредности препоручених од стране произвођача теста .....	77

<b>Табела 15.</b>	Дијагностичка ефикасност IgA антитела на хламидијални МOMP антиген на основу <i>Cut- off</i> вредности дефинисаних ROC анализом.....	77
<b>Табела 16.</b>	Дијагностичка ефикасност IgG антитела на хламидијални МOMP антиген на основу <i>Cut- off</i> вредности препоручених од стране произвођача теста .....	79
<b>Табела 17.</b>	Дијагностичка ефикасност IgG антитела на хламидијални МOMP антиген на основу <i>Cut- off</i> вредности дефинисаних ROC анализом .....	79
<b>Табела 18.</b>	Дијагностичка ефикасност IgA+IgG (позитивна оба теста) антитела на хламидијални МOMP антиген на основу <i>Cut-off</i> вредности препоручених од стране произвођача теста .....	80
<b>Табела 19.</b>	Дијагностичка ефикасност IgA+IgG (позитивна оба теста) антитела на хламидијални МOMP антиген на основу <i>Cut-off</i> вредности дефинисаних ROC анализом.....	80
<b>Табела 20.</b>	Дијагностичка ефикасност IgA/IgG (позитиван било који тест) антитела на хламидијални МOMP антиген на основу <i>Cut-off</i> вредности препоручених од стране произвођача теста .....	81
<b>Табела 21.</b>	Дијагностичка ефикасност IgA/IgG (позитиван било који тест) антитела на хламидијални МOMP антиген на основу <i>Cut-off</i> вредности дефинисаних ROC анализом.....	81
<b>Табела 22.</b>	Економска анализа.....	83
<b>Табела 23.</b>	Анализа здравствених трошкова за иницијалну микробиолошку дијагностику и фармакотерапију циљне популације оболелих од генитоуринарне хламидијалне инфекције у Србији .....	86

## ЛИСТА СКРАЋЕНИЦА

<b>АТР</b>	Аденозин три фосфат
<b>BT</b>	брзи имунохроматографски тест
<b>C-</b>	Негативна контрола екстракције
<b>C+</b>	Позитивна контрола амплификације
<b>CHSP60</b>	Хламидијални стрес протеин од 60-kDa ( <i>ог енī. chlamydial heat shock protein - cHSP60</i> )
<b>CPAF</b>	Хламидијални протеаза/протеазом налик фактор активности ( <i>ог енī. Chlamydial protease/proteasome – like activity factor</i> )
<b>DIF</b>	Тест директне имунофлуоресценције
<b>ET</b>	Елементарно тело ( <i>ог енī. Elementary Body</i> )
<b>GAG</b>	Глукозаминогликан ( <i>Glicosaminoglycan</i> )
<b>IC</b>	Интерна контрола
<b>LCR</b>	Ланчана реакција лигазе ( <i>ог енī. ligase chain reaction</i> )
<b>LGV</b>	Лимфогранулома венерум
<b>LPS</b>	Липополисахарида
<b>MOMP</b>	Главни протеин спољашње мембране ( <i>ог енī. Major Outer Membrane Protein</i> )
<b>NAAT-s</b>	Тестови амплификације нуклеинских киселина
<b>NCA</b>	Негативна контрола амплификације
<b>NPV</b>	Негативна предиктивна вредност
<b>ORA</b>	Укупно слагање ( <i>Overall Agreement</i> )
<b>PBS</b>	Фосфатни пуфер
<b>PCR</b>	Ланчана реакција полимеризације ( <i>ог енī. polimerase chain reaction</i> )
<b>PID</b>	Пелвична инфламаторна болест ( <i>ог енī. Pelvic Inflammatory Desease</i> )
<b>Pmp</b>	Полиморфни мембрански протеини ( <i>ог енī. Polymorphic Membrane Proteins</i> )
<b>PmpD</b>	Полиморфни мембрански протеин Д ( <i>ог енī. polymorphicmembrane protein D</i> )

<b>PorB</b>	Порински протеин Б
<b>PPV</b>	Позитивна предиктивна вредост
<b>RC1</b>	Chlamydia cell реагенс
<b>RMF</b>	Течност за фиксирање
<b>ROC</b>	(Receiver Operating Characteristic Curve)
<b>RT</b>	Ретикуларно тело ( <i>ог енī. Reticulate Body</i> )
<b>RT PCR</b>	Ланчана реакција полимеризације у реалном времену ( <i>ог енī. Real Time Polimerase Chain Reaction</i> )
<b>SDA</b>	Изотермална амплификација заменом ланаца ( <i>ог енī. strand displacement amplification</i> )
<b>TARP</b>	Транслосирајући актин регрутујући фосфопротеин ( <i>ог енī. Translocated Aaactin-recruiting Phosphoprotein</i> )
<b>TFI</b>	Тубарни фактор инфертилитета
<b>TMA</b>	Транскрипцијом посредована амплификација ( <i>ог енī. transcription-mediated amplification</i> )
<b>TMB</b>	Тетраметилбензидин
<b>TTSS</b>	Секрециони систем тип III ( <i>ог енī. Type III secretion system</i> )



## 1. УВОД

Извештаји Светске здравствене организације указују на повећан број полно преносивих бактеријских инфекција широм света у последњих неколико година, при чему је *Chlamydia trachomatis* један од водећих патогена. Инфекција углавном погађа младе сексуално активне особе. Фактори ризика укључују већи број сексуалних партнера, као и незаштићене сексуалне односе. Циљне ћелије гениталних сојева *C. trachomatis* (серотипови D-K) су цилиндричне епителне ћелије ендоцервикса код жена и уретре код мушкараца. У доњем гениталном тракту жена инфекција је најчешће асимптоматска (70% - 90%) и последично недијагностикована и нелечена. Код великог броја инфицираних жена инфекција се завршава спонтаном резолуцијом, док се код 20 - 40% случајева инфекција шири у горњи генитални тракт доводећи до озбиљних оштећења и компликација везаних за репродуктивно здравље жена. Код мушкараца хламидијална инфекција је главни узрок уретритиса, а код млађих мушкараца уретритис може бити компликован појавом акутног епидидимитиса. Асимптоматска природа инфекције као и специфичан развојни циклус хламидија представљају прави изазов за постављање дијагнозе акутне хламидијалне инфекције. У последњих тридесет година остварен је значајан напредак на пољу дијагностиковања хламидијалне инфекције. Вишеструке опције лабораторијског тестирања могу бити коришћене у детекцији *C. trachomatis*, мада неке не могу бити препоручене за рутинску употребу. Према препорукама америчког и европског центра за контролу болести, тестови амплификације нуклеинских киселина су примарне дијагностичке методе хламидијалне инфекције.

### 1.1. Основне карактеристике *C. trachomatis*

#### 1.1.1. Морфологија *C. trachomatis*

*C. Trachomatis* је мала (0,25 $\mu$ m- 0,8 $\mu$ m у пречнику)облигатна интрацелуларна Грам негативна бактерија која не може да се гаји на вештачкој подлози, већ искључиво у еукариотским ћелијама (1). Паразитира на епителним ћелијама и користи хранљиве материје домаћна. Ове бактерије су ауксотрофичне и не могу да синтетишу неколико аминокиселина, због чега користе АТФ (аденозин три фосфат) домаћина па се називају и

„енергетским паразитима“. Процесом гликолизе хламидије производе ограничену количину АТР, али њихов геном садржи два одвојена локуса за производњу АТР/АДР која су транслоцирана тако да преузимају АТР од домаћина како би обезбедиле довољну количину енергије за своје синтетске и метаболичке потребе (2).

*C. Trachomatis* поседује спољашњу мембрану која садржи липополисахарид, као и цитоплазматску мембрану. Липополисахарид је сличан липополисахариду других Грам негативних бактерија и специфичан је за род. Иако присуство пептидогликана (муреина) није потврђено приликом изолације и идентификације, *C. Trachomatis* је осетљива на β-лактамске антибиотике и поседује све гене за синтезу муреина и протеина који везују пеницилин (3). Испод спољашње мембране локализован је слој чија је структура аналогна пептидогликану. У спољашњој мембрани се налази главни протеин спољашње мембране (*od enl. Major Outer Membrane Protein - MOMP*), који чини 60% њене масе, површински је изложен и представља имунодоминантни антиген (4). МОМР садржи важне неутралишуће детерминанте, укључен је у Т ћелијску имуност и игра важну улогу у везивању ЕТ (елементарно тело) за еукариотску ћелију (5). МОМР кодира *ompA* ген који је под притиском селективног имунитета и антибиотика (6, 7). Обзиром да су две аминокиселинске промене довољне за имунску специфичност, долази до *ompA* разноврсности што може довести до мало другачијих протеина који мењају интеракцију ових антигена са предходно синтетисаним антителима и дозвољавају мутираном соју избегавање имунског одговора (8) због чега се ова бактерија често назива и „притајени патоген“ због изузетне способности избегавања имунског одговора домаћина. Полиморфни мембрански протеини (*od enl. Polymorphic Membrane Proteins - Pmp*) карактеристични су само за хламидије, налазе се у спољашњој мембрани и имају важну улогу у патогенези болести (9). Геном *C. Trachomatis* садржи девет *pmp* (*pmpA - pmpI*) гена који кодирају ове протеине, ови гени чине 14% кодирајућег капацитета *C. Trachomatis* (10). Током перзистенције долази до промене експресије протеина па је тако експресија МОМР–а смањена док је експресија хламидијалног стрес протеина 60-kDa (*od engl. 60-kDa chlamydial heat shock protein - cHSP60*) који има значајну улогу у дијагностици перзистентне хламидијалне инфекције повећана. Антитела на cHSP60 доказана су код жена са пелвичном инфламаторном болешћу (11, 12) и код жена са тубалним фактором инфертилитета (13). Хламидије поседују и секретциони систем типа III (*od enl. Type III*

*secretion system – TTSS*) који испоручује ефекторне протеине патогена у ћелију домаћина након њиховог контакта (14). Путем овог система, елементарно тело секретује TARP протеин (*ог енл. Translocated Aaactin-recruiting Phosphoprotein - TARP*) који улази у ћелију домаћина доводећи до везивања и обнављања актина и реаранжирања цитоскелета што олакшава инвазију ћелија (15). Порински протеин Б (PorB) је такође површински изложен молекул спољашње мембране, који поред поринске улоге снажно индукује хуморални имунски одговор (16). Хламидијални протеаза/протеазом налик фактор активности (*ог енл. Chlamydial protease/proteasome – like activity factor – CPAF*) омогућава експанзију али и стабилност инклузије (17). Овај ефекторни протеин разградњом протеина који региструју стресни сигнал у ћелији одлаже апоптозу еукариотске ћелије домаћина како би се завршио развојни циклус хламидије (18).

Раст хламидија у циљним епителним ћелијама се одликује јединственим двофазним развојним циклусом. Јавља се у два морфолошки различита облика који представљају вид адаптације на различите услове живота, елементарно тело (*ог енл. Elementary Body - ET*) и ретикуларно тело (*ог енл. Reticulate Body - RT*).

ЕТ је инфективна екстрацелуларна форма одговорна за везивање хламидије за ћелију домаћина и успостављање инфекције. Инфекција се покреће адхезијом ЕТ за апикалну површину епителних ћелија урогениталног система, а затим следи њихов улазак у ћелију који може бити посредован рецепторима. Метаболички је инактивно. Ћелијски зид ЕТ је масиван и ригидан. Између протеина спољашње мембране образују се дисулфидни мостићи који ЕТ обезбеђују ригидност, али и осмотску стабилност а самим тим и отпорност на екстрацелуларне услове живота. ЕТ има једнаке количине ДНК и РНК.

РТ је метаболички активна неинфективна форма бактерије. Осмотски је осетљиво и не може опстати ван инклузије нити се може везати за епителне ћелије. Прилагођено је интраћелијском преживљавању и умножавању бактерије. Овалног је облика танког ћелијског зида који нема чврстину, али има добру пермеабилност. Има три пута више молекула РНК у поређењу са ДНК молекулом (19, 20).

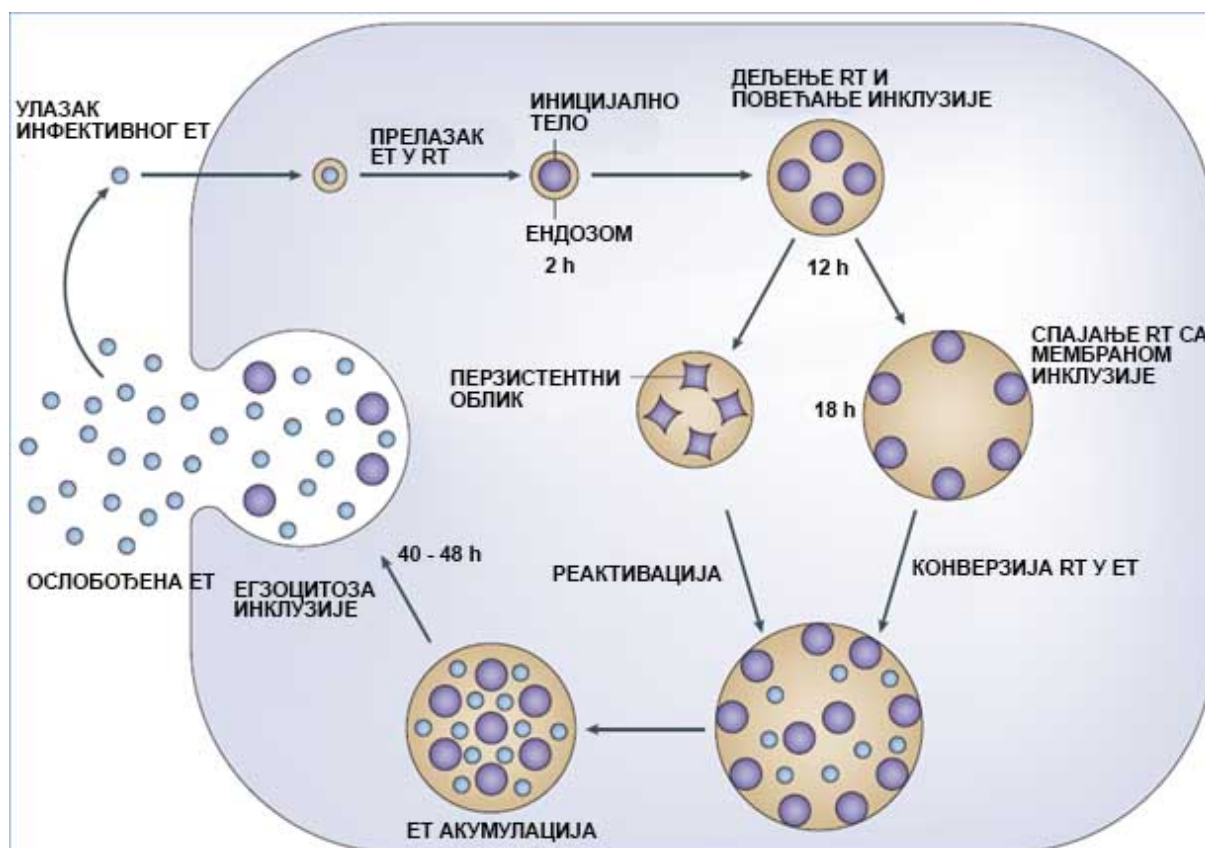
### 1.1.2. Класификација *C. Trachomatis* на биотипове и серотипове

На основу биолошких карактеристика, *C. Trachomatis* се дели на два биотипа и то на: трахомни и лимфогранулома венерум (LGV) (21). На основу антигенске разноврсности МOMP-а који садржи четири варијабилна сегмента и пет константних сегмената, трахомни и LGV биотипови се деле на деветнаест серотипова (22). Серотипови од А-С (А, В, Ва и С) су повезани са трахомом који је водећи узрок оштећења вида на глобалном нивоу. Активни трахом карактерише присуство лимфоидних фоликула у коњунктивама. Слепило се углавном јавља код одраслих особа што је резултат формирања ожиљног ткива у коњунктивама које изазива абразију корнее. *C. Trachomatis* серотипови D-K (D, Da, E, F, G, H, I, Ia, J и K) су водећи бактеријски узрочници полно преносивих болести. Код мушкараца узрокују негонококални уретритис и епидидимитис, код жена цервицитис, ендометритис, салпингитис, а Рајтеров синдром и код мушкараца и код жена (23). Лимфогранулома венерум биотип обухвата серотипове од L1-L3 (L1, L2, L2a, L2b и L3) генетски су слични серотиповима *C. Trachomatis* D-K, такође изазивају полно преносиву болест али са различитим клиничким манифестацијама. LGV изазива инвазивну болест пре свега лимфних чворова и субмукозе (24).

### 1.1.3. Развојни циклус *C. Trachomatis*

*Chlamydia trachomatis* инфицира ћелије домаћина како би се реплицирала. Циљне ћелије гениталних серотипова *C. Trachomatis* су епителне ћелије урогениталног тракта, цилиндричне епителне ћелије као и ћелије прелазног епитела ендоцервикса. Рецептори на ћелијама домаћина су: естрогенски рецептори, хепарин сулфатни рецептори рецептори за манозу и рецептори за манозу-6-фосфат (25). Карактеристичан развојни циклус почиње адхезијом ЕТ за апикалну површину епителних ћелија урогениталног тракта, након чега следи улазак у ћелију посредством ендофагоцитозе, пиноцитозе или ендоцитозе посредоване рецепторима. Велики број хламидијалних молекула има улогу адхезина као што је МOMP (26), глукозаминогликан (*og enī. Glicosaminoglycan – GAG*) (27), полиморфни мембрански протеин Д (*og enīl. polymorphic membrane protein D – PmpD*) (28) и други. Након везивања адхезина за рецептор на ћелији ЕТ преко секретивног система тип III у ћелијску мембрану епителне ћелије излучује транслоцирајући актин регрутујући

фосфопротеин који има важну улогу у актинском ремоделирању и цитоскелетном преуређивању које олакшава инвазију ћелија (29).



Слика 1. Развојни циклус *C. trachomatis* (Извор: Robert C. Brunham and José Rey-Ladino. Immunology Of Chlamydia infection: Implications For A Chlamydia Trachomatis Vaccine. Nat Rev Immunol. 2005;5:149-61.)

Новонастале везикуле која садрже ЕТ избегавају фузију са лизозомима (30), стварају повољно интрацелуларно окружење за репликацију и развиће. Везикуле се транспортују до перинуклеарног региона у близини Голџијевог апарата (31). Како би се обезбедили потребни есенцијални фактори за даљи развој инклузија се спаја са везикулама које садрже сфинголипиде, холестерол, и глицеролфосфолипиде (32, 33, 34). У ЕТ се дешавају промене, долази до редукције дисулфидних веза, ЕТ губи ригидност, долази до декондезације хромозома и до транскрипционе активности генома (35, 36). ЕТ почиње да секретује гликоген и трансформише се у метаболички активну и неинфективну форму, ретикуларно тело. RT се дели бинарном деобом на свака 2-3h, при чему долази до експанзије инклузија које могу садржати и до 1000 RT (37). RT су осмотски осетљива, не могу да преживе изван инклузија нити се могу везати за епителне ћелије, тако да би се

овај инфективни процес окончао неопходна је конверзија RT у инфективна ET. Када се развојни циклус заврши, зрела ET се ослобађају преко два различита механизма. Први механизам обухвата ћелије које су лизирани дигестивним протеазама које разарају ћелије и читав садржај инклузије бива ослобођен. У другом случају ET се ослобађају процесом егзоцитозе уз нетакнуту инклузију и без ћелијске смрти. (Слика 1.)

Након ослобађања садржаја инклузије, може доћи до некрозе или апоптозе. Разлика је веома важна, зато што некроза изазива нежељени инфламаторни одговор који може да доведе до фиброзе и болести, док код апоптозе, остаци ћелијског садржаја остају у апоптотском телу, које се ослобађа и бива фагоцитирано од стране других ћелија.

У неком тренутку током развића, репликација хламидија може бити заустављена преласком RT у аберантне форме које се налазе у стационарној фази. Аберантно, нерепликативно RT је морфолошки измењено, увећано, транскрипционо активно, али показује мањи степен метаболичке активности. Присуство ових аберантних, нерепликативних, али вијабилних перзистентних форми условљава низак степен хроничне инфламације што за последицу може имати дуготрајне секвеле.

#### **1.1.4. Перзистентна хламидијална инфекција**

Акутне инфекције доњег гениталног тракта изазване *C. trachomatis* су углавном асимптоматске, те стога инфекције најчешће пролазе недијагностиковане и последично нелечене. Сходно томе у неких 40% случајева инфекција се узлазно шири на горњи генитални тракт уз развој перзистенције, доводећи до хроничне инфламације и компликација (38). Перзистентна хламидијална инфекција код жена може довести до озбиљних репродуктивних компликација као што су: пелвична инфламаторна болест, тубарни фактор инфертилитета и ектопична трудноћа (39). *In vitro* студије показале су да *Hella229* ћелије инфициране *C. trachomatis* развијају морфолошки аберантне инклузије као одговор на INF- $\gamma$ , излагање пеницилину или недостатак есенцијалних аминокиселина (40). Инхибиција интрацелуларног раста путем INF- $\gamma$  постиже се исцрпљивањем триптофана, које настаје индукцијом триптофан-деградирајућег ензима, индол аминокиселине диоксигеназе. Услед недостатка триптофана долазили до смрти хламидија или развоја перзистентног интрацелуларног облика који остаје вијабилан (41). Услед инхибиције

репликације имунски и инфламаторни одговори се гасе уз значајан пад концентрације INF- $\gamma$ . Као последица смањене продукције INF- $\gamma$  перзистентни облик поново прелази у репликативни облик ретикуларног тела уз следствени настанак елементарних тела што је и окидач за поновну активацију инфламације и имунског одговора (42). Управо ови наизменични циклуси доводе до настанка хроничне инфламације и последичних компликација.

Постојање перзистенције *in vivo* може бити широко распрострањено, код жена код којих је култура негативна уз изостанак клиничких манифестација. У тим случајевима многи узорци који су били негативни на култури су били позитивни на тесту амплификације нуклеинских киселина дуго након што је резидуална ДНК требала да буде отклоњена лечењем, што индиректно указује на присуство перзистентне хламидијалне инфекције. Током перзистенције, смањена је експресија липополисахрида и МOMP-а, али је повећана експресија хламидијалног стрес протеина. cHSP60 може индуковати антиген специфични имунски одговор по типу реакције касне преосетљивости. Серумска и мукозна антитела на cHSP60 доказана су код жена са пелвичном инфламаторном болешћу (43, 44) и тубарним фактором инфертилитета (45).

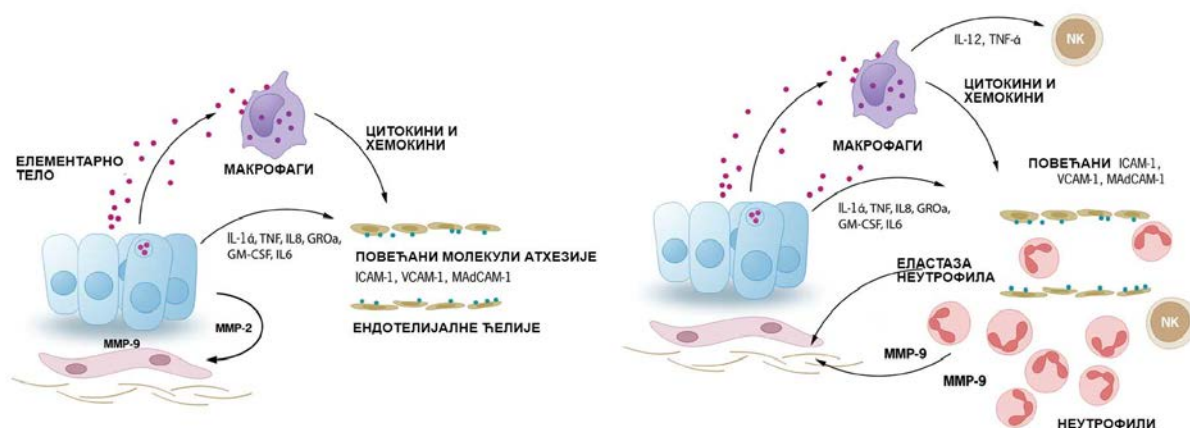
## 1.2. Патогенеза хламидијалне инфекције

Као што смо рекли, већина гениталних хламидијалних инфекција код жена је асимптоматске природе, што намеће потребу спровођења скрининга код млађих сексуално активних жена и њихових партнера. Рана дијагноза хламидијалне инфекције као и терапија, пре него што инфекција напредује до клинички значајног запаљења или оштећења јајовода, је од великог значаја и представља секундарну превенцију (47). Секундарна превенција се већ спроводи у многим земљама и очекује се смањење броја компликација и последица хламидијалне инфекције (46). Од овог програма се такође очекује смањење преношења и ширења инфекције у популацији а самим тим и смањење инциденце као и пратећих секвела (примарна превенција). Штетне последице хламидијалне инфекције се могу смањити кроз примарну и секундарну превенцију, али у великој мери зависе и од природног тока инфекције. Да ли ће доћи до спонтане резолуције инфекције или ће се развити хронична инфламација, делом зависи од патогена, а делом од самог домаћина. Када говоримо о факторима патогена који утичу на исход инфекције, пре

свега мислимо на врсту и карактеристике антигена хламидија на које имунски систем одговара и о механизмима помоћу којих хламидије успевају да избегну имунски одговор. Када је реч о домаћину мислимо на тип имунског одговора који ће се развити у току гениталне хламидијалне инфекције и одредити исход инфекције. Целуларни и имунобиолошки модели покушавају да објасне имуно-патогенетске механизме ове инфекције.

### 1.2.1. Целуларни модел патогенезе

У целуларном (ћелијском) моделу, у основи патогенезе су примарно инфламаторни процеси иницирани епителним ћелијама домаћина које су примарна мета хламидијалне инфекције.



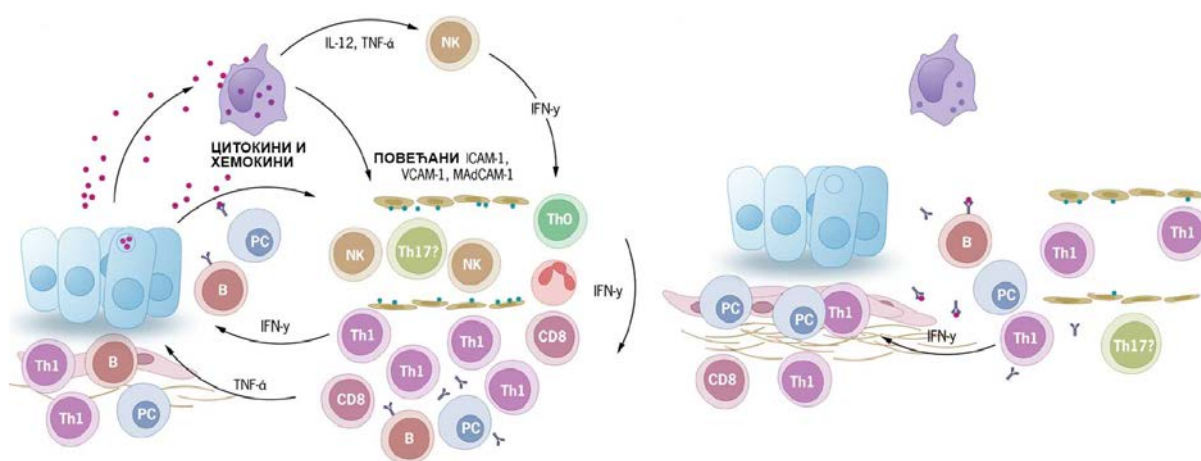
**Слика 2.** Целуларни модел патогенезе (Извор: Toni Darville, Thomas J. Hiltke. Pathogenesis of Genital Tract Disease Due to *C. trachomatis*. J Infect Dis. 2010;15;201 Suppl 2:S114-25.)

Инфициране епителне ћелије луче хемокине и цитокине, који покрећу и појачавају целуларни инфламаторни одговор. Инфламаторни медијатори настали и од ћелија домаћина и од имунских ћелија на месту запаљења изазивају директно оштећење ткива. Континуирано ослобађање медијатора запаљења током перзистентне инфекције или реинфекције могу да доведу до ћелијске пролиферације, ремоделовања ткива као и до стварања оžilног ткива (48). (Слика 2.)



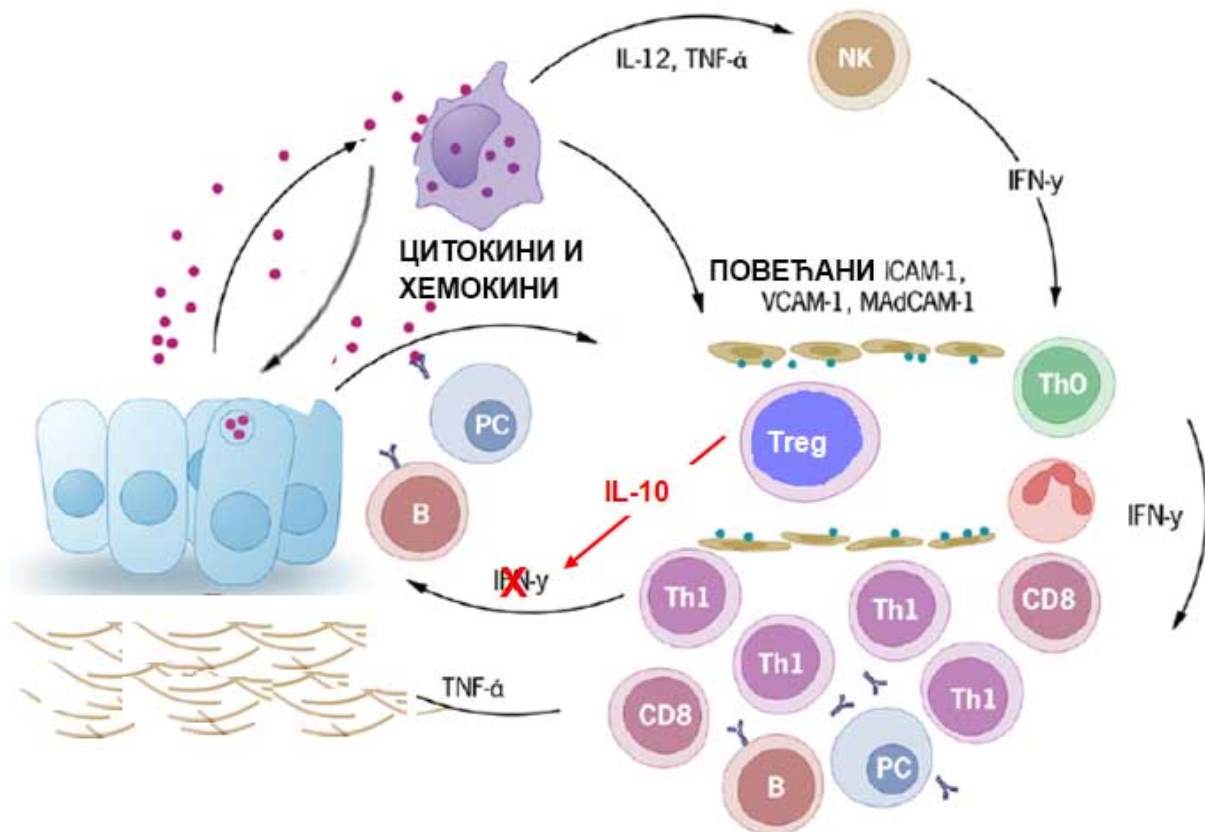
### 1.2.2. Имунолошки модел патогенезе

Патолошко оштећење репродуктивног тракта зависи од успона хламидије из цервикса у јајоводе и од типа специфичног имунског одговора који се развија у контакту са антигеном. Снажан протективни имунски одговор може да доведе до брзе резолуције инфекције на нивоу цервикса, док код перзистентних и поновљених инфекција исти тај имунски одговор може имати карактер имунопатолошког одговора на нивоу туба и одговоран је за настанак компликација. Централну улогу у отклањању хламидијалне инфекције има Th1 имунски одговор уз активацију CD4<sup>+</sup> лимфоцита који продукују INF- $\gamma$  (49). Насупрот томе, код перзистентних и поновљених инфекција дуготрајни Th1 имунски одговор је одговоран за настанак оштећења ткива, по принципу реакције касне преосетљивости за коју је одговоран хламидијални HSP60 (50, 51). (Слика 3.)



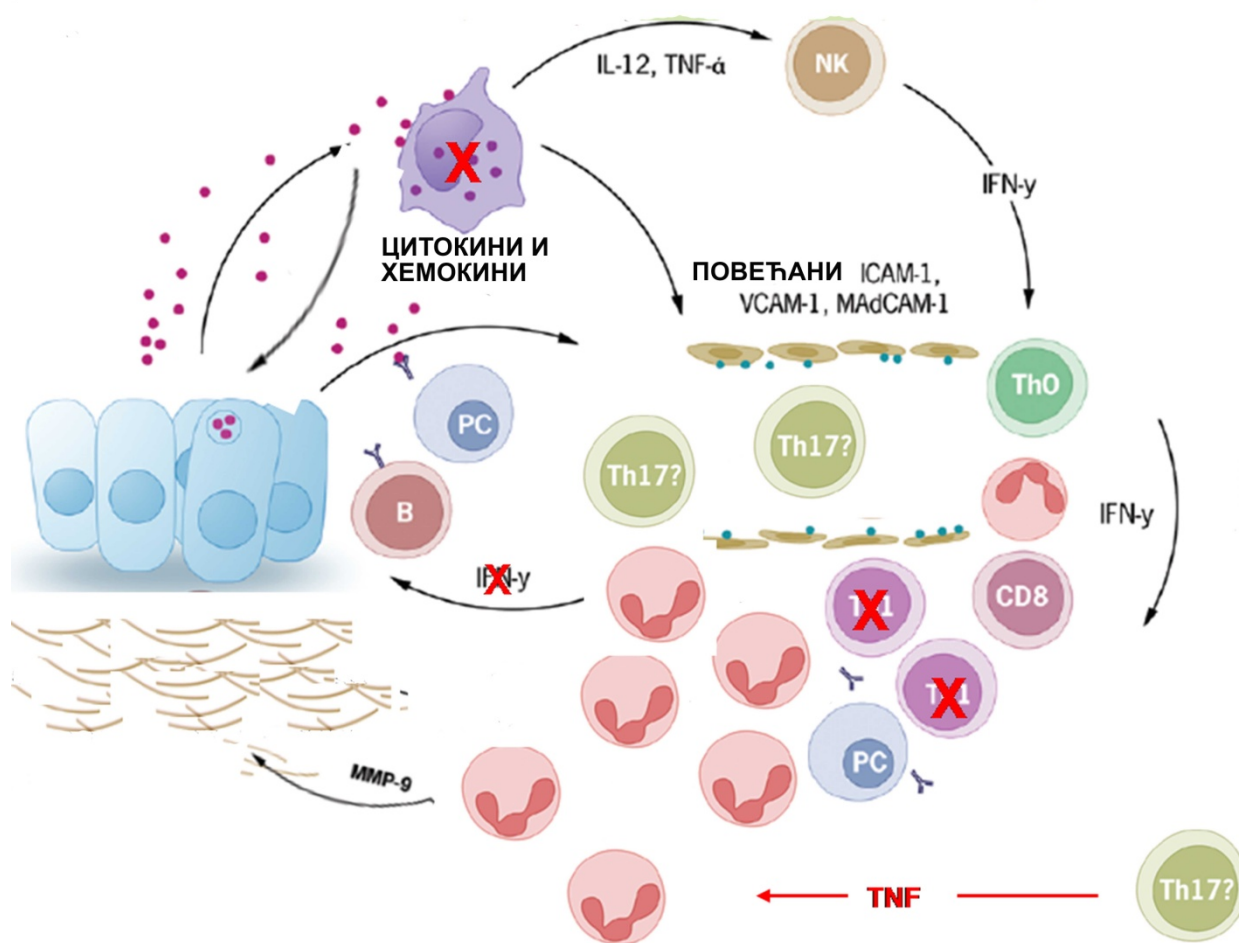
**Слика 3.** Имунолошки модел патогенезе Th1 (Извор: Toni Darville, Thomas J. Hiltke. Pathogenesis of Genital Tract Disease Due to *C. trachomatis*. J Infect Dis. 2010;15;201 Suppl 2:S114-25.)

У другом случају у раној фази инфекције може доћи до инхибиције протективног имунског одговора активацијом Т регулаторних ћелија које продукују IL-10. Овај тип имунског одговора не успева да елиминира хламидијалну инфекцију што узрокује развој перзистентне хламидијалне инфекције и хроничног инфламаторног оштећења ткива.(Слика 4.)



**Слика 4.** Имунолошки модел патогенезе Treg (Извор: Toni Darville, Thomas J. Hiltke. Pathogenesis of Genital Tract Disease Due to *C. trachomatis*. J Infect Dis. 2010;15;201 Suppl 2:S114-25.)

Трећа могућност је да CD4+ лимфоцити диферентују у правцу Th17 имунског одговора који карактерише продукција проинфламаторних цитокина и активација неутрофила, без продукције INF- $\gamma$  који је одговоран за активацију макрофага и протективног имунског одговора (52) који је заслужан за елиминацију интрацелуларних хламидија што води настанку имуно-патолошке инфламације уз оштећење ткива (53). (Слика 5.)



**Слика 5.** Имунолошки модел патогенезе Th17 (Извор: Toni Darville, Thomas J. Hiltke. Pathogenesis of Genital Tract Disease Due to *C. trachomatis*. J Infect Dis. 2010;15;201 Suppl 2:S114-25.)

На крају, један од веома битних фактора у настанку последица на репродуктивном тракту жена је и реинфекција. Реинфекција се углавном јавља као последица сероваријабилности патогена, кратког протективног имунитета и антибиотске терапије. Наиме, претпоставља се да се Th1 имунски одговор појачава са сваком наредном

поновљеном инфекцијом или у случају перзистенције услед чега долази до имунопатолошког оштећења ткива.

### 1.3. Епидемиолошки трендови хламидијалне инфекције

Инфекција *C. trachomatis* је најчешћа сексуално преносива бактеријска инфекција у свету (54). Од 1994. године хламидијална инфекција подлеже обавезном пријављивању, а од 2000. године је пријављена од већине држава (55). Инфекција погађа младе сексуално активне особе, тако да су и највише стопе случајева забележене код младих жена од 16 до 24 година. Стопа пријављених случајева код мушкараца је знатно нижа. Нижа стопа забележена код мушкараца је вероватно последица ниже стопе тестирања и откривања хламидијалне инфекције у тој поулацији, када се упореди са широким скринингом код жена (56). Даље, расна неједнакост у пријављеној стопи хламидијалне инфекције, вероватно је у вези са социјалним детерминантама здравља, као што су приступ здравственој заштити сиромашних који живе у заједницама са високом преваленцом полно преносивих болести. Фактори ризика укључују већи број сексуалних партнера, као и незаштићене сексуалне односе. Већина особа са хламидијалном инфекцијом немају симптоме који би их навели да потраже лекарску помоћ (57). Уколико остане нелечена, инфекција *C. trachomatis* код жена може да доведе до озбиљних последица на репродуктивном тракту укључујући пелвичну инфламаторну болест (*ог енгл. Pelvic Inflammatory Disease - PID*), неплодност са узроком у јајоводима као и ектопичну трудноћу (58, 59). Инфекција *C. trachomatis* током трудноће може да доведе до коњуктивитиса и пнеумоније новорођенчета, као и до постпарталног ендометритиса мајке (60). Код мушкараца хламидијална инфекција је главни узрок уретритиса, а код млађих мушкараца уретритис може бити компликован појавом акутног епидидимитиса (61). Програми превенције и контроле ослањају се на откривање и лечење инфекције, спречавање компликација и континуираног преноса, а заснованим пре свега на препоруци годишњих скрининга код младих сексуално активних жена и лечења њихових сексуалних партнера. Учесталост јављања инфекције без симптома и могућност неповољног исхода подстакла је развој и препоруку скрининга за жене. Због високе преваленце и тешких компликација, CDC (*Ог енгл. Centre for Disease Prevention and Control*) препоручује годишњи скрининг тест на хламидију за све сексуално активне адолесценте и младе жене до 25 година

старости, за све труднице и све жене које су у повећаном ризику за инфекцију због ризичног сексуалног понашања. CDC такође препоручује да се све предходно инфициране жене подвргну рескринингу три месеца након што су третиране због хламидијалне инфекције (62). Генерално, у Сједињеним Америчким Државама у периоду од 2015. до 2016. године забележен је пораст хламидијалне инфекције (63), док је у Европи глобална стопа пријављених хламидијалних инфекција велика, али показује стабилност (64).

### **1.3.1. Епидемиологија хламидијалне инфекције у Сједињеним Америчким Државама**

Најчешће пријављена полно преносива болест у Сједињеним Државама је инфекција изазвана *C. trachomatis*. Из године у годину, укупна стопа хламидијалних инфекција у САД-у је у сталном порасту . На ове епидемиолошке трендове поред повећане инциденце инфекције, значајно утичу примене нових дијагностичких процедура као и потпуније извешавање од стране институција. Од 2000./2001. године проширена је употреба осетљивијих дијагностичких тестова као што су тестови амплификације нуклеинских киселина (NAAT-s), што је вероватно довело до повећања броја идентификованих и пријављених инфекција. Повећана употреба електронског лабораторијског извештавања у последњих десет година повећала је и број пријављених случајева. Сходно томе, на повећање броја пријављених случајева хламидијалне инфекције може утицати повећање инциденце, употреба осетљивијих дијагностичких тестова, скрининг прегледи као и потпуније извештавање. Исто тако, на смањење броја пријављених случајева хламидијалне инфекције, може утицати смањење инциденце или броја скрининг прегледа. У 2016. години центру за контролу болести укупно је пријављено 1598354 случајева, што значи да је стопа инфекције била 497,3 случајева на 100000 становника. У односу на 2015 годину, ова стопа је показала повећање за 4,7%. Повећање је забележено у свим деловима Сједињених држава у периоду од 2015.-2016. године, с тим што је Североисточна регија пријавила највећу стопу од 7% (55).

### **1.3.2. Епидемиологија хламидијалне инфекције у Европи**

Глобална стопа пријављених хламидијских инфекција у Европи је велика, али показује стабилност. У периоду од 2010. до 2014. године број случајева из 26 земаља које су пријављене Европском центру за превенцију и контролу болести је порастао са 358489 на 396128, што би чинило 187 случајева на 100 000 становника, међутим постоје велике варијације између земаља и њихових пријављених стопа. Земље које пријављују преко 200 случајева на 100 000 (549 - Исланд, 529 - Норвешка - 486, Шведска - 375, Велика Британија - 368), су добро спровеле програме превенције и контроле болести, засноване пре свега на препоруци годишњих скрининга, код младих и сексуално активних жена и лечења њихових сексуалних партнера. Стопа пријављивања је највећа код младих сексуално активних жена (240/100 000) и хетеросексуалаца. Код мушкараца стопа пријављених случајева је знатно мања (156/100 000). Постоје велике варијације међу земљама Европе у пријављеним стопама хламидијалне инфекције. Веома ниска стопа инфекције у неким земљама централне и источне Европе може бити последица промена здравствених система и чешћег посећивања приватне праксе које не подносе извештаје тестирања хламидијалну инфекцију (65). Даље, у неким земљама НААТ технологија још увек није доступна, што свакако отежава надзор над хламидијалном инфекцијом.

### **1.3.3. Епидемиологија хламидијалне инфекције у Србији**

Инциденца хламидијалне инфекције у републици Србији је ниска. На овај епидемиолошки тренд поред ниске стопе пријављених случајева, значајно утичу и дијагностичке процедуре које се користе за дијагнозу хламидијалне инфекције као и извештавање од стране институција. Даље, посећивање приватних пракси, које не извештавају о резултатима тестирања на хламидијалну инфекцију такође има удела на ова кретања. У периоду од 2014. до 2016. године нема значајних варијација у инциденци хламидијалне инфекције. 2014. године пријављено је 954 случаја што даје инциденцу од 13,32%, 2015. године бележи се благи пад и пријављено је 941 случај и инциденца од 13,19%, док је 2016. године инциденца нешто нижа од предходне године и износи 12,65%, односно 893 пријављена случаја на укупан број становника.

## **1.4. Клиничке манифестације и компликације хламидијалне инфекције**

Преношење *C. trachomatis* се обично дешава директним контактом преко слузокоже између две особе током сексуалног односа (вагинални, анални или орални секс) или у току порођаја, проласком плода кроз инфицирани цервикални канал (66). Фактори ризика за инфекцију *C. trachomatis* су незаштићени сексуални односи као и већи број сексуалних партнера, што је и индикација за лабораторијско тестирање на ову бактерију. Инфекција најчешће протиче асимптоматски, у 70-90% случајева и сходно томе остаје недијагностикована и нелечена. Уколико остане нелечена инфекција *C. trachomatis* код жена може да доведе до озбиљних последица на репродуктивном тракту, док су код мушкараца компликације мање изражене и ретко доводе до последица по репродуктивно здравље (67). Инфекције хламидијом су повезане и са повећаним стопама преношења HIV-а (68).

### **1.4.1. Инфекција код жена**

Већина инфекција *C. trachomatis* код жена је без или са благим симптомима, мада се код једне трећине жена јављају знаци инфекције. У том случају већина жена се углавном жали на појаву мукопурулентног вагиналног секрета или посткоиталног крварења. На прегледу се често примећује едем, конгестија и крварење цервикса (69). Клиничке манифестације гениталне хламидијане инфекције код жена, пре свега обухватају инфекције доњег гениталног тракта, појавом цервицитиса који може бити повезан са уретралном инфекцијом која је праћена дизуријом. Уколико остане нелечена инфекција се асцендентно шири на горњи генитални тракт доводећи до ендометритиса, салпингитиса, аднекситиса и пелвичне инфламторне болести. Ендометритис може да доведе до појаве ирегуларног крварења из материце. Салпингитис често доводи до појаве ожиљавања јајовода и до појаве обиљних репродуктивних компликација. Две трећине свих случајева неплодности са узроком у јајоводима и трећина случајева ектопичних трудноћа могу бити последица хламидијалне инфекције (70, 71). У ранијим студијама о праћењу и лечењу хламидијалне инфекције, је утврђено да 30% жена са нелеченим урогениталним хламидијалним инфекцијама развија PID (72, 73). Симптоми и знаци који наговештавају PID су болна осетљивост и бол у доњем стомаку, обично билатерално, осетљивост цервикса на покрет при мануелном вагиналном прегледу, диспареунија,

ирегуларно крварење, повећан вагинални или цервикални секрет као и повећана телесна температура (74, 75, 76). Без обзира на интензитет симптома, последице PID-а су тешке. Двадесет посто жена са симптоматским PID-ом су касније стерилне, 18-42% ће имати хронични бол у малој карлици и 1-9% ће имати ектопичну трудноћу (77, 78, 79, 80, 81).

#### **1.4.2. Инфекција код жена за време трудноће**

Хламидијална инфекција у трудноћи, може довести до оштећења ендометријума и губитка плода. У другом и трећем триместру може доћи до превремене руптуре плодових овојница и превременог порођаја, мале телесне масе и неонаталне смрти (82, 83). Постпартални ендометритис се јавља код 30% жена које су имале пренаталну хламидијалну инфекцију (83, 66).

#### **1.4.3. Постпарталне и неонаталне инфекције**

Постпартални ендометритис се јавља код 30% жена које су имале пренаталну хламидијалну инфекцију (83, 66). Хламидијална инфекција се у току вагиналног порођаја може пренети на новорођенче проласком кроз инфицирани порођајни канал. Трансмисија инфекције преко инфицираног вагиналног секрета јавља се код 50-70% жена (84). Око 50% новорођенчади инфицираних мајки ће развити коњуктивитис 5-10 дана након рођења (85). Углавном уз коњуктивитис 50% новорођенчади ће имати и назофарингеалну инфекцију (86). Хламидијална пнеумонија се развија код 30% ових случајева, две до три недеље након рођења колико је и време инкубације. Хламидијална инфекција се на новорођенче најчешће преноси приликом порођаја, мада су забележене и интраутерине инфекције (87). Код превремено рођене деце, често је забележен хориоамнионитис и респираторна инсуфицијенција који могу бити последица интраутерине хламидијалне инфекције (88).

#### **1.4.4. Инфекције код мушкараца**

Хламидијална инфекција је главни узрок негонококног и постгонококног уретритиса. Компликације као што су епидидимитис и епидидимо-орхитис погађају мањи број инфицираних мушкараца и ретко доводе до репродуктивних секвела (67). Не постоје докази о улози хламидијалне инфекције у појави упале простате (89), као ни у улози



настанка мушке неплодности (90). Међутим, хламидијална инфекција је индиректно повезана са мушким субфертилитетом или стерилитетом као резултат директног утицаја на продукцију сперме, сазревање, покретљивост и вијабилност сперматозоида (91, 92, 93). Рајтеров синдром или реактивни артритис је такође повезан са гениталном хламидијалном инфекцијом код мушкараца и жена (89).

## **1.5. Тестови за дијагнозу хламидијалне инфекције**

Недијагностикована и нелечена инфекција *C. trachomatis* може да доведе до озбиљних компликација и последица на репродуктивном тракту (94, 95). Рана дијагностика акутне хламидијалне инфекције је изузетно важна, али и врло изазовна због асимптоматске природе и карактеристичног развојног циклуса *C. trachomatis*. Главни циљ лечења ове инфекције је да се спрече компликације на репродуктивном тракту. Лабораторијском дијагностиковању хламидијалне инфекције треба да се подвргну сви мушкарци са негонококним уретритисом, постгонококним уретритисом, епидидимитисом или Рајтеровим синдромом, као и жене са мукопурулентним цервицитисом, ектопичном трудноћом, тубалним фактором инфертилитета, болом у карлици, сви пацијенти са гонорејом, труднице, асимптоматски сексуално активни пацијенти, са циљем благовременог дијагностиковања инфекције доњег гениталног тракта и превенције преношења и настанка секвела на горњем репродуктивном тракту (95, 96). Врста узорка за анализу зависи од клиничке слике као и од лабораторијских техника које се користе у детекцији инфекције. Услови транспорта и чувања узорака се прилагођавају одређеној техници. Са узорцима који треба да се тестирају комерцијалним EIA, DIF, NAI или NAA тестовима треба руковати као што је наведено у упутству теста. Инвазивни узорци укључују брисеве уретре код мушкараца, ендцервикалне или уретралне брисеве код жена као и узорке добијене из горњег гениталног тракта жена (течност добијена из Дугласовог шпага, узорци ендометријума или из јајовода). Неинвазивни узорци укључују узимање првог млаза урина, вулвовагиналне брисеве, аналне и брисеве пениса. Мноштво доказа говори у прилог да је узорак првог млаза урина код мушкараца једнак или чак бољи у односу на уретралне брисеве (97, 98). Коришћење урина могло би да повећа број рутинских скрининга код мушкараца. Узорци вагиналних брисева су сензитивни колико и узорци цервикалних брисева, уз исту специфичност (99, 100, 101, 102, 103, 104). Неке

раније студије указују да први млаз урина, код жена, може да открије до 10% мање инфекција у поређењу са узорцима вагиналних и ендоцервикалних брисева (99, 104, 105). Ови неинвазивни узорци захтевају високо сензитивну дијагностичку методу као што је амплификација нуклеинских киселина (NAAT). Дијагностичке процедуре за откривање хламидијалне инфекције укључују директне и индиректне методе. У директне дијагностичке методе убрајају се култура, тестови за детекцију антигена као што су тест директне имунофлуоресценције (DIF) и имунохроматографски (брзи тест), хибридизација нуклеинских киселина и амплификациони тестови. Индиректне методе зависе од детекције антитела против *C. trachomatis* и ови тестови могу бити од користи у дијагнози пелвичне инфламаторне болести, тубалног фактора инфертилитета и пост-инфективних компликација, као што је сексуални стечени реактивни артритис. У овим условима, патогени су прешли епител и више се не могу детектовати у брисевима. Лабораторијске услуге за дијагнозу *C. trachomatis* су постале доступне почетком осамдесетих година, када су развијени системи ћелијских култура за инокулацију клиничких узорака. Ови системи су употпунили цитолошке методе и свакако унапредили поље дијагностике. Током осамдесетих и деведесетих година комерцијалне компаније уз велике напоре развијају опрему за детекцију антигена и нуклеинских киселина, што је омогућило дијагностичко тестирање асимптоматских и симптоматских инфекција из неинвазивних узорака (106, 107). Данас је доступан велики број комерцијалних тестова са различитим перформансама. Велики број тестова има задовољавајућу специфичност, док се сензитивност креће од веома ниских вредности (30%) па до преко 95% какву имају NAAT тестови. Препоруке америчког и европског центра за контролу болести су јасне, тестови амплификације нуклеинских киселина се због високе сензитивности, специфичности и брзине препоручују за детекцију инфекција гениталног тракта изазваних *C. trachomatis* и код мушкараца и код жена, са или без симптома (108, 109). Друге методе за дијагнозу акутне гениталне хламидијалне инфекције могу се користити само у случајевима када су технике амплификације нуклеинских киселина недоступне из било ког разлога.

### 1.5.1. Култура ћелија као референтни метод

Како је *C. trachomatis* облигатна интрацелуларна бактерија, изолација хламидија у култури ћелија и даље представља референтни метод за дијагнозу, јер је то једини тест којим се може доказати присуство вијабилних хламидија у болесничком узорку (110). Узимање узорака за култивисање *C. trachomatis* је инвазивно и захтева инсерцију брис штапића 2-3 cm у мушку уретру и 1-2 cm у ендоцервикални канал, уз ротацију у циљу узимања довољно цилиндричних или кубоидалних епителних ћелија. Након узимања, узорци за културу би тербало бити складиштени у одговарајућем транспортном медијуму и транспортовани на температури <math><4^{\circ}\text{C}</math> у лабораторију 24h након узорковања, како би се добио што већи број вијабилних организама. Уколико је транспорт одложен дуже од 24h од узимања, транспортни медијум у коме се чува узорак треба да буде ускладиштен на  $-70^{\circ}\text{C}$ . Све ово нам говори о комплексности ове дијагностичке методе, што је уједно и њен недостатак. Ћелијске линије које подржавају раст *C. trachomatis* укључују McCoy, Hella 229, HEp-2 ћелије као и Buffalo green ћелије бубрега мајмуна. Клинички узорци се инокулишу на циклохексамид третиране монослојеве културе McCoy ћелија или других одговарајућих ћелија. Инокулација укључује центрифугирање узорака на ћелијски монослој праћено инкубацијом 48-72h. Након 48-72h раста, инфициране ћелије развијају карактеристичне интрацитоплазматске инклузије које садрже значајан број елементарних ретикуларних телашаца *C. trachomatis*. Монослој ћелија се излаже генус или врсно специфичним флуоресцеинном обележеним моноклонским антителима да би се добила специфична визуализација хламидијалних инклузија флуоресцентним микроскопом. Детекција *C. trachomatis* путем ћелијског култивисања је високо специфична уколико је коришћено бојење специфично за главни протеин спољашње мембране MOMP (111). Комерцијално бојење коришћењем моноклонских антитела против липополисахарида која су генус специфична, коштају мање, али показују мању специфичност и могу бити погодна за рутинску употребу. Мање специфичне методе детекције инклузија где се користи бојење јодом или Гимза бојење се не препоручују (112, 113). Генерално, ова дијагностичка метода има високу специфичност, али са друге стране показује ниску сензитивност. У одређеним лабораторијама, већа сензитивност се постиже извођењем „слепог прелаза“ када се инокулисани монослој ћелија инкубира 48-72h, након чега се монослој растура и користи за инокулацију у циљу добијања новог циклуса раста (114).

Даље, „Shell vial“ метод култивисања користи већи инокулум са смањеним ризиком за укрштenu контаминацију и тиме обезбеђује већу тачност од методе са микротитар плочом са 96 бунарчића (115, 116). Како успешност култивисања зависи од виталних организама, стопа детекције је у најбољем случају 60%-80%, чак и када тест изводе искусни техничари (117). Осетљивост културе може бити смањена неадекватним сакупљањем, складиштењем и транспортом узорака, коменсалним микробима као и неким токсичним материјама које могу бити присутне у узорку. Додатни недостаци су дуго време раста, интензитет рада и тешкоће у стандардизацији. Према томе, ћелијска култура данас се ретко користи у дијагностици хламидијалне инфекције, али је још увек потребна дијагностичка метода, бар у неким лабораторијама ради праћења дејства антибиотика, промене вируленције, као и у ситуацијама када је потребан тест на највећом специфичношћу као у случају сумње на сексуални напад (62). Закључно, упркос техничким тешкоћама, ћелијска култура, када је изводи искусан техничар, је била најсензитивнија и најспецифичнија метода, и као таква важила је за референтни метод до појаве NAAT тестова (118, 119).

### **1.5.2. Детекција антигена**

Данас је доступан велики број комерцијалних тестова за детекцију хламидијалних антигена (96). У тестовима за детекцију хламидијалних антигена, користе се или поликлонска антитела за детекцију хламидијалног липополисахарида (LPS) или моноклонска антитела за детекцију главних протеина спољашње мембране (MOMP). Уколико се користе поликлонска антитела за детекцију хламидијалног липополисахарида постоји могућност јављања лажно позитивних резултата због укрштене реакције са липополисахаридом других микроорганизама (120, 121). Произвођачи су развили блокирајуће тестове који верификују позитивне резултате EIA тестова да би повећали специфичност (122). Узорци могу бити складиштени и транспортовани без чувања на ниским температурама и треба да буду одрађени у оквиру временског рока који је дат у упутству произвођача. Тестови за детекцију антигена се брзо изводе и обезбеђују резултате за кратак временски период, што је од велике важности ради благовременог укључивања терапије. Дијагностика заснована на другим тестовима захтева другу посету пацијента, што потенцијално доводи до одложеног лечења или изостанка лечења, уколико се пацијенти не појаве, што може да доведе до пораста инциденце инфекције. Поред

кратког времена извођења теста и високе специфичности, али уз ниску сензитивност ови тестови нису препоручени за дијагнозу акутне хламидијалне инфекције од стране европског и америчког CDC-а.

#### **1.5.2.1. Тести директне имунофлуоресценције (DIF)**

Неколико тестова директне имунофлуоресценције (DIF) су комерцијално доступни и користе моноклонска антитела за детекцију главног протеина спољашње мембране (MOMP) који је специфичан за врсту (Syva Microtrak, USA; Trinity Biotech, Irska; Cellabs Pty Lty, Brookvale, Australia). Употребом анти-MOMP моноклонских антитела у односу на поликлонска антитела за детекцију хламидијалног липолисахарида, ова дијагностичка метода је значајно поправила вредности специфичности и квалитет флуоресценције, јер се MOMP подједнако распоређује по спољашњој мембрани *C. trachomatis*. Материјал за узорак се добија брисом или ендоцервикалном четкицом, затим се наноси на предметно стакло, фиксира и може се чувати најдуже седам дана од дана узорковања (123). Бојење се састоји од покривања размаза флуоресцеином обележеним моноклонским антителима која се везују за елементарна телашца *C. trachomatis*. Након тога се обојена елементарна телашца идентификују флуоресцентном микроскопијом (122). Код ове методе могуће је проценити квалитет ендоцервикалних размаза, присуством и бројем цилиндричних епителних ћелија. Сензитивност комерцијално доступних тестова директне имунофлуоресценције се, уз високу специфичност (98%) креће у интервалу од 60%-75% у односу на тестове амплификације нуклеинских киселина (124). DIF метода је брза за извођење, високо специфична, али је и субјективна метода, која захтева компетентну и адекватно обучену особу у флуоресцентној микроскопији и идентификацији флуоресцеином обележених елементарних телашаца. Неки аутори препоручују ову дијагностичку методу у популацији са ниском преваленцом (125), док се други не слажу, и кажу да је треба примењивати само у лабораторијама које обрађују мали број узорака (126). Док европски CDC каже да се идентификација *C. trachomatis* помоћу директног флуоресцентног теста може користити у дијагностици акутне инфекције, само ако NAAT тестови нису доступни или се не могу приуштити (126). Према препорукама америчког CDC ови тестови не треба да буду коришћени за рутинско тестирање узорака гениталног тракта, између осталог и због своје ниске сензитивности (123).

### **1.5.2.2. Брзи имунохроматографски тестови (BT)**

На тржишту постоји више брзих имунохроматографских тестова различитих произвођача за детекцију хламидијалне инфекције. Ови тестови су лакши и бржи за извођење у односу на DIF. Детектују хламидијални липополисахарид и постоји могућност јављања лажно позитивних резултата због укрштене реакције са липополисахаридом других микроорганизмима (112,113). Материјал за узорак се узима стандардним брисом који не захтева посебан транспорт и складиштење. Предходно припремљени клинички узорак се наноси на одређени део тест плочице, који је премазан специфичним антителима. Уколико у узорку има хламидијалних антигена долази до реакције са антителом и јавља се карактеристично обојење у тест региону. Резултат се читава за десет минута, квалитативно као позитиван или негативан тест. Брзи имунохроматографски тестови за детекцију *C. trachomatis* могу бити изведени за тридесет минута, не захтевају скупу и софистицирану опрему, доступни су у паковањима као комплети. Ови тестови могу да имају предности у ординацијама лекара, малим клиникама и болницама или у неким околностима када су резултати потребни за кратко време. У поређењу са NAAT тестовима осетљивост тренутних имунохроматографских тестова је ниска (127, 128, 129, 130, 131). Европски CDC не препоручује употребу тренутно доступних имунохроматографских тестова у дијагностици хламидијалне инфекције, осим ако осетљивији тестови нису доступни, уз напомену, да резултате треба тумачити уз велики опрез (66). Ови тестови показују високу специфичност (97%-100%), брзо се изводе, јефтинију су, али имају ниску сензитивност (20%-60%) и као такви не могу се препоручити за дијагнозу акутне хламидијалне инфекције (132, 133, 134, 135, 136).

### **1.5.3. Детекција антитела**

Детекција антитела спада у индиректне методе дијагностикаовања хламидијалне инфекције. Доступне серолошке методе су између осталих, фиксација комплемента, микроимунофлуоресценција и EIA. Класични тест фиксације комплемента се данас ретко користи. Микроимунофлуоресценција и EIA омогућавају разликовање IgA, IgG и IgM антитела. Метод микроимунофлуоресценције, који је врсно и серотип специфичан, сматра се референтном методом у својој оригиналној форми и од велике користи је у дијагностици хламидијалне инфекције код новорођенчади. Серологија је корисна само у

неким случајевима хламидијалне инфекције и у сероепидемиолошким студијама (137). У тестирању некомплицованих гениталних хламидијалних инфекција серологија готово да нема значаја (138, 139, 140). Ова метода се не препоручује ни код скрининг прегледа, обзиром да се IgG антитела настала током предходне инфекције дуго задржавају, тако да је тешко разликовати тренутну од предходне инфекције. Иако се ове методе не препоручују за дијагнозу акутних инфекција доњег гениталног тракта и скрининг асимптоматских пацијената, серолошко тестирање може бити од користи при дијагностиковању LGV. Услед инвазије дренажујућих лимфних чворова долази до системског одговора антитела који може бити регистрован, и може помоћи при дијагнози ингвиналне болести (141). Одређивање укупног броја антитела методом фиксације комплемента или потпуне-инклузионе флуоресценције је било корисно при идентификацији пацијената са тубалним фактором инфертилитета (142, 143). Дијагностиковање перзистентне хламидијалне инфекције првобитно је засновано на налазима добијеним традиционалном, али специфичном хламидијалном серологијом.

#### ***1.5.3.1. Децекција серумског нивоа IgA и IgG антитела***

Најбржи и најпоузданији начин утврђивања специфичних антитела код хламидијалне инфекције, чак и при ниским титровима антитела је микроимунофлуоресценција као златни стандард, тест индиректне имунофлуоресценције и ELISA тест. Код микроимунофлуоресценције се користе пречишћена елементарна телашца *S. trachomatis*, липополисахарид антиген који карактеристичан за генус је инактивиран, што минимализује укрштање реакције (144). ELISA тест користи MOMP као циљни антиген. Квалитет овог антигена осигурава високу специфичност теста, и не постоји позната укрштена реактивност. Тест комплет садржи микротитар плоче, свака са осам одвојених реагенс бунарчића обележених хламидијалним антигенима. У првом кораку, разблажени узорци од пацијената се инкубирају у бунарчићима. У случају позитивних узорака специфична IgA или IgG антитела ће се везати за антигене. Друга инкубација се изводи употребом ензимом обележених анти хуманих IgA и IgG антитела ( ензимски коњугат) чиме се катализује реакција променом боје, што омогућава детекцију везаних антитела. Код локализованих инфекција, са јасно израженим клиничким симптомима хламидијална антитела не морају увек да се стварају. Даље, повећање титра IgG антитела такође не мора

увек да се нађе. Стога је у проблематичним случајевима потребно утврдити присуство хламидијалне инфекције у инфективним секретима путем директне имунофлуоресценције, или утврдити специфичне генске секвенце коришћењем PCR-а. Студије широм Европе су показале да на основу серумског нивоа IgA и IgG антитела могуће потврдити инфертилитет код жена, настао као последица хламидијалне инфекције (145). Код жена које су имале превремени порођај или мртворођеност често је забележен повећан серумски ниво IgA и IgG антитела (146). Са друге стране, велики број студија указује да серолошки IgA и IgG тестови немају никаквог значаја у дијагностици акутне хламидијалне инфекције (108, 147). Ове тврдње подржава амерички и европски CDC, који због ниске сензитивности такође не препоручује серолошке тестове за скрининг и дијагнозу акутне хламидијалне инфекције.

#### 1.5.4. RT PCR

Технолошка еволуција у клиничкој лабораторијској дијагностици је значајно напредовала развојем директне молекуларне детекције патогена у клиничком узорку. Изолација и идентификација *C. trachomatis* у ћелијској култури је дуго била референтни стандард са којим су упоређивани сви други дијагностички тестови. Обзиром на тешкоће у одржавању вијабилности организама током транспорта и складиштења, стандардизацију, техничку комплексност, цену и ниску сензитивност неопходни су били тестови који се нису заснивали на култивисању. Први тест који се није заснивао на ћелијском култивисању је ензимски имуноесеј (EIA), који детектује хламидијалне антигене и тест директне имунофлуоресценције који користи флуоресцеином обележена моноклонска антитела која се специфично везују за бактеријске антигене у брисевима. Након тестова детекције антигена, појавили су се тестови хибридизације нуклеинских киселина, који откривају специфичне секвенце DNK и RNK *C. trachomatis*. Са појавом ових тестова, од којих неки могу бити аутоматизовани, уведени су скрининг програми за *C. trachomatis*. Примарни недостатак ових тестова је била ниска сензитивност (148). Овај проблем је превазиђен појавом NAAT тестова. NAAT тестови су дизајнирани да амплификују и открију секвенце нуклеинских киселина које су специфичне за организам који се детектује, и не захтевају вијабилне организме. NAAT тестови су за око 30-35% сензитивнији од предходно споменутих тестова (149). Неколико NAAT метода су



тренутно лиценциране за детекцију *C. trachomatis* у клиничким узорцима: ланчана реакција полимеризације (*od engl. polimerase chain reaction - PCR*) (Amplicor, Roche Molecular Systems, USA), ланчана реакција лигазе (*od енл. ligase chain reaction - LCR*) (LCx test, Abbott Laboratories, USA), транскрипцијом посредована амплификација (*od енл. transcription-mediated amplification - TMA*) (AMP-CT i APTIMA Combo 2, Gen-Probe Inc, USA) и изотермална амплификација заменом ланаца (*od engl. strand displacement amplification - SDA*) (ProbeTec, BD Diagnostic Systems, USA). PCR, LCR i SDA тестови амплификују нуклеотидне секвенце криптичног плазида, који је присутан у вишеструким копијама сваког ЕТ *C. trachomatis*. ТМА реакција региструје рибозомалну RNA која је такође присутна у вишеструким копијама. Откривање *Chlamydia trachomatis* путем ланчане реакције полимеразе (PCR), заснива се на истицању специфичног дела генома патогена коришћењем специфичних прајмера. За прајмере нуклеинских киселина који се користе у комерцијалним NAAT тестоваима за *C. trachomatis* није познато да дају укрштenu реакцију са DNK других бактерија. У „Real time PCR“ методи истакнути продукт се детектује коришћењем флуоресцентних боја. Ланчана реакција полимеризације у реалном времену (*od енл. Real Time Polimerase Chain Reaction - RT PCR*) је квалитативни тест који садржи интерну контролу (IC), која мора бити употребљена у поступку екстракције, у циљу контроле процеса екстракције сваког засебног узорка, као и за идентификацију могуће инхибиције реакције. Комерцијални тестови се разликују у методама амплификације и циљним секвенцама нуклеинских киселина. Већина комерцијалних NAAT тестова су погодни за детекцију *C. trachomatis* у вагиналним и ендоцервикалним брисевима код жена, уретралним брисевима код мушкараца, и узорцима првог млаза урина код жена и мушкараца. Висока сензитивност NAAT тестова се приписује њиховој теоретској способности да произведу позитиван сигнал из тако мало почетног материјала као што је једна једина копија циљне DNK или RNK. Обзиром на овако високу сензитивност, потребни су напори да се превенира контаминација узорака на клиници или ширење ампликона у лабораторији. Лабораторије би требало да поштују стандардне молекуларне технике, одржавају чистим радне просторе и опрему, спроводе негативне контроле при сваком извођењу. Закључно, NAAT тестови су далеко супериорнији у укупним перформансама у поређењу са другим тестовима са или без култивисања у откривању *C. trachomatis*. Ови тестови дају високу сензитивност детекције, преко 90%, уз одржавање високе специфичности од 99%, и детектују 20-50% више

хламидијалних инфекција од оних које детектују ранији тестови са или без култивисања (150). Са оваквим перформансама ови тестови су и једини који су препоручени од стране америчког и европског CDC за дијагнозу асимптоматских и симптоматских хламидијалних инфекција, са компромисом само у ситуацијама када су NAAT тестови недоступни из било ког разлога (151). Захваљујући високој специфичности проверених NAAT тестова, и малом ризику од губитка позитивних резултата није потребно потврдно тестирање позитивних налаза (152, 153). Студија спроведена 2002 године потврђује ову констатацију, резултати поновљеног тестирања су се слагали у више од 90% случајева са резултатима иницијалних тетсова за детекцију *C. trachomatis* (154, 155).

## **1.6. Препоруке CDC и ECDC за дијагнозу акутне хламидијалне инфекције**

Према препорукама америчког и европског центра за контролу болести, тестови амплификације нуклеинских киселина се због супериорне сензитивности, специфичности и брзине препоручују за детекцију инфекција гениталног тракта изазваних *C. trachomatis* и код мушкараца и код жена, са или без симптома (108, 109). За ове тестове се показало да имају најбољи однос трошкова и учинка у превенцији секвела које могу настати као последица ове инфекције (106, 156, 157). Према истим изворима, изолација хламидија у култури ћелија и директна имуофлуоресценција се могу користити за дијагнозу акутне гениталне хламидијалне инфекције само у случајевима када су технике амплификације нуклеинских киселина недоступне из било ког разлога. За извођење свих NAAT тестова као и других дијагностичких метода, кључно је да се прецизно прате препоруке произвођача узимајући у озир прикупљање, транспорт и складиштење узорка, као и извођење специфичног теста, укључујући интерне контроле (позитивне, негативне и ако се захтева контроле инхибиције) и учешће у одговарајућој националној или интернационалној екстерној процени квалитета. Пре одобрења дијагностичког теста одрађена је строга евалуација од стране америчке *Food and Drug Administration*, која такође препоручује NAAT тестове као примарне дијагностичке методе хламидијалне инфекције.

## **2. ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ СТУДИЈЕ**

### **А. ЦИЉ:**

#### **А.1 ПРИМАРНИ ЦИЉ**

1. Утврдити да ли постоји слагање резултата RT-PCR теста за детекцију *C. trachomatis* (златни стандард) са резултатима добијеним употребом директне имунофлуоресценције (DIF) и брзог имунохроматског теста (EIA) за квалитативно откривање хламидијалних антигена и имуноензимских тестова за детекцију серумског нивоа IgA и IgG антитела специфичних за хламидијални MOMP антиген (ELISA).

#### **А.2 СЕКУНДАРНИ ЦИЉЕВИ**

1. Утврдити да ли постоји слагање резултата RT-PCR теста за детекцију *C. trachomatis* (златни стандард) са резултатима добијеним комбиновањем два или више тестова.
2. У односу на златни стандард одредити сензитивност, специфичност, позитивну и негативну предиктивну вредност за сваки тест и комбинацију тестова.
3. Утврдити да ли употреба више тестова може побољшати детекцију гениталне хламидијалне инфекције.
4. Одредити медицинске трошкове анализа, кумулативно и појединачно.
5. Одредити директне и индиректне медицинске трошкове тестирања и лечења испитаника са стварно позитивним, лажно позитивним и лажно негативним резултатима, кумулативно и појединачно.

### **Б. ХИПОТЕЗЕ**

#### **Б.1 ПРИМАРНА ХИПОТЕЗА**

1. Постоји слагање резултата RT-PCR теста за детекцију *C. trachomatis*(златни стандард) са резултатима добијеним употребом DIF, EIA и ELISA тестова, али је вредност статистичког теста слагања дијагностичких метода за капа статистику ниска.

## **Б.2 СЕКУНДАРНЕ ХИПОТЕЗЕ**

1. Комбиновањем два или више тестова повећава се вредност статистичког теста слагања дијагностичких метода за капа статистику
2. У односу на златни стандард испитивани тестови, као и комбинације тестова имају инфериорну сензитивност, специфичност, позитивну и негативну предиктивну вредност.
3. Употреба више тестова може побољшати детекцију гениталне хламидијалне инфекције.
4. Профил медицинских трошкова DIF, EIA и ELISA тестова је повољнији у односу на RT-PCR анализе али због недовољних дијагностичких перформанси и последичне потребе за њиховим комбиновањем постаје знатно неповољнији.
5. Профил директних и индиректних медицинских трошкова DIF, EIA и ELISA тестова је неповољнији у односу на RT-PCR анализе због додатних медицинских услуга условљених већом учесталошћу лажно позитивних и лажно негативних резултата.

## **3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ**

### **3.1. Популација која се истражује**

У истраживање је била укључена група од 224 испитаника старијих од 18 година, оба пола, који су се у периоду од јануара месеца 2015. до децембра месеца 2016. јављали на Институт за јавно здравље у Крагујевцу ради тестирања на хламидијалну инфекцију. Испитаници су били укључени у студију након процене подобности за укључење и потписивања формулара Информисаног пристанка. За укључивање у студију пацијенти су требали да задовоље све укључујуће и да немају ни један искључујући критеријум. У студију су били укључени испитаници оба пола, старији од 18 година, упућени у Институт за јавно здравље у Крагујевцу ради тестирања на хламидијалну инфекцију. Из студије су биле искључене све особе млађе од 18 година, ако постоји било које обољење, стање или други фактор који би својим квалитетом и квантитетом могао у знатној мери да утиче на резултат испитивања (трудноћа, у току менструације, скорашња примена антибиотика или топикалних вагиналних препарата у току предходна 72 часа, коинфекција другим патогенима и друго), ако већ учествује у другом клиничком испитивању, ако одбије да учествује у студији и ако постоје било које друге околности које у значајној мери онемогућавају учешће у студији.

### **3.2. Узорковање**

Укључивање пацијената у истраживање обављено је у Институту за јавно здравље у Крагујевцу. Свим особама који су били упућени у Институт за јавно здравље у Крагујевцу ради тестирања на хламидијалну инфекцију, а који су задовољавали укључујуће и нису имали искључујуће критеријуме је било понуђено учешће у студији. Испитаници су били укључени у студију само ако су на то пристали добровољно, након потписивања формулара Информисаног пристанка уз пуну обавештеност. Писани информисани пристанак је обезбедио ординирајући лекар који је био истовремено и истраживач у студији. По обезбеђеном пристанку, прикупљени су анамнестички подаци, а након тога испитаницима су били узети цервикални или уретрални брисеви и узорак крви за даљу анализу. Укључивање је спровођено сукцесивно, према принципу пригодног

узорка, почев од првог дана студије па на даље, до дана када је постигнут укупан број испитаника, а сходно прорачуну величине студијског узорка.

Свим испитаницима су била узета 2 бриса. Први брис, цервикални код жена и уретрални код мушкараца, је био узет помоћу стандардног памучног бриса за бактериолошки и миколошки преглед. Други, брис је био узет помоћу стандардног бриса за PCR, ради детекције специфичних секвенци генома хламидија. Испитаницима брисеви су узимани у Диспанзеру за жене, Дома здравља Крагујевац или Институту за јавно здравље, а узимао их је ординирајући гинеколог или квалификовани медицински техничар. По преузимању брисева у Институту за јавно здравље даљи поступак са узорцима је био спроведен од стране специјалисте медицинске микробиологије или коистраживача који су били укључени у ову студију. Из првог бриса, одмах по пријему урађен је стандардни бактериолошки и миколошки преглед, тест директне имунофлуоресценције (DIF) и брзи имунохроматски тест (EIA) за квалитативно откривање хламидијалних антигена. Други брис смо замрзавали на  $-20^{\circ}$  Целзијуса за накнадно одређивање специфичних секвенци генома хламидија RT-PCR тестом.

Свим испитаницама су били узети и узорци крви из периферне вене, у запремини од 5 mL, према важећим стандардима за биохемијске анализе. Узорци крви испитаника су узимани у Институту за јавно здравље. Узорке је узимао квалификовани медицински техничар, а даљи поступак са узорцима је био спроведен од стране коистраживача укључених у ову студију. Након узорковања и обележавања узорака, крв је била центрифугирана. Након центрифугирања, издвојени серум је био замрзаван на  $-20^{\circ}$  Целзијуса за накнадно одређивање серумских параметара хламидијалне инфекције (ЕЛИСА).

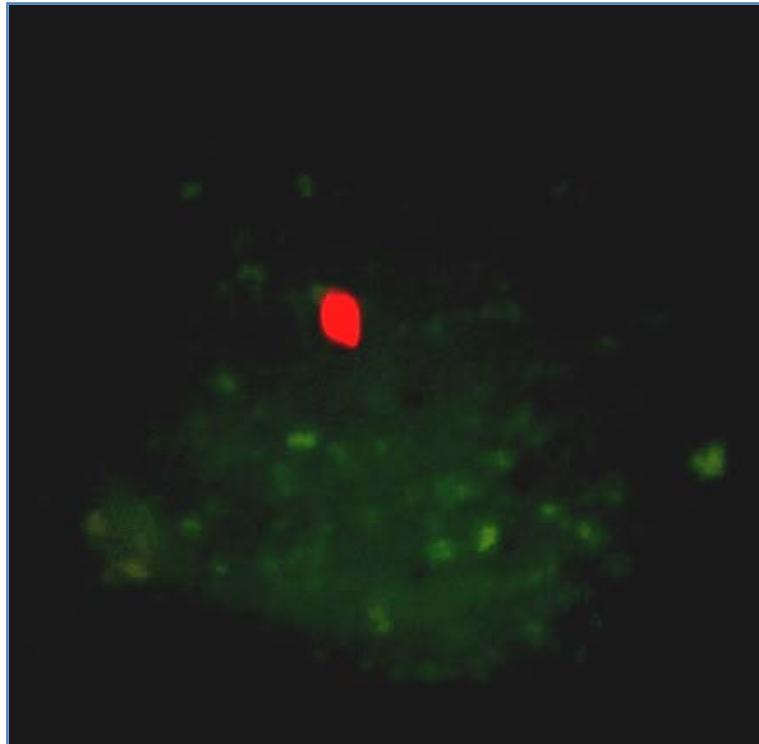
### 3.3. Скрининг тестови

#### 3.3.1. Тест директне имунофлуоресценције за квалитативно одређивање хламидијалних антигена (DIF)

Код свих испитаника одређивано је присуство МОМР антигена *C. trachomatis* помоћу *Chlamydia* Cel IF теста (Cellabs Pty Lty, Brookvale, Australia). Тест *Chlamydia* Cel IF је тест директне имунофлуоресценције за детекцију *Chlamydia trachomatis* у узорцима пацијената. Реагенс који садржи мишја моноклонска антитета обележена флуоресцеином специфично се везују за МОМР, антиген *C. trachomatis* у узорку и даје светлозелену флуоресценцију. Квалитет флуоресценције је добар, јер се МОМР подједнако распоређује по хламидијалној мембрани.

Након пријема предметног стакла са узорком, вршена је фиксација метанолом у трајању од 5 минута. Предметно стакло се оцеди и осуши након чега се додаје 25µl реагенса RC1 ( *Chlamydia* cell реагенс), тако да се прекрије површина удубљења. Реагенс RC1 се додаје и на предметно стакло са позитивном контролом на исти начин. Предметна стакла се након тога инкубирају у влажној комори на 37°C/30 минута. Након инкубације предметна стакла су испирана у кадици са PBS-ом (фосфатни пуфер) један минут. На осушена предметна стакла додавана је по једна кап RMF реагенса (течност за фиксирање). Удубљење се затим прекрива покровним стаклом. Овако припремљен узорак је прегледан коришћењем флуоресцентног микроскопа са имерзијом и увећањем од x600-x1000.

Резултати су читавани одмах. Елементарна тела се виде као светло-зелене флуоресцентне тачкице постављене екстрацелуларно, телашца су дискоидног облика и лепо се виде у односу на контрастно црвенкасто-браон обојене ћелије. Дијагноза је била позитивна када је у фиксираном и обојеном размазу узорка на предметном стаклу уочено најмање десет флуоресценција. Негативну дијагнозу смо постављали када у фиксираном и обојеном размазу није било флуоресценција, при чему се види бар десет епителних ћелија цервикса. Квалитет ендцервикалних узорака смо процењивали присуством и бројем епителних ћелија. (Слика 6.)



**Слика 6** Тест директне имунофлуоресценције за квалитативно одређивање хламидијалних антигена – позитиван налаз

### **3.3.2. Брзи имунохроматографски тест за квалитативно одређивање хламидијалних антигена**

Свим испитаницима одређивано је присуство хламидијалних антигена употребом брзог имунохроматографског теста (Ulti med Products GmbH, Ahrensburg, Germany). Брзи тест на хламидију је брзо хроматографско испитивање за квалитативно откривање *Chlamydia* у узорку испитаника. Овај тест користи поликлонска антитела за детекцију хламидијалног липолисахарида. Ова антитела су обележена ензимом који у реакцији са субстратом, након везивања за специфични антиген, ослобађа боју која се детектује голим оком.

Први корак код овог теста је екстракција хламидијалних антигена из узорка испитаника. У епрувету за екстракцију додати пет пуних капи Реагенса А (0,2М NaOH), који је безбојан. У епрувету убацити брис притиснути дно епрувете и ротирати брис 15 пута, оставити да стоји два минута. Квантитативном пипетом одмерити (до ознаке)



Реагенс Б (0,2N HCL) и додати у епрувету за екстракцију. Раствор ће постати замућен. Поново убацити брис, притискати дно епрувете и ротирати 15 пута све док раствор не добије зеленкасту боју. Оставити да стоји један минут, након чега добро исцедити и извући брис. На екстракциону епрувету ставити капалјку. На чисту повшину ставити тест плочицу, у поље S накапати пуне три капи, водећи рачуна да нема мехурића ваздуха. Резултат прочитати након десет минута. Резултат је тумачен као негативан када се у контролном пољу (C) појави обојена линија, а у тест региону (T) нема обојених линија. Резултат је позитиван ако се на тест плочици појаве две обојене линије у контролном и у тест пољу.



**Слика 7** Брзи имунохорматографски тест за квалитативно одреживање хламидијалних антигена: А – позитиван налаз; Б – негативан налаз

### 3.3.3. Одређивање серумског нивоа антитела на хламидијални МОМР антиген

Код свих испитаника серумски ниво IgA и IgG антитела специфичних за МОМР антиген одређиван је помоћу EUROIMUN комерцијалног ELISA кита (Lubec, Germany).

Серумски ниво IgA и IgG антитела специфичних за МОМР антиген *C. trachomatis*, одређиван је након разређивања узорка у односу 1:101 са дилуционим пуфером за узорке. Сто микролитара тако припремљеног узорка се додаје у микротитрациону плочу чији су бунарчићи обложени пурификованим МОМР антигеном *C. trachomatis*. Плоча се након тога инкубира 30 минута на собној температури (18°C-25°C), а потом испере три пута са 450 микролитара пуфера за испирање. Потом се додаје 100µl ензим коњугата (анти-хумана IgA или IgG антитела обложена пероксидазом), и плоча се поново инкубира 30 минута на собној температури. Поступак испирања са 450 микролитара пуфера за испирање се понавља три пута. Након тога се додаје 100µl солуције хромогеног субстрата (ТМВ-тетрамethylbenzidine) и плоча се поново инкубира, у мраку, током 15 минута, на собној температури. На крају, реакција се зауставља додавањем 100µl стоп солуције. Након тога квантификација антитела се врши мерењем интензитета боје узорка у спектрофотометру употребом филтера од 450nm. Резултати су интерпретирани семиквантитативно за IgA, рачунањем односа вредности екстинције контроле или узорка пацијента и екстинције калибратора 2. Препоруке произвођача за тумачење резултата су: узорци су негативни када је однос <0.8, гранични када је однос >0.8<1.1 и позитивни када је однос >1.1. Резултати за IgG су интерпретирани квантитативно. Произвођач препоручује следеће тумачење резултата: <16RU/ml негативно, >16< 22RU/ml гранична вредност, >22RU/ml позитивно. (Слика 8.)



**Слика 8.** Одређивање серумског нивоа антитела на хламидијални MOMP антиген (ELISA): Колона IgA, ред A - негативна контрола, ред B – позитивна контрола, ред C – *Cut-off*, ред D –негативан налаз, ред E – позитиван налаз; Колона IgG, ред A – стандард 1, ред B – стандард 2, ред C – стандард 3, ред D – негативан налаз, ред E – позитиван налаз

### 3.4. Дијагностички тест RT-PCR

За детекцију DNK *Chlamydia trachomatis* коришћен је RT-PCR тест (Sacace Biotechnologies, Como, Italy). RT-PCR тест је тест амплификације нуклеинских киселина у реалном времену за квалитативно откривање DNK *Chlamydia trachomatis* у узорцима пацијената. RT-PCR представља препоручену дијагностичку методу од стране европског и америчког CDC-а за откривање акутне хламидијалне инфекције, а у нашој студији представља златни стандард.

Откривање *Chlamydia trachomatis* путем ланчане реакције полимеразе, заснива се на истицању специфичног дела генома патогена коришћењем специфичних прајмера. У „Real time PCR“ методи истакнути продукт се детектује коришћењем флуоресцентних боја. Ове боје се користе за олигонуклеотидне тестове, које се везују посебно за наглашене продукте. Мониторинг интензитета флуоресценције у реалном времену омогућава детекцију акумулираних продуката без отварања реакционих цеви након почетка PCR. *Chlamydia trachomatis* RT PCR је квалитативни тест који садржи интерну контролу (IC), која мора бити употребљена у поступку екстракције, у циљу контроле процеса екстракције сваког засебног узорка, као и за идентификацију могуће инхибиције реакције. *Chlamydia trachomatis* RT-PCR опрема користи „Hot Start“, који у великој мери смањује учесталост неспецифично испрајмованих реакција. „Hot Start“ је обезбеђен коришћењем хемијски модификоване полимеразе (TaqF), која се активира загревањем на 95°C у трајању од 15 минута.

#### 3.4.1. Припрема узорака и реагенаса

Раствори за лизирања и испирање треба да буду загрејани на температури од 60-65°C до нестајања кристала леда. Припремити потребан број полипропиленских епрувета, укључујући и једну за негативну контролу екстракције. У сваку епрувету додати интерну контролу и раствор за лизирање. Након тога у одговарајуће епрувете додаје се узорак. *Контроле* се припремају на следећи начин: у епрувету означену као Снег додаје се негативна контрола из амплификационог сета. Вортексовати епрувете и инкубирати 5 минута на 65°C. Центрифугирати. Уколико узорак није у потпуности растворен, препоручује се рецентрифугирање епрувета 5 минута на максималној брзини и

пребацавање супернатанта у нову епрувету ради DNK екстракције. Снажно вортексовати *Sorbent* реагенс и додати га у сваку епрувету, поново вортексовати и инкубирати све епрувете 3 минута на собној температури. Поновити овај корак. Центрифугирати све епрувете 30 секунди на 5 000g, а затим користећи пипету са стављеним наставком са аеросолном баријером, пажљиво отклонити и одстранити супернатант из сваке епрувете, без ометања талоба. Променити наставке пипете између епрувета. У сваку епрувету додати раствор за испирање. Вортексовати интензивно и центрифугирати 30 секунди на 10 000g. Уклонити и одстранити супернатант из сваке епрувете. Поновити корак испирања и инкубирати све епрувете са отвореним врхом 5-10 минута на 65°C. Ресуспендовати талог у DNK-елуентију. Инкубирати 5 минута на 65°C и повремено вортексовати. Епрувете центрифугирати 1 минут на 12 000g. Овако припремљен супернатант садржи DNK спреман за амплификацију. Уколико се амплификација не изводи истог дана када и екстракција, обрађени узорци могу бити чувани на температури 2-8°C максимално 5 дана или замрзнути на -20/-80°C.

### 3.4.2. Протокол

Одмрзнути PCR-*mix*-2-FRT епрувету. Вортексирати епрувете са PCR-*mix*-1-FRT, PCR-*mix*-2-FRT, *TaqF* њолимеразом, и кратко их центрифугирати. Узети потребан број епрувета за амплификацију DNK клиничких и контролних узорака. За N број реакција (укључујући три контроле), додати у нову епрувету:

10\* (N+1) микролитара PCR-*mix*-1-FRT  
5.0\*(N+1) микролитара PCR-*mix*-2-FRT  
0,5\*(N+1) микролитара *TaqF* њолимеразе

Вортексирати епрувету и затим је кратко центрифугирати. Пребацити припремљену микстуру у сваку епрувету. Користећи наставке са аеросол баријером, додати DNK узорак добијен из клиничких или контролних узорака, у стадијуму DNK екстракције у припремљене епрувете. Припремити контролне епрувете:

- (NCA)- додати DNK буфер у епрувету означену NCA (негативна контрола амплификације)

- (C+) - додати позитивну контролу у епрувету означену C+ (позитивна контрола амплификације)
- (C-) - додати негативну контролу у епрувету означену C- (негативна контрола екстракције)

### 3.4.3. Амплификација

Креирати температурни профил на инструменту по упутству. Флуоресценција се детектује у другом кораку *Cycling 2* стадијума (60С), на FAM и JOE/Hex/Cy3 каналима. *Chlamydia trachomatis* се детектује на FAM каналу, IC, DNK на JOE/Hex /Cy3 каналу. Подесити инструмент по упутству.

### 3.4.4. Анализа података

Интезитет сигнала флуоресценција се детектује на два канала:

- Сигнал за производ амплификације DNK *Chlamydia trachomatis* се детектује на FAM каналу.
- Сигнал за продукт амплификације унутрашње контроле (IC) се детектује на JOE/Hex/Cy3 каналу

### 3.4.5. Интерпретација резултата

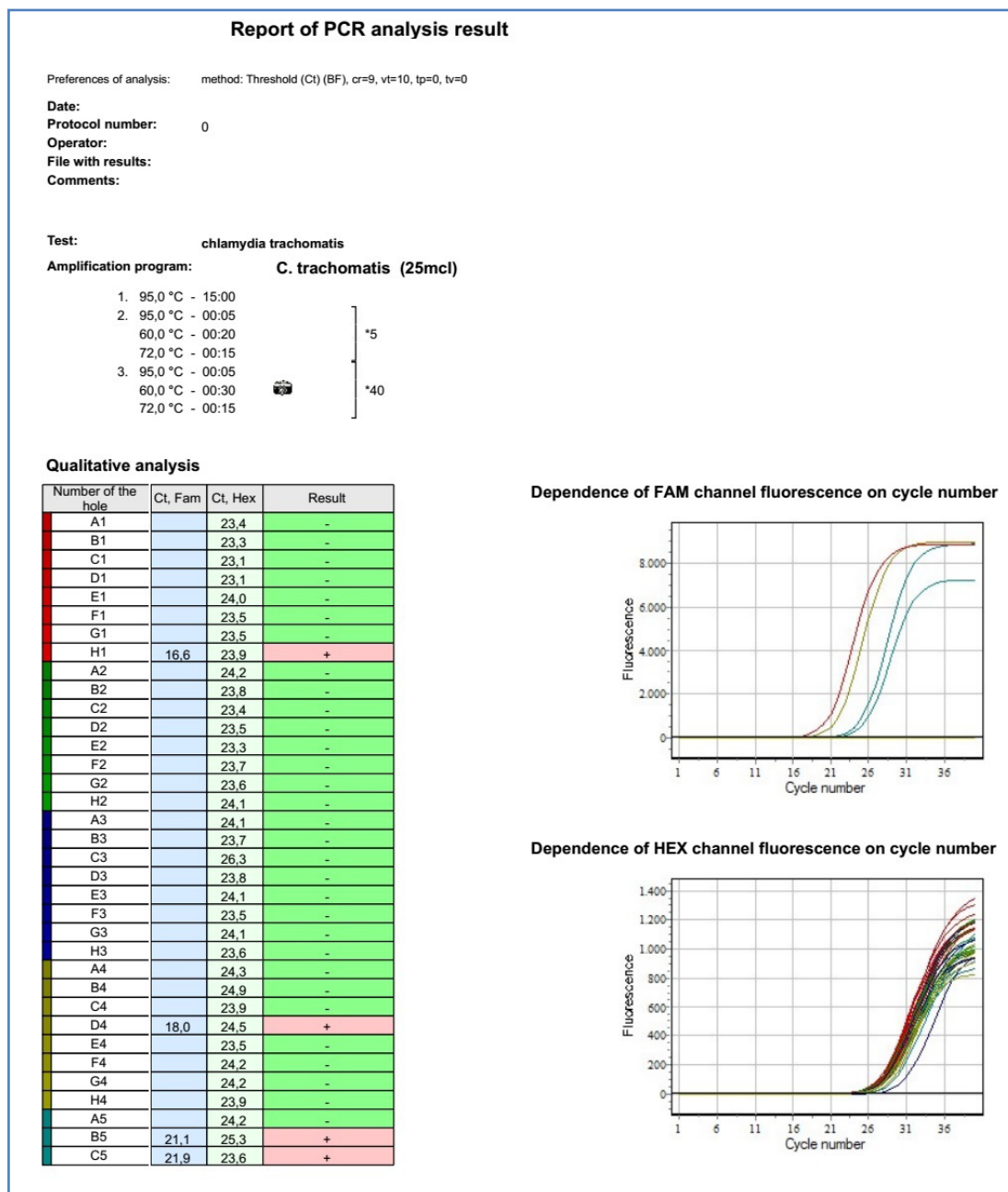
Резултати се интерпретирају помоћу софтвера инструмента путем укрштања или неукрштања криве флуоресценције и линије прага.

Принцип интерпретације:

- DNK *Chlamydia trachomatis* је присутна у узорку ако је Ct вредност присутна на FAM каналу. Крива флуоресценције би требало да прелази линију прага у делу експоненцијалног раста флуоресценције.
- DNK *Chlamydia trachomatis* није детектована у узорку ако Ct вредност није присутна на FAM каналу (крива флуоресценције не прелази линију прага), док је Ct вредност на JOE каналу испод 33.

- Резултат је невалидан уколико Ct вредност није присутна на FAM каналу и Ct вредност није присутна на JOE каналу или је већа од специфичне граничне вредности (Ct>33). Код таквих узорака је потребно поновити PCR анализу.

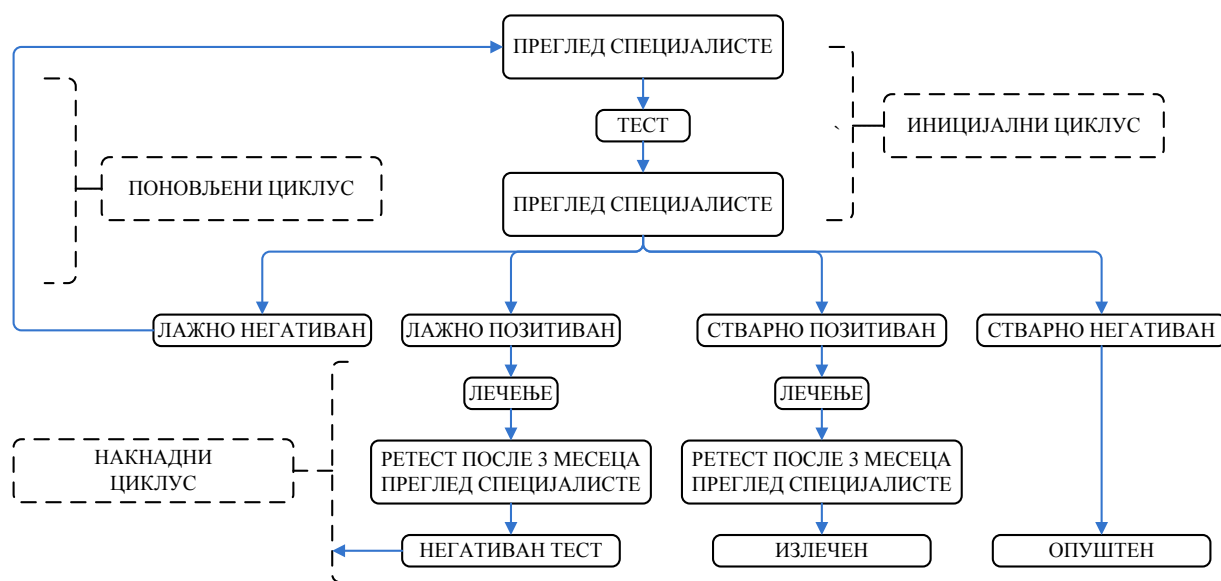
Резултат анализе се сматра поузданим, само ако су резултати позитивне и негативне контроле амплификације, као и негативне контроле екстракције, тачни.



**Слика 9.** RT PCR тест – квалитативно откривање ДНК *C. trachomatis* позитиван налаз – Ct вредност присутна на FAM каналу

### 3.5. Економска анализа

Економска анализа је сачињена на основу сценарија дијагностике и лечења хламидијалне инфекције генитуорунарног тракта у условима рутинске клиничке праксе у примарној здравственој заштити (Шема 1.). Економски модел претпоставља иницијални преглед свих болесника и њихово тестирање одн. микробиолошку дијагностику на присуство урогениталне хламидијалне инфекције, једном од четири дијагностичке методе. Даље разврставање болесника је дефинисано резултатима теста у четири подгрупе: лажно негативни, лажно позитивни, стварно позитивни и стварно негативни. Непосредном лечењу приступају пацијенти којима је тест био лажно и стварно позитиван и којима лекар, при контролном прегледу прописује доксициклин. У ове две групе, после спроведеног лечења трећег месеца ће се радити ретестирање. Сценарио предвиђа да ће приликом ретестирања тест код свих ових пацијената бити негативан.



**Шема 1.** Сценарио дијагностике и лечења хламидијалне инфекције генитуорунарног тракта у условима рутинске клиничке праксе у примарној здравственој заштити

Подгрупа пацијената са стварно негативним резултатима тестирања неће имати даљу дијагностику и терапију, тако да ће се њихово учешће у економском моделу одвијати унутар једног, иницијалног циклуса. С друге стране, претпоставља се да ће се подгрупа испитаника са иницијално лажно негативним налазима после извесног времена поново јавити лекару због неизлечене инфекције и рецидива или погоршања симптома. Ови испитаници ће бити подвргнути новом циклусу дијагностике као на почетку модела



(уз коришћење истог типа теста као у иницијалној евалуацији), уз додатни циклус у зависности од резултата дијагностичког теста.

У целини узев, економски сценарио предвиђа три циклуса: један за болеснике са иницијално стварно негативним налазом (инцијални), два за болеснике са лажно и стварно позитивним (инцијални, накнадни) и три за болеснике са инцијално лажно негативним налазом који на ретестирању буду имали лажно позитивне и лажно негативне налазе (инцијални, поновљени, накнадни циклус). Вероватноћа расподеле болесника унутар грана економског модела и током циклуса ће следити основне резултате студије (в. раније). Трошкови лечења болесника са иницијално лажно позитивним и лажно негативним налазима током другог односно током другог и трећег циклуса ће се сматрати индиректним здравственим трошковима.

Поред економске анализе наведеног сценарија, која се односи на појединачног болесника, учињена је процена здравствених трошкова за читаво становништво, према принципима анализа циљне популације за примену одређених терапијских стратегија у националним здравственим системима (158). Подаци о националној виталној статистици и морбидитету су преузети из Здравствено-статистичког годишњака Републике Србије Института за јавно здравље „Милан Јовановић Батут“, Београд (<http://www.batut.org.rs/index.php?content=77>). Подаци о морбидитету у другим европским земљама су преузети из одговарајуће базе података Европског центра за преценцију и контролу болести:

(<http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/Chlamydia/Pages/Annualetpidemiologicalreport2016.aspx>).

На основу низа сродних података, израчунате су средње вредности и доња и горња вредност 95% интервала поверења.

### **3.6. Статистичка обрада података**

Величина узорка је утврђена на основу претпоставке слагања независне варијабле (RT-PCR) и зависних варијабли добијених различитим студијским методама (DIF, EIA, ELISA). Претпостављено је да ће слагање између метода бити у 90% узорака, уз очекивану разлику од 5% између нулте (методе су упоредиве-постоји слагање резултата теста) и

радне хипотезе (методе нису упоредиве-не постоји слагање резултата теста). Према подацима светске здравствене организације маргинална преваленца хламидијалне инфекције за регион Европе износи 10% (позитиван налаз) и 90% (негативан налаз) (159). За прорачун студијског узорка је коришћен одговарајући, претходно публикован номограм прорачуна узорка статистичког теста слагања дијагностичких метода за капа статистику (160). Студијски узорак је прорачунат узимајући алфа грешку од 0.05, снагу студије од 0.90. Сходно наведеном, утврђен је узорак од најмање 210 испитаника.

У зависности од квалитативних и квантитативних карактеристика секундарних варијабли, спроведене су одговарајуће статистичке анализе. Код нумеричких варијабли, спроведено је тестирање хипотезе код два независна узорка (Вилкоксон-Ман-Витни тест). Код категоријалних варијабли је коришћен хи-квадрат тест. Веза између испитиваних варијабли је била анализирана коришћењем ОРА (енгл. overall rates of agreement). Примарне варијабле су биле анализирани употребом степена слагања између категоријских параметара израчунавањем карра индекса. Дијагностичку ефикасност тестова одређивали смо употребом on line калкулатора ([https://www.medcalc.org/calc/diagnostic\\_test.php](https://www.medcalc.org/calc/diagnostic_test.php)). Параметри дијагностичке ефикасности су израчунавани на основу формула приказаних у Табели 1.

**Табела 1.** Формуле за израчунавање параметара дијагностичке ефикасности

Статистика	Формула
Сензитивност	$\frac{a}{a + b}$
Специфичност	$\frac{d}{c + d}$
Позитиван однос вероватноће	$\frac{\text{сензитивност}}{1 - \text{специфичност}}$
Негативан однос вероватноће	$\frac{1 - \text{специфичност}}{\text{сензитивност}}$
Преваленца болести	$\frac{a + b}{a + b + c + d}$
Позитивна предиктивна вредност	$\frac{a}{a + c}$
Негативна предиктивна вредност	$\frac{d}{b + d}$
Јуденов индекс	(сензитивност + специфичност - 100)

Статистика	Формула
Проширени Јуденов индекс	(сензитивност + специфичност + PPV + NPV - 200)
Дијагностичка тачност	$\frac{a + d}{a + b + c + d}$

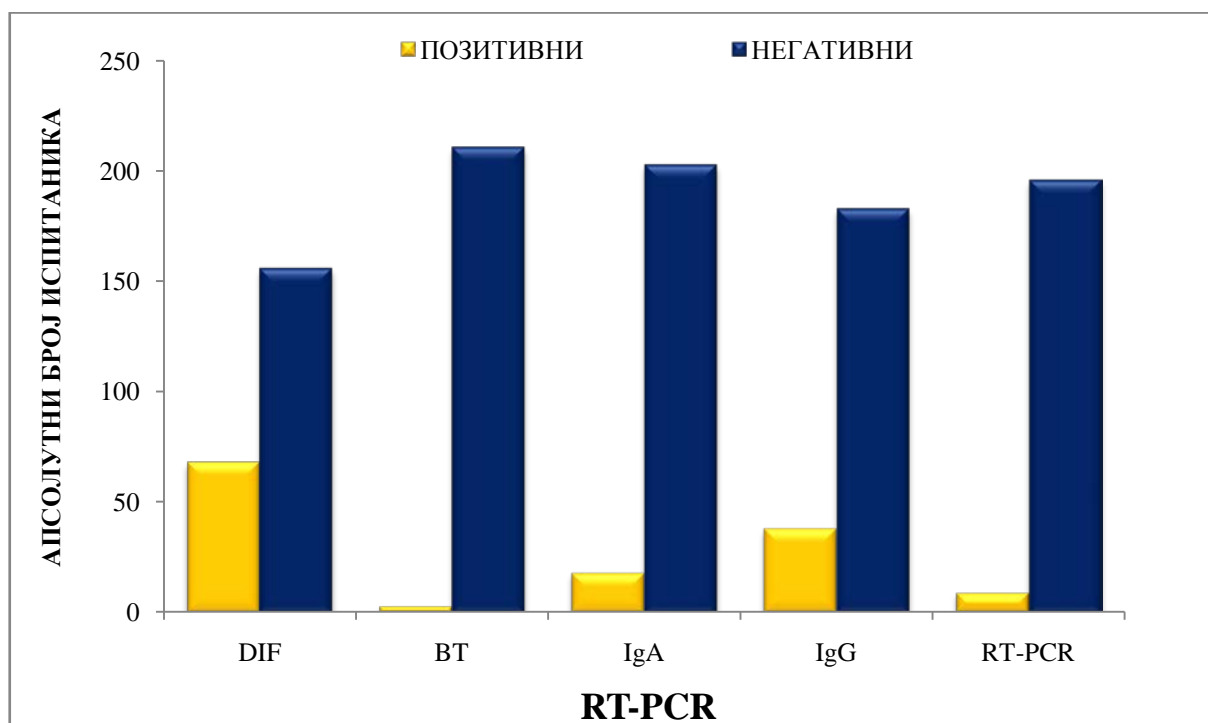
a – стварно позитивни; b – лажно негативни; c – лажно позитивни; d – стварно негативни

Сензитивност и специфичност појединих параметара у дискриминацији клиничких исхода је одређивана тзв. ROC анализом. За статистички значајну разлику у добијеним вредностима између група сматрано је када је  $p < 0.05$ , док је статистички веома значајна разлика била када је  $p < 0.01$ .

## 4. РЕЗУЛТАТИ

### 4.1. Слагање резултата RT-PCR теста за детекцију *C. trachomatis* са резултатима добијеним употребом других дијагностичких тестова (DIF, BT, ELISA)

За детекцију хламидијалне инфекције коришћена су четири теста: тест директне имунофлуоресценције (DIF), брзи тест (BT), ELISA тест (IgA и IgG) и реакција ланчане полимеризације у реалном времену (RT - PCR). (Графикон 1.)



Графикон 1. Упоредни резултати тестова за детекцију *C. trachomatis*

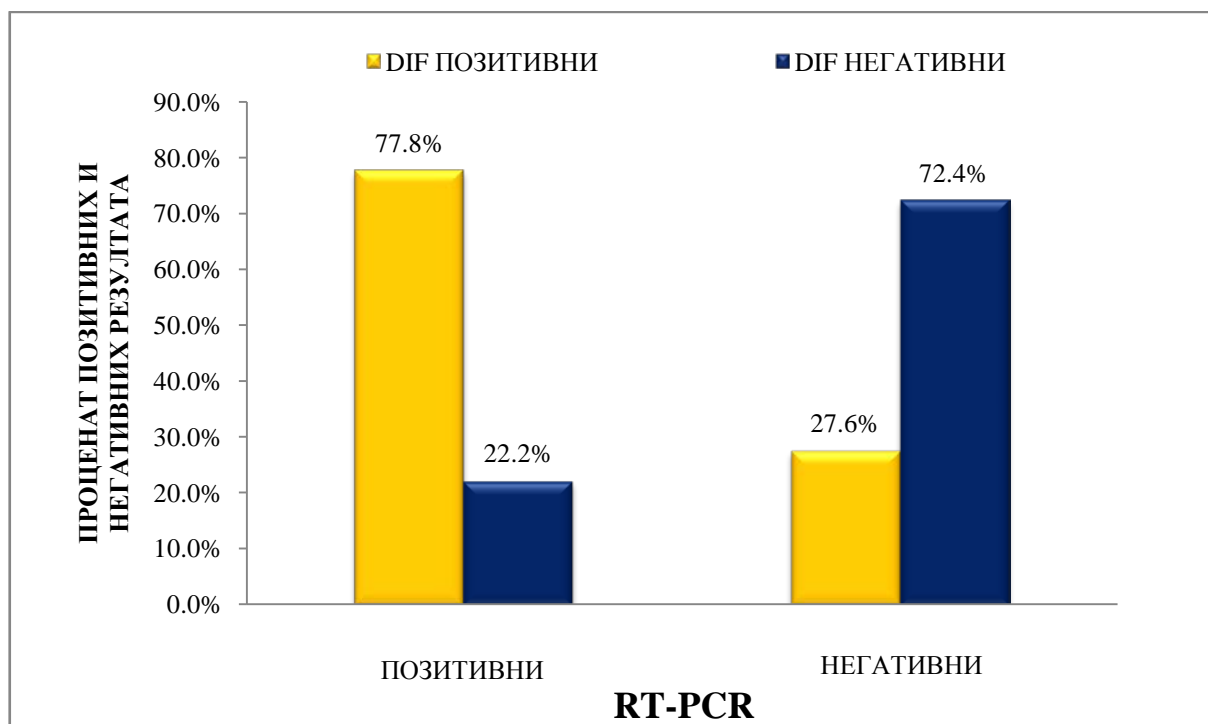
Тестом директне имунофлуоресценције одређивано је присуство антигена *C. trachomatis* у узорку испитаника. Од укупног броја испитаника који су укључени у студију применом ове методе хламидијална инфекција је детектована код 30,4% (68/224) испитаника, док је код 69,6% (156/224) испитаника резултат био негативан.

Брзим тестом је такође одређивано присуство хламидијалних антигена, али је овим тестом хламидијална инфекција детектована код свега 1,4% (3/214) испитаника, док је резултат био негативан код 98,6% (211/214) испитаника. ELISA тестом одређивано је присуство анти-хламидијалних антитела у серуму пацијената. Анализирано је присуство серумских IgA и IgG антитела специфичних за МОРП антиген *C. trachomatis*. IgA серопозитивност на хламидијалне антигене је забележена код 8,1% (18/221) испитаника, док је 91,9% испитаника било серонегативно. У односу на IgA серопозитивне испитанике, забележен је нешто већи проценат IgG серопозитивних испитаника и то 17,2% (38/221) њих, док је 82,8% (183/221) испитаника било серонегативно.

RT-PCR тестом је одређивано присуство специфичних секвенци генома *C. trachomatis* у узорку испитаника. Овим тестом који иначе представља и златни стандард, хламидијална инфекција је детектована код 4,4% (9/205) испитаника, а код 95,6% испитаника резултат теста је био негативан.

#### **4.1.1. Слагање резултата RT-PCR теста за детекцију *C. trachomatis* са резултатима добијеним употребом тестова за детекцију хламидијалних антигена (DIF, BT)**

У даљем приказу резултата анализирани су само пацијенти који су имали комплетиране резултате за све дијагностичке тестове (n=201). На Графикону 2. приказани су резултати детекције *C. trachomatis* DIF и RT-PCR (златни стандард) методом. Применом  $\chi^2$  теста тестирали смо асоцијацију између резултата добијених помоћу ове две методе, а на основу добијених резултата утврђено је постојање лоше асоцијације између ових резултата ( $\chi^2 = 303$ ; df = 1; p < 0.001).



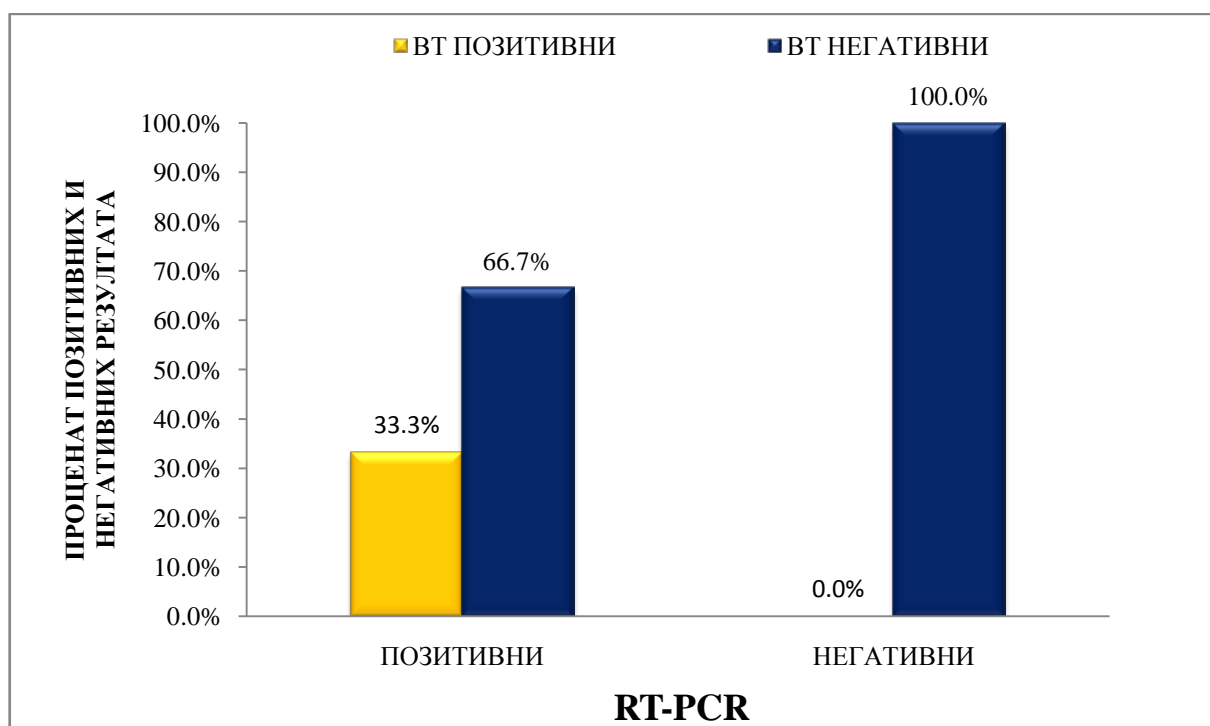
**Графикон 2.** Слагање резултата RT-PCR теста за детекцију *C. trachomatis* са резултатима добијеним тестом директне имунофлуоресценције

У Табели 2. приказани су нумерички подаци добијени употребом DIF и RT-PCR методе. Упоредјујући резултате добијене употребом ове две методе, уочљиво је да је од 9 узорка који су на основу RT-PCR методе били сврстани у групу позитивних налаза, DIF методом потврђена дијагноза код 7 узорка, док су 2 узорка класификована као негативна, што даје проценат неслагања од 22,2% (лажно негативни налази). Са друге стране, од 192 узорка који су RT-PCR методом дефинисана као негативни, чак 53 је употребом DIF методе сврстано у групу позитивних налаза чиме проценат неслагања износи 27,6% (лажно позитивни налази). Сумирајући ове резултате, долазимо до укупног слагања резултата (*ог енл. Overall Agreement – ORA*) од 72,6% коме одговарају вредности укупног неслагања од 27,4%. Релативно низак проценат укупног слагања резултата добијених DIF и RT-PCR методом је потврђен применом *kappa* статистике којом је степен слагања између категоријских параметара добијених овим методама исказан путем индекса *kappa* износио свега 0.1356.

**Табела 2.** Слагање резултата RT-PCR теста за детекцију *C. trachomatis* са резултатима добијеним тестом директне имунофлуоресценције

RT-PCR	DIF		Укупно
	Позитивни	Негативни	
Позитивни	7	2	9
Негативни	53	139	192
Укупно	60	141	201
ORA		0.726	
Карра		0.1356	
$\chi^2$		303; p < 0.001	

На Графикону 3. и Табели 3. приказани су резултати детекције *C. trachomatis* ВТ и RT-PCR методом. Применом  $\chi^2$  теста тестирали смо и асоцијацију између резултата добијених помоћу ове две методе, а на основу добијених резултата утврђено је постојање слабе асоцијације између ових резултата ( $\chi^2 = 4,19$ ; df = 1; p = 0,041). На графикону 3. је јасно уочљиво да је боља асоцијација показана за негативне (100%) него позитивне (33%) резултате.



**Графикон 3.** Слагање резултата RT-PCR теста за детекцију *C. trachomatis* са резултатима добијеним брзим тестом

У Табели 3. приказане су апсолутне вредности добијене употребом ВТ и RT-PCR методе. Упоређивањем резултата добијених употребом ове две дијагностичке методе,

примећујемо да је од 9 узорка који су RT-PCR методом категорисано као позитиван налаз, ВТ методом дијагноза потврђена код свега 3 узорка, док су 6 узорка категорисани као негативан налаз, што даје проценат неслагања од чак 66,7% (лажно негативни резултати). За разлику од позитивних налаза, од 192 узорка који су RT-PCR методом дефинисана као негативни налаз, ВТ методом негативан налаз је потврђен код свих 192 узорка, тако да у групи негативних испитанка практично немамо неслагање резултата (нема лажно позитивних резултата). На крају, долазимо до укупног слагања резултата (ORA) у 97% случајева што одговара вредностима укупног неслагања резултата од 3%. Висок проценат укупног слагања резултата добијених ВТ и RT-PCR методом је потврђен применом карра статистике којом је степен слагања између категоријских параметара добијених овим методама исказан путем индекса карра који износи 0.4885.

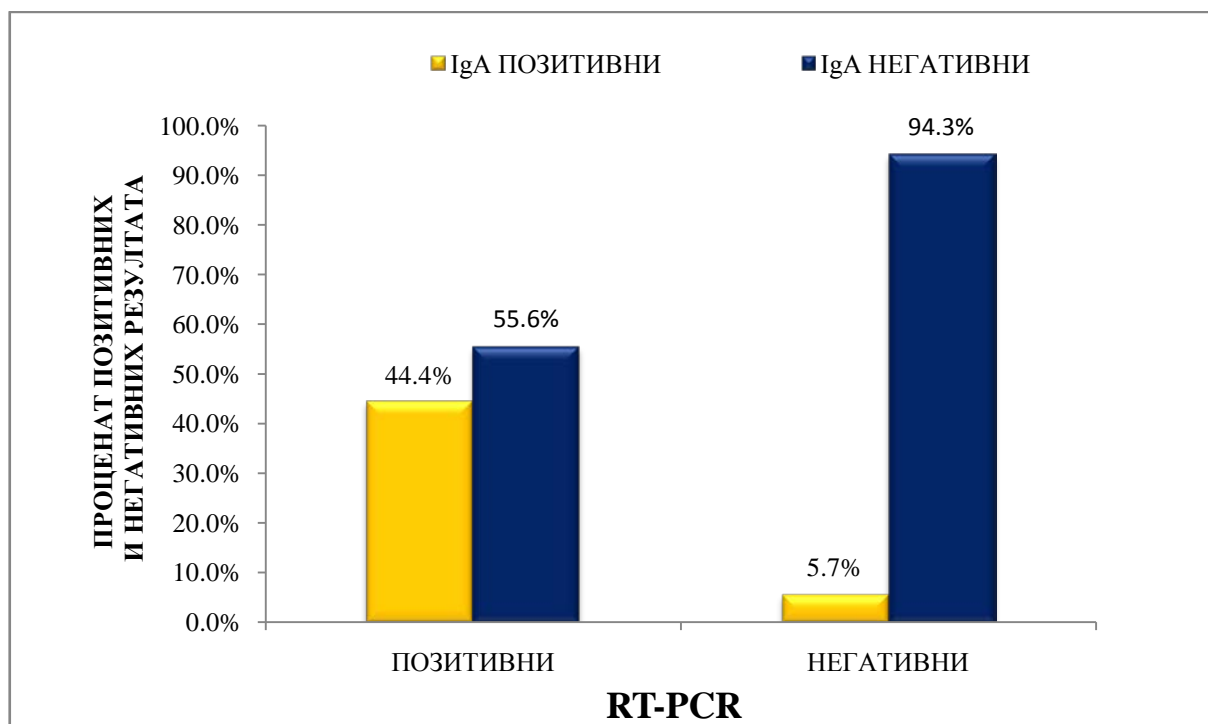
**Табела 3.** Слагање резултата RT-PCR теста за детекцију *C. trachomatis* са резултатима добијеним брзим тестом

RT-PCR	ВТ		Укупно
	Позитивни	Негативни	
Позитивни	3	6	9
Негативни	0	192	192
Укупно	3	198	201
ORA		0,97	
Карра		0,4885	
$\chi^2$		4.19; p = 0.041	

#### 4.1.2. Слагање резултата RT-PCR теста за детекцију *C. trachomatis* са резултатима добијеним употребом ELISA тестова за детекцију серумског нивоа IgA и IgG антитела на хламидијални МОРП антиген

Хламидијалну инфекцију детектовали смо и на основу серолошког одговора, односно серумског нивоа IgA и IgG антитела. Упоредивши резултате RT-PCR теста са резултатима добијеним употребом ELISA теста (IgA антитела), утврђено је постојање слабог слагања добијених резултата што потврђују и резултати  $\chi^2$  теста ( $\chi^2 = 4,19$ ;  $df = 1$ ;  $p < 0,041$ ). Даље, одређујући слагање између позитивних и негативних налаза примећујемо да је слагање било боље код негативних (94,3%) него код позитивних налаза (44,4%) (Графикон 4).





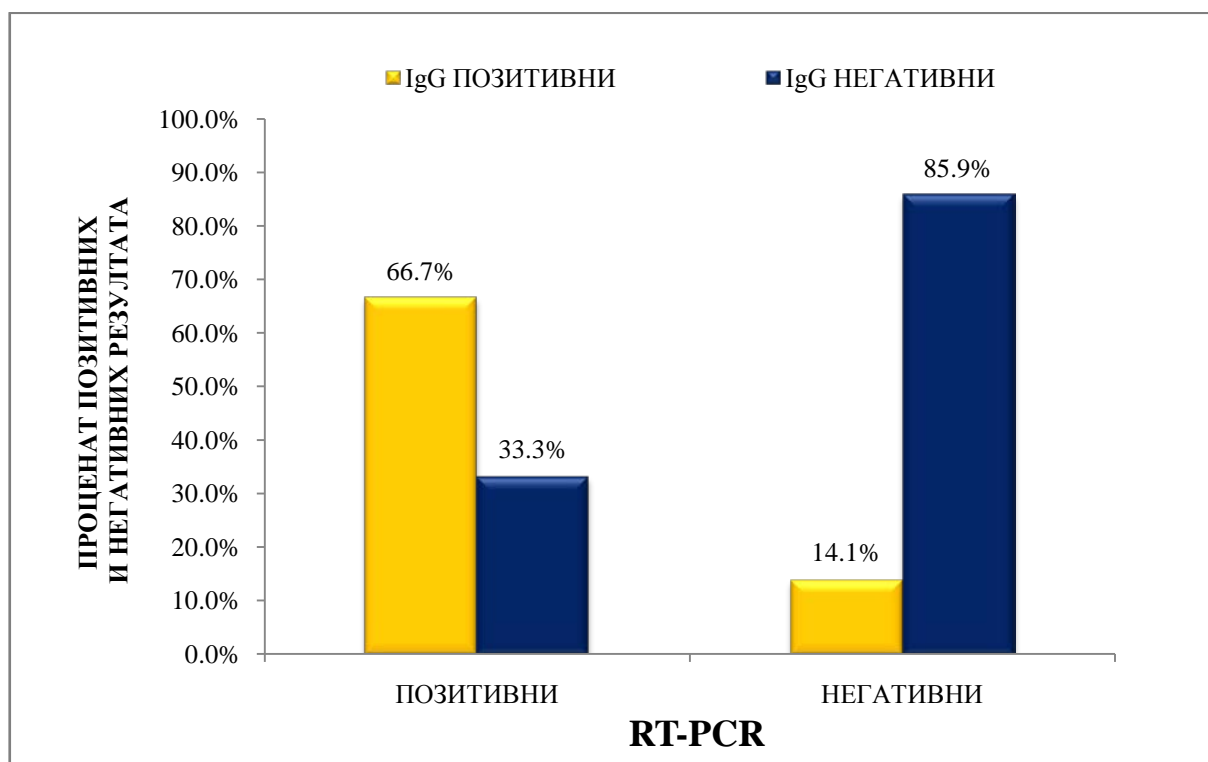
**Графикон 4.** Слагање резултата RT-PCR теста за детекцију *C. trachomatis* са резултатима добијеним употребом ELISA теста за детекцију серумског нивоа IgA антитела на хламидијални МОМР антиген

У Табели 4. приказани су подаци изражени у апсолутним бројевима добијени употребом ELISA (IgA) и RT-PCR методе. Анализирајући податке добијене применом ове две дијагностичке методе, уочавамо да је од 9 узорака који су на основу RT-PCR теста класификовани као позитивни, ELISA (IgA) тестом дијагноза потврђена код свега 4 узорка, док се код 5 узорака не слаже са резултатима RT-PCR теста и сврстава их у групу IgA негативних налаза што чини неслагање од 55,6% (лажно негативни резултати). Насупрот резултатима добијеним у групи позитивних налаза, у групи налаза који су RT-PCR тестом проглашени за негативне је другачије кретање. Наиме, од 192 негативна налаза, само 11 њих је сврстано ELISA тестом у групу IgA позитивних и даје проценат неслагања од 5,7% (лажно позитивни резултати). Финално, долазимо до укупног слагања резултата (ORA) у 92% случајева што одговара вредностима неслагања од 8%. Иако релативно висок, проценат укупног слагања резултата добијених коришћењем ове две методе, ипак је праћен нешто нижим вредностима *каппа* индекса који износи 0,2938.

**Табела 4.** Слагање резултата RT-PCR теста за детекцију *C. trachomatis* са резултатима добијеним употребом ELISA теста за детекцију серумског нивоа IgA антитела на хламидијални MOMP антиген

RT-PCR	IgA		Укупно
	Позитивни	Негативни	
Позитивни	4	5	9
Негативни	11	181	192
Укупно	15	186	201
ORA	0.92		
Карра	0.2938		
$\chi^2$	4.19; p = 0.041		

Посматрајући резултате детекције *C. trachomatis* добијене ELISA (IgG) и RT-PCR методом, примећујемо да постоји лоша сагласност између добијених резултата. Резултати  $\chi^2$  теста такође указују на постојање лоше сагласности између резултата добијених коришћењем споменутих тестова ( $\chi^2 = 67$ ; df = 1; p < 0.001). Даљом анализом резултата јасно запажамо да је боља сагласност показана за негативне (85,9%) него за позитивне налазе (66,7%). (Графикон 5)



**Графикон 5.** Слагање резултата RT-PCR теста за детекцију *C. trachomatis* са резултатима добијеним употребом ELISA теста за детекцију серумског нивоа IgG антитела на хламидијални MOMP антиген

Анализирајући податке добијене употребом ELISA ( IgG) и RT-PCR методе изражене у апсолутним вредностима долазимо до закључка, да је од 9 узорака који су коришћењем RT-PCR методе сврстани у групу позитивних налаза, ELISA (IgG) тест сагласан са дијагнозом код 6 узорака, док су 3 узорка сврстана у групу негативних резултата, што даје проценат неслагања од 33,3% (лажно негативни резултати). Код негативних резултата проценат неслагања је упечатљиво мањи у односу на позитивне и износи 14,1% (лажно позитивни резултати). Заправо, од 192 узорка који су RT-PCR методом сврстани у групу негативних налаза 27 њих је употребом ELISA (IgG) теста проглашено за позитивне налазе. Даље, долазимо до сумарног слагања резултата (ORA) у 85,1 % случајева што одговара вредностима укупног неслагања од 14,9%. Степен слагања између категоријских параметара добијених овим методама је исказан путем индекса *kappa* који износи 0,2317. (Табела 5)

**Табела 5.** Слагање резултата RT-PCR теста за детекцију *C. trachomatis* са резултатима добијеним употребом ELISA теста за детекцију серумског нивоа IgG антитела на хламидијални MOMP антиген

RT-PCR	IgG		Укупно
	Позитивни	Негативни	
Позитивни	6	3	9
Негативни	27	165	192
Укупно	33	168	201
ORA		0.851	
Карра		0.2317	
$\chi^2$		67; p < 0.001	

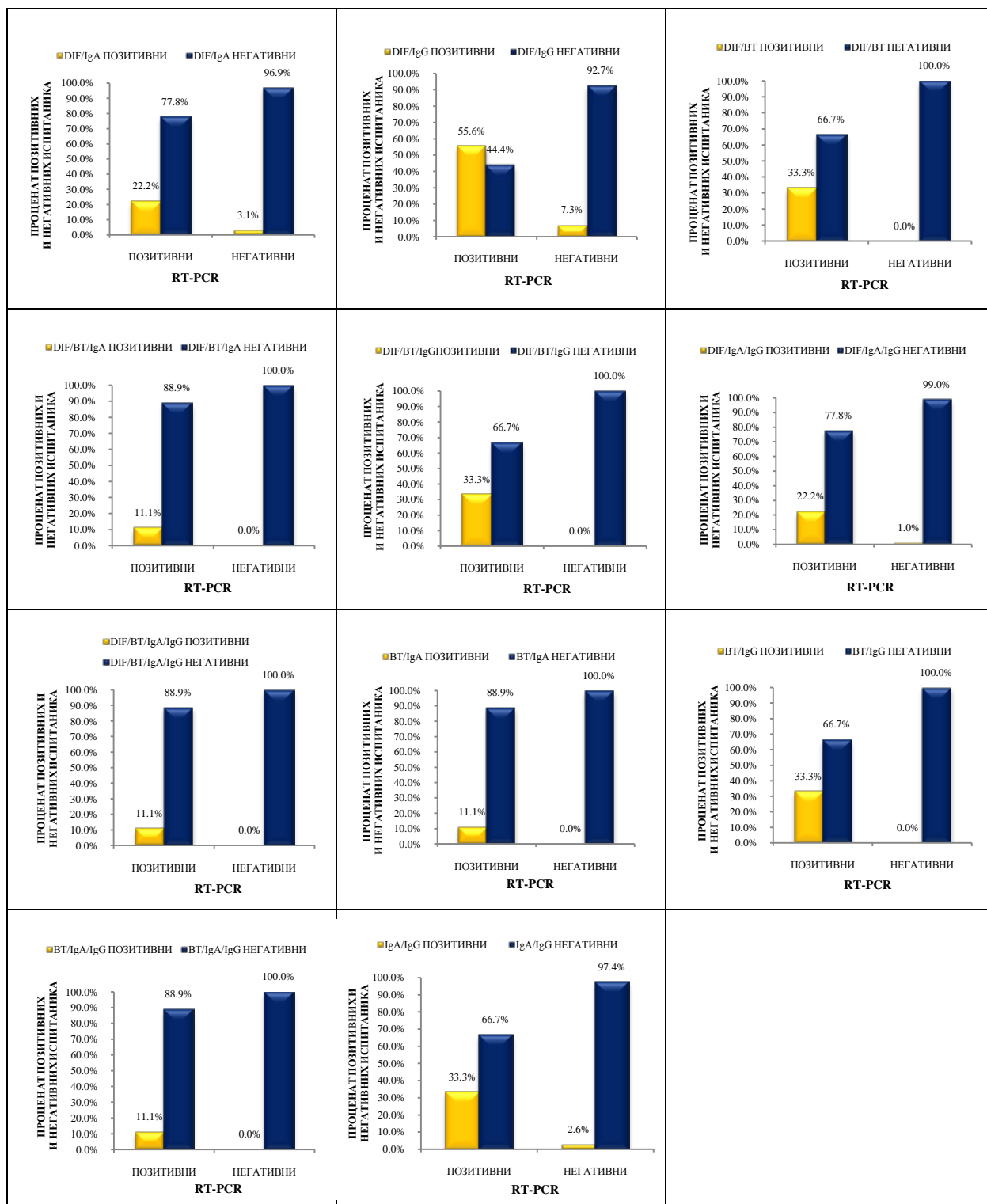
#### **4.1.3. Слагање резултата RT-PCR теста за детекцију *C. trachomatis* са резултатима добијеним комбинацијом тестова – позитивна два или више теста, позитиван било који тест**

Након детаљне анализе дијагностичке ефикасности индивидуалних тестова покушали смо комбинацијом тестова да поправимо ефикасност детекције хламидијалне инфекције у односу на појединачне тестове. Циљ споменутих комбинација је био да проценимо клиничку ефикасност сваке комбинације, одговоримо на питања могу ли оне побољшати откривање гениталне хламидије и да ли су ефикасније од тренутне праксе

појединачних тестова, при томе водећи рачуна и о економској исплативости. Комбинације смо поделили у две групе и у свакој групи урадили све могуће комбинације.

***4.1.3.1. Слањање резултата RT-PCR теста за детекцију C. trachomatis са резултатима добијеним комбинацијом тестова – позитивна два или више теста***

На Графикону 6. и Табели 6. приказани су резултати детекције *C. trachomatis* комбинацијом „позитивна два или више теста“ и RT-PCR теста. Комбинацијом „позитивна два или више теста“ узорци испитаника су били позитивни на хламидијалну инфекцију када су сви тестови који чине комбинацију били позитивни. Анализирали смо слагање резултата једанаест комбинација са резултатима добијеним RT-PCR тестом. Уочавамо да између наведених комбинација тестова постоје јасно изражене варијације тако да ћемо у даљем приказу резултата анализирати само оне комбинације које показују најбоље вредности дијагностичких параметара.



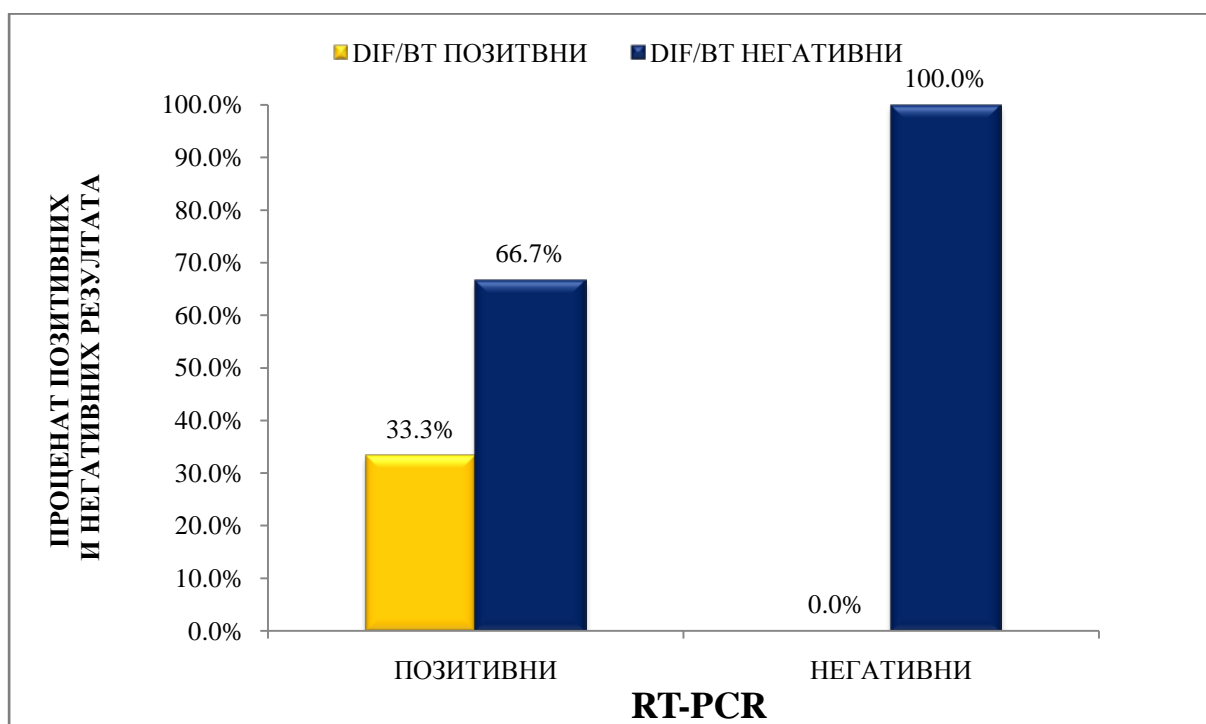
**Графикон 6.** Слагање резултата RT-PCR теста за детекцију *C. trachomatis* са резултатима добијеним комбинацијом „позитивна два или више теста“

Табела 6. Слагање резултата RT-PCR теста за детекцију *S. trachomatis* са резултатима добијеним комбинацијом „позитивна два или више теста“

RT-PCR	DIF+IgA		DIF+IgG		DIF+BT		DIF+BT+IgA		DIF+BT+IgG		DIF+BT+IgA+IgG		BT+IgA+IgG		BT+IgG		BT+IgA		DIF+BT+IgA+IgG		BT+IgA+IgG		BT+IgG		IgA+IgG		Σ
	Поз	Нег	Поз	Нег	Поз	Нег	Поз	Нег	Поз	Нег	Поз	Нег	Поз	Нег	Поз	Нег	Поз	Нег	Поз	Нег	Поз	Нег	Поз	Нег	Поз	Нег	
Поз.	2	7	9	5	4	9	3	6	9	1	8	9	3	6	9	1	8	9	1	8	9	1	8	9	3	6	9
Нег.	6	186	192	14	178	192	0	192	192	0	192	192	2	190	192	0	192	192	0	192	192	0	192	192	0	192	192
Σ	8	193	201	19	182	201	3	198	201	3	198	201	4	197	201	4	197	201	1	200	201	3	198	201	3	198	201
ORA	0.935		0.910		0.97		0.96		0.970		0.955		0.960		0.960		0.960		0.960		0.970		0.960		0.945		
Kappa	0.2148		0.3156		0.4885		0.1928		0.4885		0.2881		0.1928		0.1928		0.1928		0.4885		0.4885		0.4885		0.1928		
χ <sup>2</sup>	0.116;p=0.733		11.6;p=0.001		4.19;p=0.41		7.3;p=0.007		4.19;p=0.041		2.91;p=0.088		7.44;p=0.006		7.44;p=0.006		7.44;p=0.006		4.19;p=0.41		7.44;p=0.006		7.44;p=0.006		0.116;p=0.733		

Од укупно једанаест анализираних комбинација вредности статистичког теста слагања се крећу од 91% - 97%, док су вредности *каппа* индекса од 0,19-0,4885 при чему се две комбинације (DIF+BT; BT+IgG) издвајају као најбоље и показују идентичне вредности дијагностичких параметара. Комбинацијом три дијагностичка теста од којих је један BT (DIF+BT+IgG; BT+IgA+IgG) такође добијамо сличне или исте вредности дијагностичких параметара. (Табела 6.) У даљем излагању приказаћемо комбинацију која показује најбоље слагање.

На Графикону 7. приказани су резултати детекције *C. trachomatis* DIF+BT и RT-PCR методом. Ако направимо паралелу између резултата добјених на овај начин јасно уочавамо да постоји лоше поклапање добијених резултата, што потврђују и резултати  $\chi^2$  теста ( $\chi^2 = 4,19$ ;  $df = 1$ ;  $p < 0.041$ ). Евидентно је да слабо поклапање резултата постоји, али са јасном разликом између позитивних (33,3%) и негативних налаза (100%).



**Графикон 7.** Слагање резултата RT-PCR теста за детекцију *C. trachomatis* са резултатима добијеним комбинацијом „позитивна два или више теста“

Упоредном анализом резултата добијених употребом DIF+BT и RT-PCR методом, примећујемо да је од 9 узорка који су на основу RT-PCR теста проглашени за позитивне комбинација DIF+BT одобрава дијагнозу код 3 узорка, док су 6 узорка проглашена за негативне што даје проценат неслагања од 66,6% (лажно негативни резултати). Обзиром да су се ове две дијагностичке методе сложиле у дијагнози негативних резултата, нема лажно позитивних резултата. На крају, долазимо до сумарног слагања од 97% што одовара вредностима укупног неслагања од 3%. Резултати добијени DIF+BT и RT-PCR методом показују висок проценат укупног слагања што потврђује и индекс *каппа* који износи 0,4885. (Табела 7.)

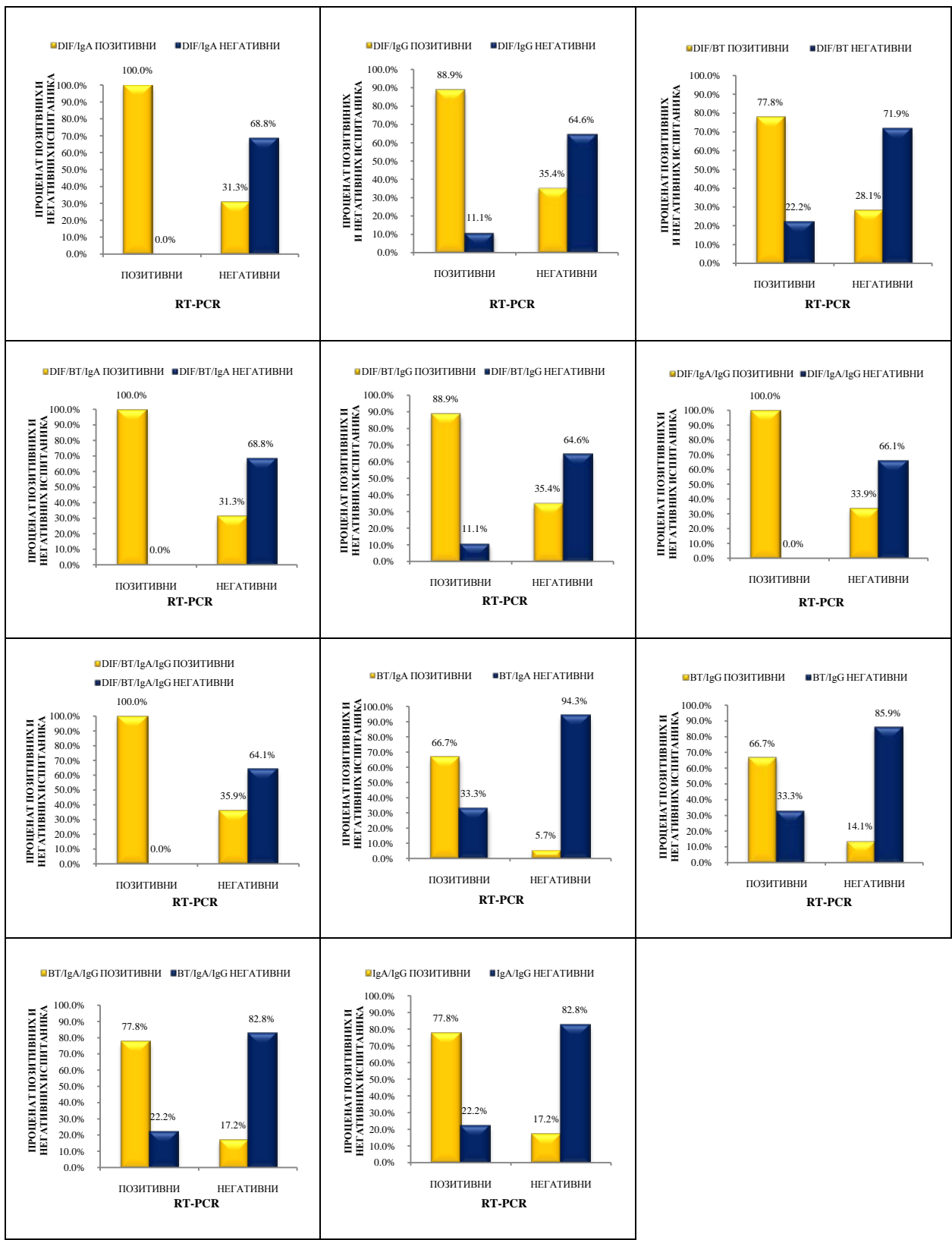
**Табела 7.** Слагање резултата RT-PCR теста за детекцију *C. trachomatis* са резултатима добијеним комбинацијом „позитивна два или више теста“

RT-PCR	DIF+BT		Укупно
	Позитивни	Негативни	
Позитивни	3	6	9
Негативни	0	192	192
Укупно	3	198	201
ORA		0.970	
Каппа		0.4885	
$\chi^2$		4.19; p = 0.041	

#### 4.1.3.2. Слагање резултата RT-PCR теста за детекцију *C. trachomatis* са резултатима добијеним комбинацијом тестова – позитиван било који тест

Детаљно смо анализирали слагање резултата детекције *C. trachomatis* добијених комбинацијом „позитиван било који тест“ и RT-PCR методом. Узорци испитаника су сматрани позитивним на хламидијалну инфекцију када је било који тест који чини комбинацију био позитиван. У овој групи испитали смо 11 комбинација и анализирали слагање резултата сваке комбинације са златним стандардом (Графикон 8).





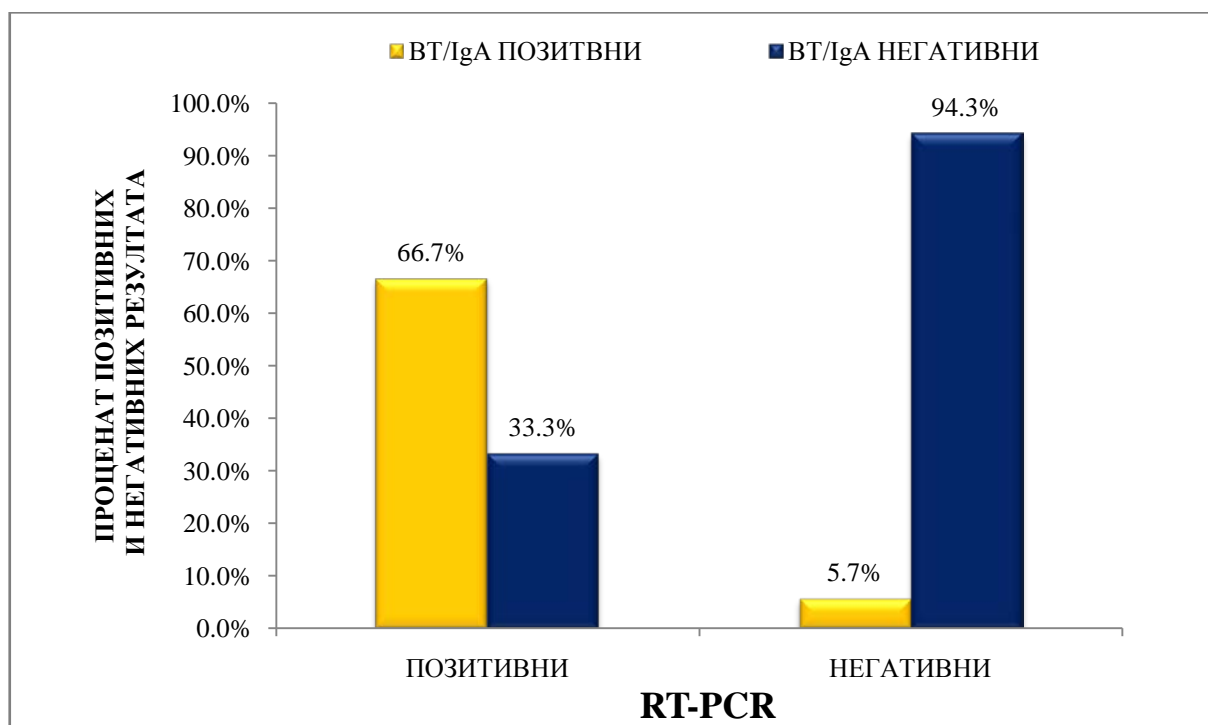
Графикон 8. Слагање резултата RT-PCR теста за детекцију *C. trachomatis* са резултатима добијеним комбинацијом „позитиван било који тест“

Табела 8. Слагање резултата RT-PCR теста за детекцију *S. trachomatis* са резултатима добијеним комбинацијом „позитивн било који тест“

RT-PCR	DIF/IgA		DIF/IgG		DIF/BT		DIF/BT/IgA		DIF/BT/IgG		DIF/IgA + IgG		DIF/BT/IgA/IgG		BT/IgA		BT/IgG		BT/IgA/IgG		IgA/IgG		
	Поз	Нег	Поз	Нег	Поз	Нег	Поз	Нег	Поз	Нег	Поз	Нег	Поз	Нег	Поз	Нег	Поз	Нег	Поз	Нег	Поз	Нег	
Поз.	9	0	9	8	1	9	9	0	8	1	9	9	0	9	9	0	9	6	3	9	7	2	9
Нег.	60	132	192	68	124	192	60	132	68	124	192	65	127	69	123	192	11	181	27	165	33	159	192
Σ	69	132	201	76	125	201	69	132	76	125	201	74	127	78	123	201	17	184	33	168	40	161	201
ORA	0,701		0,657		0,721		0,701		0,657		0,677		0,657		0,930		0,851		0,826		0,826		
Kappa	0,1646		0,1176		0,1323		0,1646		0,1176		0,1489		0,1377		0,4280		0,2317		0,2294		0,2294		
χ <sup>2</sup>	419;p<0.001		522;p<0.001		315;p<0.001		419;p<0.001		522;p<0.001		522;p<0.001		554;p<0.001		7.44;p=0.006		67;p<0.001		112;p<0.001		112;p<0.001		

У Табели 8. приказани су нумерички подаци добијени комбинацијом „позитиван било који тест“ и RT-PCR методом. Такође је анализирано 11 комбинација код којих се вредности ORA крећу од 65,7%-93%, а вредности индекса *kappa* од 0,1176-0,4280. На основу вредности дијагностичких параметара, одабраћемо и приказати најбољу комбинацију тестова у даљем приказу резултата.

Компарацијом резултата детекције *C. trachomatis* добијених комбинацијом тестова ВТ/IgА и RT-PCR тестом, долазимо до закључка да постоји лоше подударање резултата добијених употребом ове две методе, што подржавају и резултати  $\chi^2$  теста ( $\chi^2 = 7,44$ ;  $df = 1$ ;  $p < 0.006$ ). Јасно је да лоше слагање резултата постоји, уз напомену да је проценат слагања знатно већи у групи негативних налаза (94,3%) у односу на групу позитивних налаза (66,7%). (Графикон 9.)



**Графикон 9.** Слагање резултата RT-PCR теста за детекцију *C. trachomatis* са резултатима добијеним комбинацијом „позитиван било који тест“

Од укупног броја испитаника који су се тестирали на хламидијалну инфекцију ВТ/IgА комбинацијом и RT-PCR методом, инфекција је потврђена RT-PCR методом код 9 испитаника, а комбинација ВТ/IgА је потврдила присуство инфекције код 6 испитаника, док су 3 класификована као негативна што даје проценат неслагања од 33,3% (лажно

негативни резултати). Од 192 узорка који су RT-PCR тестом сврстана у групу негативних, свега 11 је употребом комбинације ВТ/IgА распоређено у групу позитивних налаза што даје низак проценат неслагања од 5,7% (лажно позитивни налази). На крају, долазимо до збирног слагања резултата од 93% што одговара вредностима укупног слагања од 7%. Висок проценат укупног слагања резултата добијених комбинацијом ВТ/IgА и RT-PCR методом је потврђен и *kappa* статистиком односно *kappa* индексом који износи 0,4280. (Табела 9.)

**Табела 9.** Слагање резултата RT-PCR теста за детекцију *C. trachomatis* са резултатима добијеним комбинацијом „позитивн било који тест“

RT-PCR	ВТ/IgА		Укупно
	Позитивни	Негативни	
Позитивни	6	3	9
Негативни	11	181	192
Укупно	17	184	201
ORA		0.930	
Карра		0.4280	
$\chi^2$		7.44; p = 0.006	

## 4.2. Дијагностичка ефикасност тестова

Након опсежне анализе резултата слагања RT-PCR теста за детекцију *C. trachomatis*, који је у нашој студији коришћен као златни стандард, са резултатима добијеним употребом појединачних скрининг тестова (DIF, ВТ, ELISA – IgА и IgG) као и са резултатима добијеним комбинацијом тестова „позитивна два или више теста“ и „позитиван било који тест“ испитали смо и дијагностичку ефикасност тестова и комбинација тестова.

### 4.2.1. Дијагностичка ефикасност појединачних тестова (DIF, ВТ, ELISA)

На основу добијених вредности сензитивности, специфичности, позитивне предиктивне вредности (PPV), негативне предиктивне вредности (NPV) и других параметара одређивали смо дијагностичку ефикасност најчешће коришћених тестова у досадањој пракси за дијагнозу хламидијалне инфекције. Сензитивност анализираних тестова креће се од 33,3% - 77,8%. DIF метода показује највећи проценат сензитивности

од 77,8%. ELISA (IgG) тест показује бољу сензитивност (66,7%) у односу на ELISA (IgA), (44,4%) а убедљиво најниже вредности сензитивности показује ВТ (33,3%). Све методе одржавају високе вредности специфичности (72,4% - 100%) и негативне предиктивне вредности (96,9% - 98,6%). Међутим, убедљиво највишу специфичност има ВТ (100%), и тако високу специфичност прати и висока позитивна предиктивна вредност (100%). У циљу одабира теста који показује најбољу дијагностичку ефикасност, израчунали смо Јуденов индекс који одражава најбољи баланс сензитивности и специфичности. Према Јуденовом индексу, ELISA (IgG) (52,6%) и DIF (50,2%) методе се издвајају и показују најбољу равнотежу сензитивности и специфичности. Даље, како би поред сензитивности и специфичности узели у обзир позитивну и негативну предиктивну вредност, израчунали смо и проширени Јуденов индекс. Од свих анализираних тестова ВТ показује највиши проширени Јуденов индекс од 130,3% као и дијагностичку тачност од 97%. (Табела 10.)

**Табела 10.** Дијагностичка ефикасност појединачних тестова (DIF, ВТ, ELISA) за детекцију *C. trachomatis*

Статистика	<i>DIF</i>	<i>RT</i>	<i>IgA</i>	<i>IgG</i>
Сензитивност	77,8%	33,3%	44,4%	66,7%
Специфичност	72,4%	100,0%	94,3%	85,9%
Позитиван однос вероватноће	2.8	/	7,8	4,7
Негативан однос вероватноће	0.3	0,7%	0,6	0,4
Преваленца болести	4,5%	4,5%	4,5%	4,5%
Позитивна предиктивна вредност	11,7%	100,0%	26,7%	18,2%
Негативна предиктивна вредност	98,6%	96,9%	97,3%	98,2%
Јуденов индекс	50,2%	33,3%	38,7%	<b>52,6%</b>
Проширени Јуденов индекс	60,4%	<b>130,3%</b>	62,7%	69,0%
Дијагностичка тачност	72,6%	<b>97,0%</b>	92,0%	85,1%

#### **4.2.2. Дијагностичка ефикасност комбинације тестова - „позитивна два или више теста“**

Комбинацијом тестова „позитивна два или више теста“ (Табела 10) очували смо високе вредности специфичности (92,7% - 100%), али уз знатан пад сензитивности (11,1% - 55,6%). Комбинација DIF+IgG има највећи проценат сензитивности од 55,6% уз високу специфичност од 92,7%, све остале комбинације показују ниску сензитивност уз високу специфичност. Према вредностима Јуденовог индекса и даље се издваја комбинација DIF+IgG (48,3%) која показује и најбоље избалансиран однос сензитивности и специфичности. Ако узмемо у обзир PPV и NPV односно израчунамо проширени Јуденов индекс долази до промене ситуације. Наиме, комбинације DIF+BT, DIF+BT+IgG, BT+IgG уз ниску сензитивност, али високе вредности специфичности, PPV и NPV показују највеће вредности проширеног Јуденовог индекса од 130,3% уз високе вредности укупне дијагностичке тачности од 97%. (Табела 11.)

Табела 11. Дијагностичка ефикасност комбинације тестова „позитивна два или више теста“ за детекцију *S. trachomatis*

Статистика	DIF+Ig A	DIF+IgG	DIF+BT	DIF+BT +IgA	DIF+BT +IgG	DIF+IgA +IgG	DIF+BT+ IgA+IgG	BT+IgA	BT+IgG	BT+Ig A+IgG	IgA+Ig G
Сензитивност	22,2%	55,6%	33,3%	11,1%	33,3%	22,2%	11,1%	11,1%	33,3%	11,1%	33,3%
Специфичност	96,9%	92,7%	100,0%	100,0%	100,0%	98,9%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	97,4%
Позитиван однос вероватноће	7,1	7,6	/	/	/	21,3	/	/	/	/	12,8
Негативан однос вероватноће	0,8	0,5	0,7	0,9	0,7	0,8	0,9	0,9	0,7	0,9	0,7
Преваленца болести	4,5%	4,5%	4,5%	4,5%	4,5%	4,5%	4,5%	4,5%	4,5%	4,5%	4,5%
Позитивна предиктивна вредност	25,0%	26,3%	100,0%	100,0%	100,0%	50,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	37,5%
Негативна предиктивна вредност	96,4%	97,8%	97,0%	96,0%	97,0%	96,5%	96,0%	96,0%	96,7%	96,0%	96,9%
Јуденов индекс	19,1%	<b>48,3%</b>	33,3%	11,0%	33,3%	21,2%	11,1%	11,1%	33,3%	11,1%	30,7%
Проширени Јуденов индекс	40,5%	72,4%	<b>130,3%</b>	107,0%	<b>130,3%</b>	67,7%	107,1%	107,1%	<b>130,9%</b>	107,1%	65,1%
Дијагностичка тачност	93,5%	91,0%	<b>97,0%</b>	96,0%	<b>97,0%</b>	95,5%	96,0%	96,0%	<b>97,0%</b>	96,0%	94,5%

#### **4.2.3. Дијагностичка ефикасност комбинације тестова - „позитиван било који тест“**

Табела 12. приказује сензитивност, специфичност, позитивну и негативну предиктивну вредност и остале параметре дијагностичке ефикасности комбинације тестова „позитиван било који тест“. На овај начин поправили смо вредности сензитивности (66,7% - 100%) уз блажи пад специфичности (64,1% - 94,3%). Комбинације DIF/IgA, DIF/VT/IgA и DIF/IgA/IgG показују супериорну сензитивност од 100% уз задовољавајућу специфичност преко 60%. Споменути комбинацијама приближили смо вредности сензитивности и специфичности, односно довели смо их у бољу равнотежу. Према Јуденовом индексу комбинације DIF/IgA, DIF/VT/IgA (68,8%) показују најбољи баланс сензитивности и специфичности. PPV вредност свих анализираних комбинација тестова је драстично пала (10,5% - 35,3%) док је NPV задржала високе вредности (98,2% - 100%). На основу резултата проширеног Јуденовог индекса узимајући у обзир PPV и NPV комбинација VT/IgA показује највише вредности од 94,6%, као и највише вредности укупне дијагностичке тачности од 93,0%.



Табела 12. Дијагностичка ефикасност комбинације тестова "позитиван било кој тест" за детекцију *S. trachomatis*

Статистика	DIF/IgA	DIF/IgG	DIF/BT	DIF/BT/ IgA	DIF/BT/ IgG	DIF/IgA/ IgG	DIF/BT/ IgA/IgG	BT/IgA	BT/IgG	BT/IgA /IgG	IgA/IgG
Сензитивност	100.0%	88.9%	77.8%	100.0%	88.9%	100.0%	100.0%	66.7%	66.7%	77.8%	77.8%
Специфичност	68.8%	64.6%	71.9%	68.8%	64.6%	66.2%	64.1%	94.3%	85.9%	82.8%	82.8%
Позитиван однос вероватноће	3.2	2.5	2.8	3.2	2.5	3.0	2.8	11.6	4.7	4.5	4.5
Негативан однос вероватноће	0	0.2	0.3	0	0.2	0	0	0.4	0.4	0.3	0.3
Преваленца болести	4.5%	4.5%	4.5%	4.5%	4.5%	4.5%	4.5%	4.5%	4.5%	4.5%	4.5%
Позитивна предиктивна вредност	13.0%	10.5%	11.5%	13.0%	10.5%	12.2%	11.5%	35.3%	18.2%	17.5%	17.5%
Негативна предиктивна вредност	100.0%	99.2%	98.6%	100.0%	99.2%	100.0%	100.0%	98.4%	98.2%	98.8%	98.8%
Јуденов индекс	<b>68.8%</b>	53.5%	49.7%	<b>68.8%</b>	53.5%	66.1%	64.1%	60.9%	52.6%	60.6%	60.6%
Проширени Јуденов индекс	81.8%	63.2%	59.7%	81.8%	63.2%	78.3%	75.6%	94.6%	69.0%	76.9%	76.9%
Дијагностичка тачност	70.2%	65.7%	72.1%	70.2%	65.7%	67.7%	65.7%	<b>93.0%</b>	85.1%	82.6%	82.6%

Сумарно, на основу резултата тестова слагања и параметара дијагностичке ефикасности издвојили смо појединачне тестове (BT, DIF, IgG), комбинације тестова „позитивна два или више теста“ (DIF+BT, DIF+IgG, BT+IgG) и „позитиван било који тест“ (BT/IgA, DIF/IgA) који показују најбоље вредности дијагностичких параметара. (Табела 13.) Упоредном анализом појединачних тестова очигледно је да и поред ниске сензитивности, најбољу дијагностичку ефикасност, по већини параметара (ORA, карра, специфичност, PPV, проширени Јуденов индекс уз високу NPV и дијагностичку тачност) показује BT. Међутим, ако кажемо да су основни показатељи који указују на дијагностичку ефикасност и перформансе неког теста сензитивност и специфичност, уз напомену да у клиничкој пракси не постоји дијагностички тест који је 100% сензитиван и 100% специфичан, долази до промене. Наиме, у овом другом случају можда треба дати предност тестовима који показују најбољи баланс сензитивности и специфичности што би у нашем случају свакако био DIF (сен:77,8%; спец:72,4%). Уколико је то могуће, бољи резултати се постижу комбинацијом различитих тестова, чиме се дијагностичка ефикасност тестова може подићи на виши ниво. Комбинације DIF+BT и BT+IgG не поправљају дијагностичку ефикасност када се упореде са брзим тестом који је појединачно имао најбоље параметре. Када се комбинација DIF+IgG упореди са DIF и IgG појединачним тестовима, дијагностичка ефикасност је већа (повећава се ORA, карра, специфичност и PPV, али сензитивност пада), док у односу на BT (сен: 33,3%; спец:100,0%) показује боље избалансиран однос сензитивности (55,6%) и специфичности (92,7%). Комбинација BT/IgA поред високих вредности ORA и карра показује и добро избалансиран однос сензитивности и специфичности уз високу специфичност од 94,3%. Са друге стране комбинација DIF/IgA показује високу сензитивност од чак 100% уз добро избалансиран однос сензитивности и специфичности. (Табела 13.)

Закључно, тест који је високо сензитиван, уз не тако добру специфичност, је погодан за скрининг тест. На основу тога, наша препорука је да се у случајевима када је немогуће радити PCR методу користи комбинација DIF/IgA управо због супериорне сензитивности од 100%. Тако да ћемо овом комбинацијом тестова регистровати све позитивне налазе, односно нећемо имати лажно негативних резултата што је и основна улога скрининг теста. Међутим нижа специфичност (68,8%) ове комбинације тестова значи да ће ова комбинација тестова бити лажно позитивна код 31,2% особа које немају

хламидијалну инфекцију. У ситуацијама које захтевају високу специфичност препоручена комбинација је ВТ/IgA, која као високо специфичан тест има мало лажно позитивних резултата док комбинације DIF+BT и BT+IgG иако показују специфичност од 100%, имају ниску сензитивност (33,3%), због чега смо и дали предност комбинацији ВТ/IgA.

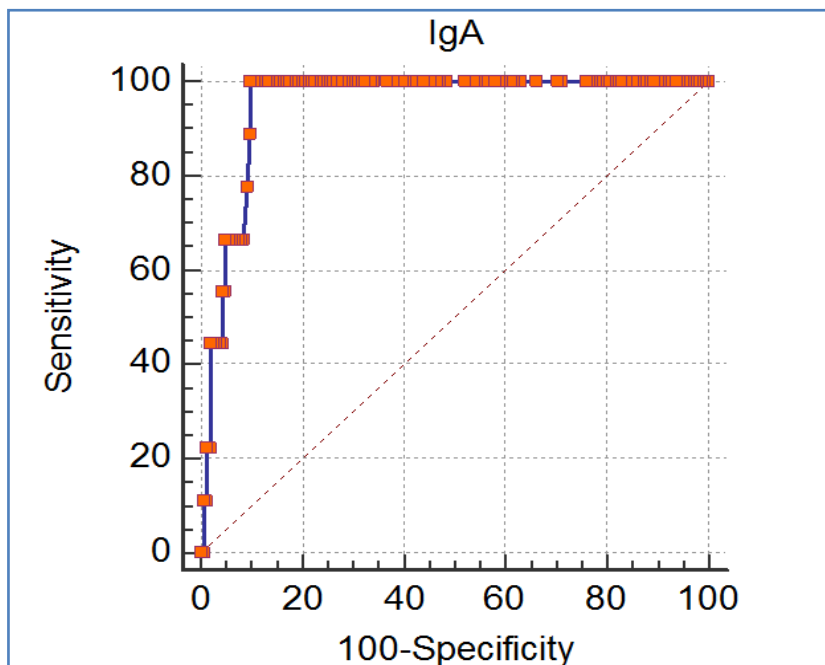
**Табела 13.** Упоредна анализа резултата тестова слагања и параметара дијагностичке ефикасности појединачних тестова и комбинација тестова „позитивна два или више теста“, позитиван било који тест

Статистика	BT	DIF	IgG	DIF + BT	DIF + IgG	BT + IgG	BT / IgA	DIF / IgA
$\chi^2$	4,19 p=0,041)	303 (p<0,001)	67 (p<0,001)	4,19 (p=0,041)	11,6 (p=0,001)	4,19 (p=0,041)	7,44 (p=0,006)	419 (p<0,001)
ORA	0,97	0,73	0,85	0,97	0,91	0,97	0,93	0,70
Карра	0,49	0,14	0,23	0,49	0,32	0,49	0,43	0,16
Сензитивност	33,3%	77,8%	66,7%	33,3%	55,6%	33,3%	66,7%	100,0%
Специфичност	100,0%	72,4%	85,9%	100,0%	92,7%	100,0%	94,3%	68,8%
Позитиван однос вероватноће	/	2,8	4,7	/	7,6	/	11,6	3,2
Негативан однос вероватноће	0,7%	0,3	0,4	0,7	0,5	0,7	0,4	/
Преваленца болести	4,5%	4,5%	4,5%	4,5%	4,5%	4,5%	4,5%	4,5%
Позитивна предиктивна вредност	100,0%	11,7%	18,2%	100,0%	26,3%	100,0%	35,3%	13,0%
Негативна предиктивна вредност	97,0%	98,6%	98,2%	97,0%	97,8%	97,0%	98,4%	100,0%
Јуденов индекс	33,3%	50,2%	52,6%	33,3%	48,3%	33,3%	60,9%	68,8%
Проширени Јуденов индекс	130,3%	60,4%	69,0%	130,3%	72,4%	130,3%	94,6%	81,8%
Дијагностичка тачност	97,0%	72,6%	85,1%	97,0%	91,0%	97,0%	93,0%	70,2%

### 4.3. ROC анализа серумског нивоа IgA и IgG антитела на хламидијални МОРМ антиген

Хламидијална инфекција је поред осталих метода детектована и помоћу серумског нивоа IgA антитела на хламидијални МОРМ антиген на основу *cut-off* вредности ( $S/Co \geq 1,1$ ) препоручене од стране произвођача теста (Euroimmun, Lubeck, Germany). У циљу боље анализе и побољшања дијагностичке ефикасности теста урађена је ROC (*ог енл. Receiver Operating Characteristic Curve*) анализа серумског нивоа IgA антитела на хламидијални МОРМ антиген, а на основу карактеристика ROC криве ( $p < 0,01$ ;  $AUC = 0,952$ ) дефинисана је нова *cut-off* вредност ( $S/Co \geq 0,87$ ). (Графикон 10.)

Резултати анализе добијени на основу нових вредности су показали да се дијагностичка ефикасност овог теста може поправити у односу на резултате добијене на основу *cut-off* вредности препоручене од стране произвођача теста. (Табела 14. и 15.)



**Графикон 10.** ROC крива серумског нивоа IgA антитела на хламидијални MOMP антиген

Иако је дијагностичка тачност теста коју смо добили анализом резултата на предходно описане начине веома слична, применом нове *cut-off* вредности, уз очувану специфичност (90,2%) значајно су поправљене вредности сензитивности (77,8%) и Јуденовог индекса (67,9%) су готово два пута веће у односу на резултате добијене на основу *cut-off* вредности препоручене од стране произвођача теста а значајно је повећана и вредност проширеног Јуденовог индекса (97,1%). (Табела 14. и 15.)

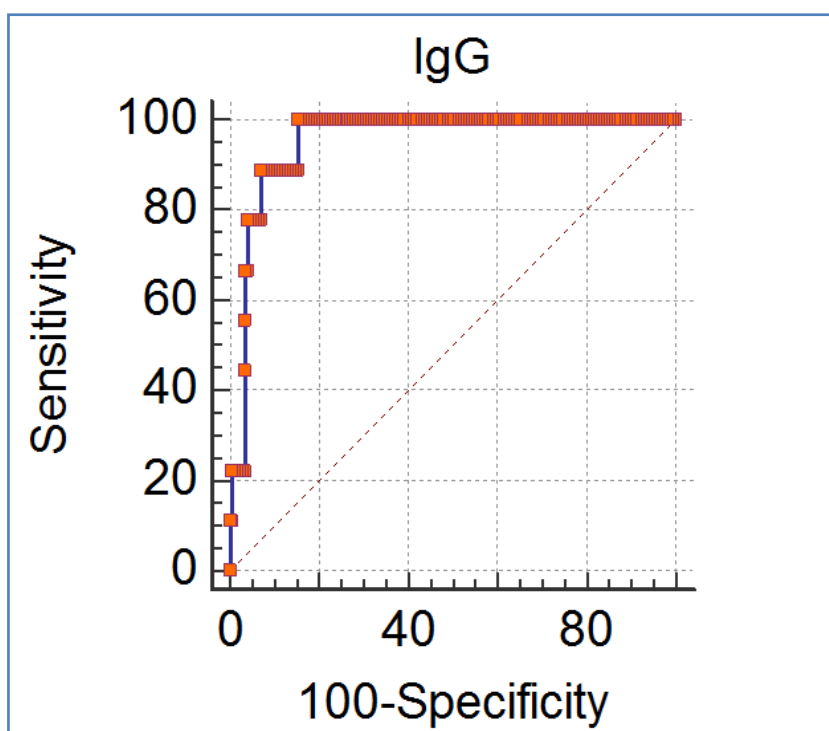
**Табела 14.** Дијагностичка ефикасност IgA антитела на хламидијални MOMP антиген на основу Cut-off вредности препоручених од стране произвођача теста

<b>IgAcut-off S/Co <math>\geq</math> 1.1</b>			
<b>RT-PCR</b>	<b>Позитивни</b>	<b>Негативни</b>	
Позитивни	4	5	9
Негативни	11	152	163
Укупно	15	157	172
	<b>Позитивни</b>	<b>Негативни</b>	
Позитивни	44.4%	55.6%	9.3%
Негативни	6.7%	93.3%	
$\chi^2$ ORA	$\chi^2 = 4.22$ ; $df = 1$ ; $p = 0.040$ 0.907		
Карра	0.2867		
<b>Статистика</b>	<b>Вредности</b>	<b>95% CI</b>	
Сензитивност	44.44%	13.70% до 78.80%	
Специфичност	93.25%	88.98% до 96.58%	
Позитиван однос вероватноће	6.59	2.61 до 16.46	
Негативан однос вероватноће	0.6	0.33 до 1.07	
Преваленца болести	5.23%	2.42% до 9.7%	
Позитивна предиктивна вредност	26.67%	12.58% до 47.88%	
Негативна предиктивна вредност	96.82%	94.42% до 98.20%	
Јуденов индекс	37.69%		
Проширен Јуденов индекс	61.18%		
Дијагностичка тачност	90.70%	85.33% до 94.59%	

**Табела 15.** Дијагностичка ефикасност IgA антитела на хламидијални MOMP антиген на основу Cut-off вредности дефинисаних ROC анализом

<b>IgAcut-off S/Co <math>\geq</math> 0.87</b>			
<b>RT-PCR</b>	<b>Позитивни</b>	<b>Негативни</b>	
Позитивни	7	2	9
Негативни	16	147	163
Укупно	23	149	172
	<b>Позитивни</b>	<b>Негативни</b>	
Позитивни	77.8%	22.2%	10.5%
Негативни	9.8%	90.2%	
$\chi^2$ ORA	$\chi^2 = 23.0$ ; $df = 1$ ; $p < 0.001$ 0.895		
Карра	0.3917		
<b>Statistic</b>	<b>Вредности</b>	<b>95% CI</b>	
Сензитивност	77.78%	39.99% до 97.19%	
Специфичност	90.18%	84.55% до 94.28%	
Позитиван однос вероватноће	7.92	4.43 до 14.18	
Негативан однос вероватноће	0.25	0.07 до 0.84	
Преваленца болести	5.23%	2.42% до 9.70%	
Позитивна предиктивна вредност	30.43%	19.65% до 43.91%	
Негативна предиктивна вредност	98.66%	95.58% до 99.60%	
Јуденов индекс	67.96%		
Проширен Јуденов индекс	97.05%		
Дијагностичка тачност	89.53%	83.97% до 93.68%	

Поред серумског нивоа IgA, хламидијалну инфекцију смо детектовали и на основу серумског нивоа IgG антитела на хламидијални MOMP антиген користећи *cut-off* вредности ( $\geq 22$  RU/ml) препоручене од стране произвођача (Euroimmun, Lubeck, Germany). И у овом случају дијагностичка ефикасност теста је била на незадовољавајућем нивоу, те смо сходно томе у циљу боље анализе и побољшања дијагностичке ефикасности овог теста урадили ROC анализу серумског нивоа IgG, а на основу карактеристика ROC криве ( $p < 0,01$ ; AUC=0,954) дефинисана је нова *cut-off* вредност ( $S/Co = 17,57$ ) (Графикон 11). Као и у случају серумског нивоа IgA ROC анализа је потврдила да се дијагностичка ефикасност овог теста може поправити применом ново дефинисане *cut-off* вредности (Табела 16 и 17).



**Графикон 11.** ROC крива серумског нивоа IgG антитела на хламидијални MOMP антиген

Евалуацијом дијагностичке ефикасности IgG антитела на хламидијални MOMP антиген на основу нове *cut-off* вредности (IgG: Ru/ml  $\geq 17,57$ ) показали смо да је уз супериорну сензитивност (100,0%) и очувану специфичност (83,4%) дијагностичка ефикасност теста значајно повећана и у случају Јуденовог индекса (83,4%) и проширеног Јуденовог индекса који износи чак 108,4%. (Табела 17)

**Табела 16.** Дијагностичка ефикасност IgG антитела на хламидијални MOMP антиген на основу *Cut-off* вредности препоручених од стране произвођача теста

<b>IgGcut-off ≥ 22 RU/ml</b>			
<b>RT-PCR</b>	<b>Позитивни</b>	<b>Негативни</b>	
Позитивни	6	3	9
Негативни	26	137	163
Укупно	32	140	172
	<b>Позитивни</b>	<b>Негативни</b>	
Позитивни	66.7%	33.3%	16.9%
Негативни	16.0%	84.1%	
$\chi^2$ ORA	$\chi^2 = 62; df = 1; p < 0.001$ 0.831		
Карра	0.2298		
<b>Статистика</b>	<b>Вредности</b>	<b>95% CI</b>	
Сензитивност	66.67%	29.99% до 97.19%	
Специфичност	84.05%	77.51% до 89.31%	
Позитиван однос вероватноће	4.18	2.34 до 7.47	
Негативан однос вероватноће	0.4	0.16 до 1.00	
Преваленца болести	5.23%	2.42% до 9.70%	
Позитивна предиктивна вредност	18.75%	11.43% до 29.21%	
Негативна предиктивна вредност	97.86%	94.76% до 99.14%	
Јуденов индекс	50.72%		
Проширен Јуденов индекс	67.33%		
Дијагностичка тачност	83.14%	76.69% до 88.41%	

**Табела 17.** Дијагностичка ефикасност IgG антитела на хламидијални MOMP антиген на основу *Cut-off* вредности дефинисаних ROC анализом

<b>IgGcut-off ≥ 17.57 RU/ml</b>			
<b>RT-PCR</b>	<b>Позитивни</b>	<b>Негативни</b>	
Позитивни	9	0	9
Негативни	27	136	163
Укупно	36	136	172
	<b>Позитивни</b>	<b>Негативни</b>	
Позитивни	100%	0.0%	15.7%
Негативни	1.66%	83.4%	
$\chi^2$ ORA	$\chi^2 = 85.8.1; df = 1; p < 0.001$ 0.843		
Карра	0.3452		
<b>Статистика</b>	<b>Вредности</b>	<b>95% CI</b>	
Сензитивност	100.00%	66.37% до 100.00%	
Специфичност	83.44%	76.82% до 88.79%	
Позитиван однос вероватноће	6.04	4.28 до 8.52	
Негативан однос вероватноће	0		
Преваленца болести	5.23%	2.42% до 9.70%	
Позитивна предиктивна вредност	25.00%	19.11% до 31.99%	
Негативна предиктивна вредност	100.00%		
Јуденов индекс	83.44%		
Проширен Јуденов индекс	108.44%		
Дијагностичка тачност	84.30%	77.99% до 89.39%	

На истоветан начин смо анализирали и комбинације ова два теста. Применом нових *cut-off* вредности дефинисаних на основу ROC анализе, дијагностичка ефикасност комбинације IgA+IgG теста (позитивна оба теста) је значајно повећана. Вредности

сензитивности (77,8%), Јуденовог индекса (72,9%) и проширеног Јуденовог индекса (118,3%) су у односу на вредности добијене применом *cut-off* вредности препоручених од стране произвођача увећане више од два пута. (Табела 18. и 19.)

**Табела 18.** Дијагностичка ефикасност IgA+IgG (позитивна оба теста) антитела на хламидијални МОРМ антиген на основу *Cut-off* вредности препоручених од стране произвођача теста

<b>IgA+IgG <i>cut-off</i> S/Co <math>\geq</math> 1.1; <math>\geq</math> 22 RU/ml</b>			
<b>RT-PCR</b>	<b>Позитивни</b>	<b>Негативни</b>	
Позитивни	3	6	9
Негативни	8	155	163
Укупно	11	161	172
	<b>Позитивни</b>	<b>Негативни</b>	
Позитивни	33.3%	66.7%	8.1%
Негативни	4.9%	95.1%	
$\chi^2$ ORA	$\chi^2 = 0.469$ ; $df = 1$ ; $p = 0.493$		
Карра	0.919		
	0.2572		
<b>Статистика</b>	<b>Вредности</b>	<b>95% CI</b>	
Сензитивност	33.33%	7.49% до 70.07%	
Специфичност	95.09%	90.56% до 97.86%	
Позитиван однос вероватноће	6.79	2.16 до 21.34	
Негативан однос вероватноће	0.7	0.44 до 1.11	
Преваленца болести	5.23%	2.42% до 9.70%	
Позитивна предиктивна вредност	27.27%	10.66% до 54.09%	
Негативна предиктивна вредност	96.27%	94.20% до 97.62%	
Јуденов индекс	28.42%		
Проширени Јуденов индекс	51.96%		
Дијагностичка тачност	91.86%	86.72% до 95.48%	

**Табела 19.** Дијагностичка ефикасност IgA+IgG (позитивна оба теста) антитела на хламидијални МОРМ антиген на основу *Cut-off* вредности дефинисаних ROC анализом

<b>IgA+IgG <i>cut-off</i> S/Co <math>\geq</math> 0.87; <math>\geq</math> 17.57 RU/ml</b>			
<b>RT-PCR</b>	<b>Позитивни</b>	<b>Негативни</b>	
Позитивни	7	2	9
Негативни	8	155	163
Укупно	15	157	172
	<b>Позитивни</b>	<b>Негативни</b>	
Позитивни	77.8%	22.2%	5.8%
Негативни	4.9%	95.1%	
$\chi^2$ ORA	$\chi^2 = 4.22$ ; $df = 1$ ; $p = 0.04$		
Карра	0.942		
	0.5542		
<b>Статистика</b>	<b>Вредности</b>	<b>95% CI</b>	
Сензитивност	77.78%	39.99% to 97.19%	
Специфичност	95.09%	90.56% to 97.86%	
Позитиван однос вероватноће	15.85	7.41 to 33.91	
Негативан однос вероватноће	0.23	0.07 to 0.79	
Преваленца болести	5.23%	2.42% to 9.70%	
Позитивна предиктивна вредност	46.67%	29.02% to 65.18%	
Негативна предиктивна вредност	98.73%	95.80% to 99.62%	
Јуденов индекс	72.87.00%		
Проширени Јуденов индекс	118.27%		
Дијагностичка тачност	94.19%	89.57% to 97.18%	

Слично, дијагностичка ефикасност комбинације IgA/IgG (позитиван било који тест) је применом нових *cut-off* вредности сигнификантно поправљена, те уз супериорну



сензитивност од 100,0%, примена нових *cut-off* вредности значајно повећава и вредности Јуденовог индекса (78,5%) и проширеног Јуденовог индекса (98,9%). (Табела 20. и 21.) Применом нових *cut-off* вредности, у свим случајевима, су очуване високе вредности специфичности и негативне предиктивне вредности.

**Табела 20.** Дијагностичка ефикасност IgA/IgG (позитиван било који тест) антитела на хламидијални MOMP антиген на основу *Cut-off* вредности препоручених од стране произвођача теста

IgA/IgG <i>cut-off</i> S/Co $\geq 1.1$ ; $\geq 22$ RU/ml			
RT-PCR	Позитивни	Негативни	
Позитивни	7	2	9
Негативни	33	130	163
Укупно	40	132	172
	Позитивни	Негативни	
Позитивни	77.8%	22.2%	17.4%
Негативни	20.2%	79.8%	
$\chi^2$ ORA	$\chi^2 = 113$ ; $df = 1$ ; $p < 0.001$		
Карра	0.797		
	0.219		
Статистика	Вредности	95% CI	
Сензитивност	77.78%	39.99% до 97.19%	
Специфичност	79.75%	72.76% до 85.64%	
Позитиван однос вероватноће	3.84	2.42 до 6.11	
Негативан однос вероватноће	0.28	0.08 до 0.95	
Преваленца болести	5.23%	2.42% до 9.70%	
Позитивна предиктивна вредност	17.50%	11.77% до 25.22%	
Негативна предиктивна вредност	98.48%	95.02% до 99.58%	
Јуденов индекс	57.53%		
Проширени Јуденов индекс	73.51%		
Дијагностичка тачност	79.65%	72.85% до 85.40%	

**Табела 21.** Дијагностичка ефикасност IgA/IgG (позитиван било који тест) антитела на хламидијални MOMP антиген на основу *Cut-off* вредности дефинисаних ROC анализом

IgA/IgG <i>cut-off</i> S/Co $\geq 0.87$ ; $\geq 17.57$ RU/ml			
RT-PCR	Позитивни	Негативни	
Позитивни	9	0	9
Негативни	35	128	163
Укупно	44	128	172
	Позитивни	Негативни	
Позитивни	100.0%	0.0%	20.3%
Негативни	21.5%	78.5%	
$\chi^2$ ORA	$\chi^2 = 144$ ; $df = 1$ ; $p < 0.001$		
Карра	0.797		
	0.2768		
Статистика	Вредности	95% CI	
Сензитивност	100.00%	66.37% to 100.00%	
Специфичност	78.53%	71.42% to 84.56%	
Позитиван однос вероватноће	4.66	3.47 to 6.25	
Негативан однос вероватноће	0		
Преваленца болести	5.23%	2.42% to 9.70%	
Позитивна предиктивна вредност	20.45%	16.09% to 25.64%	
Негативна предиктивна вредност	100.00%		
Јуденов индекс	78.53%		
Проширени Јуденов индекс	98.98%		
Дијагностичка тачност	79.65%	72.85% to 85.40%	

#### **4.4. Економска анализа**

Резултати економске анализе приказани су према трошковима за дијагностику и лечење појединачног болесника и трошкове за процењену популацију свих лечених пацијената у Србији

##### **а) Трошкови по пацијенту**

Економска анализа указује да су, за дати сценарио, најмањи укупни трошкови по пацијенту код коришћења брзог теста, 1,146.33 динара потом код серолошких метода, 1,382.00 динара и 1,422.29 динара док су примена директне имунофлуоресценције и посебно PCR тестова скупље стратегије, са укупним трошковима од 1,434.96 динара односно 3,593.60 динара. (Табела 22.) Примена комбинације тестова није исплатива економска стратегија јер су укупни трошкови по пацијенту већи од трошкова примене појединачних тестова, а у случају комбинације директног и серолошких тестова приближавају се најмање исплативој стратегији, примени PCR методе. Дакле, доминантна економска стратегија је примена брзог теста, а прве алтернативе су серолошке методе.

Табела 22. Економска анализа

УКУПАН БРОЈ ИСПИТАНИКА	201	DIF	Брзи тест (ВТ)	IgA	IgG	DIF + ВТ	ВТ + IgG	DIF/IgA	ВТ/IgA	IgA/IgG	PCR
Стварно позитивни TP	9	7	3	7	7	3	3	9	6	7	9
Стварно негативни TN	192	139	192	181	165	192	192	132	181	159	192
Длачко позитивни FP		53	0	11	27	0	0	60	11	33	0
Длачко негативни FN		2	6	2	2	6	6	0	3	2	0
<b>ИНДИЦИЈАЛНИ ЦИКЛУС</b>											
Прегледи лекара специјалисте		568.02	568.02	568.02	568.02	568.02	568.02	568.02	568.02	568.02	568.02
Лабораторијски тест		563.85	518.07	727.29	683.50	1,081.92	1,201.57	1,291.14	1,245.36	1,410.79	3,025.58
Укупно по пацијенту у циклусу		<b>1,131.87</b>	<b>1,086.09</b>	<b>1,295.31</b>	<b>1,251.52</b>	<b>1,649.94</b>	<b>1,769.59</b>	<b>1,859.16</b>	<b>1,813.38</b>	<b>1,978.81</b>	<b>3,593.60</b>
Укупно по тесту (n=201)		227,505.87	218,304.09	260,357.31	251,555.52	331,637.94	355,687.59	373,691.16	364,489.38	397,740.81	722,313.60
<b>НАКНАДНИ ЦИКЛУС</b>											
Сума FP и TP		60.00	6.00	13.00	29.00	6.00	6.00	60.00	14.00	35.00	0.00
Терапија FP и TP		226.80	226.80	226.80	226.80	226.80	227.80	226.80	226.80	227.80	0.00
Релетирање после 3 месеца		563.85	518.07	727.29	683.50	1,081.92	1,201.57	1,291.14	1,245.36	1,410.79	0.00
Контролни преглед лекар специјалиста		186.98	186.98	186.98	186.98	186.98	187.98	186.98	186.98	187.98	0.00
Укупно по пацијенту		<b>977.63</b>	<b>931.85</b>	<b>1,141.07</b>	<b>1,097.28</b>	<b>1,495.70</b>	<b>1,617.35</b>	<b>1,704.92</b>	<b>1,659.14</b>	<b>1,826.57</b>	<b>0.00</b>
Укупно по тесту (FP+TP)		58,657.80	5,591.10	14,833.91	31,821.12	8,974.20	9,704.10	102,295.20	23,227.96	63,929.95	0.00
<b>ПОНОВЉЕНИ ЦИКЛУС</b>											
Сума FN		<b>2.00</b>	<b>6.00</b>	<b>2.00</b>	<b>2.00</b>	<b>6.00</b>	<b>6.00</b>	<b>0.00</b>	<b>3.00</b>	<b>2.00</b>	<b>0.00</b>
Укупно по пацијенту у циклусу		1,131.87	1,086.09	1,295.31	1,251.52	1,649.94	1,769.59	1,859.16	1,813.38	1,978.81	3,593.60
Укупно по тесту (FN)		2,263.74	6,516.54	2,590.62	2,503.04	9,899.64	10,617.54	0.00	5,440.14	3,957.62	0.00
<b>УКУПНИ ТРОШКОВИ</b>											
Укупно по пацијенту (n=201)		1,434.96	1,146.33	1,382.00	1,422.29	1,743.84	1,870.69	2,368.09	1,956.01	2,316.56	3,593.60
Укупно по тесту (n=201)		288,427.41	230,411.73	277,781.84	285,879.68	350,511.78	376,009.23	475,986.36	393,157.48	465,628.38	722,313.60
<b>ИНДИРЕКТНИ ТРОШКОВИ</b>											
Сума FP		53	0	11	27	0	0	60	11	33	0
Трошкови накнадног циклуса за FP		51,814.39	0.00	12,551.77	29,626.56	0.00	0.00	102,295.20	18,250.54	60,276.81	0.00
Сума FN		2	6	2	2	6	6	0	3	2	0
Трошкови поновљеног циклуса за FN		2,263.74	6,516.54	2,590.62	2,503.04	9,899.64	10,617.54	0.00	5,440.14	3,957.62	0.00
Укупно по пацијенту (n=201)		269.05	32.42	75.34	159.85	49.25	52.82	508.93	117.86	319.57	0.00
Укупно по тесту (n=201)		54,078.13	6,516.54	15,142.39	32,129.60	9,899.64	10,617.54	102,295.20	23,690.68	64,234.43	0.00
Удео по пацијенту		18.7%	2.8%	5.5%	11.2%	2.8%	2.8%	21.5%	6.0%	13.8%	0%
Удео по тесту		18.7%	2.8%	5.5%	11.2%	2.8%	2.8%	21.5%	6.0%	13.8%	0%
<b>ДИРЕКТНИ ТРОШКОВИ</b>											
Укупно по пацијенту (n=201)		1,165.92	1,113.91	1,306.66	1,262.44	1,694.59	1,817.87	1,859.16	1,838.14	1,996.98	3,593.60
Укупно по тесту (n=201)		234,349.28	223,895.19	262,639.45	253,750.08	340,612.14	365,391.69	373,691.16	369,466.80	401,393.95	722,313.60
Удео по пацијенту		81.3%	97.2%	94.5%	88.8%	97.2%	97.2%	78.5%	94.0%	86.2%	100%
Удео по тесту		81.3%	97.2%	94.5%	88.8%	97.2%	97.2%	78.5%	94.0%	86.2%	100%

Удео индиректних здравствених трошкова, по пацијенту, у укупним трошковима је такође најмањи код примене брзог и серолошких тестова, и налази се у рангу од 2.8-11.2%. Једино примена комбинације два серолошка теста има сличан удео индиректних здравствених трошкова (13.8%), док код директне имунофлуоресценције и других комбинације тај удео износи око петине. Изузетак представља примена тестова заснованих на PCR методи где нема индиректних здравствених трошкова, имајући у виду да је тај тест разматран као „златни стандард“ чији су сви резултати сматрани као стварно позитивни и стварно негативни.

Резултати су указали да је цена теста доминантан трошак у дијагностици хламидијалне инфекције генитоуринарног тракта код нас. Мали трошкови лекарских прегледа и лечења болесника са лажно позитивним и лажно негативним налазима су основни разлог таквог резултата. Иако су дијагностичке перформансе свих тестова у односу на PCR методу знатно слабије, њена висока почетна цена, у условима трошкова националног здравственог система, не може да се компензује бољим резултатима у дијагностици у укупном економском профилу датог сценарија. Комбиновање тестова није повољна економска стратегија јер се тиме повећавају инцијални трошкови за саме тестове, а како су они примарна детерминатна економског профила, укупни трошкови се повећавају у односу на стратегије монотестирања. Штавише, крајње дијагностичке перформансе комбиновања тестова нису значајно боље у односу на примену појединачних тестова, тако да и та чињеница делује као негативни економски фактор у стратегији иницијалног коришћења више дијагностичких метода.

#### **б) Трошкови циљне популације**

Укупна популација становника Републике Србије је процењена на 7,171,270 особа, израчуната као средња вредност процењене виталне статистике за период 2010-2016. године. Процењена стопа оболелих у Србији, на основу пријава инфекције за период 2014-2015. године је била 12.65-13.38 на 100,000 становника. Узимајући у виду те податке, као и доступне податке из других Европских земаља (за период 2010-2014), процењена стварна стопа хламидијалне гениталне инфекције у Србији је 134.41 (95% границе поверења, 53.83-214.99) на 100,000 становника. Укупна циљна популација је, имајући у

виду поменути процењен укупан број становника, утврђена на 9,639 (3,860-13,499) оболелих од хламидијалне генитоуринарне инфекције.

Резултати интерно спроведене анкете у микробиолошким лабораторијама установа јавног здравља и приватне здравствене праксе су указали да је најчешћи коришћени тест у дијагностици хламидијалне инфекције брзи тест, потом директни имунофлуоресцентни тест, а да је најређе у употреби PCR метода. При томе, скоро 80% лабораторија у установама јавног здравља користи најмање два различита теста а око 25% лабораторија приватне праксе је оспособљено за извођење и спроводи најмање три различита теста. Ови резултати указују да је пракса комбинованог тестирања широко заступљена. С тим у вези, процена трошкова циљне популације је сачињена за три претпостављена сценарија: а) код свих болесника се примењује само један тест; б) дијагностички тестови се примењују у међусобном односу актуелне праксе лабораторија; в) дијагностички тестови се примењују у претпостављеном сценарију коришћења само једног теста код једног болесника, при релативној расподели различитих тестова која следи однос актуелне праксе. Имајући у виду инцијалне вредности трошкова дијагностике, прегледа и лечења, процена ових сценарија је укључила само лабораторије из система јавног здравља. При томе је претпостављено да ће од укупне циљне популације 92.5% пацијената бити доступно за спровођење инцијалне дијагностике и даљег лечења, укупно 8916 особа (3570 до 12487). Резултати економске анализе за ова три сценарија су дата у Табели 23.

Укупни просечни трошкови циљне популације у првом сценарију су процењени од 10,220,737.64 (директни тест) до 32,040,807.12 динара (PCR метода) (95% границе поверења од 4,092,960.61 до 44,871,755.92 динара). Актуелни укупни трошкови у другом сценарију, који следи актуелну праксу расподеле различитих дијагностичких тестова су процењени на износ од 24,560,347.91 динара (9,835,350.44 до 34,395,698.35). Уколико би се код једног пацијента користио само један тест, а расподела тестова следила однос актуелне праксе (трећи сценарио), укупни трошкови би били скоро за половину нижи, 13,854,555.23 динара (5,548,146.40 до 19,402,701.63). Дакле, иницијално комбиновање различитих тестова код истог пацијента је, с аспекта укупних трошкова за укупну циљну популацију, нерационална економска стратегија јер се процењује да се у систему националног јавног здравља за такву праксу троши око 10 милиона динара а да се,

имајући у виду претходну економску анализу за појединачног болесника, таквом праксом увећавају трошкови без битно унапређених дијагностичких перформанси.

**Табела 23.** Анализа здравствених трошкова за иницијалну микробиолошку дијагностику и фармакотерапију циљне популације оболелих од генитоуринарне хламидијалне инфекције у Србији

Варијабле	DIF	BT	IgA	IgG	PCR	Укупно
Актуелни удео	40.9%	59.1%	31.8%	36.4%	9.1%	177.3%
Монотестирање	23.1%	33.3%	17.9%	20.5%	5.1%	100.0%
Разлика удела	17.8%	25.8%	13.9%	15.9%	4.0%	77.3%
Трошак, особа	1,434.96	1,146.33	1,382.00	1,422.29	3,593.60	н.п.
<b>Трошкови циљне популације</b>						
Сценарио једног теста за све	12,794,230.94	10,220,737.64	12,322,008.55	12,681,217.25	32,040,807.12	н.п.
	5,123,532.67	4,092,960.61	4,934,428.16	5,078,275.61	12,830,948.80	н.п.
	17,917,763.62	14,313,698.25	17,256,436.71	17,759,492.86	44,871,755.92	н.п.
Сценарио актуелне праксе	5,658,382.24	6,529,218.15	4,238,528.74	4,985,245.11	3,148,973.67	24,560,347.91
	2,265,935.83	2,614,667.71	1,697,346.30	1,996,373.70	1,261,026.91	9,835,350.44
	7,924,318.06	9,143,885.86	5,935,875.04	6,981,618.82	4,410,000.58	34,395,698.35
Сценарио једног теста код једног пацијента	3,191,907.93	3,683,148.70	2,390,964.93	2,812,189.55	1,776,344.12	13,854,555.23
	1,278,220.21	1,474,940.76	957,477.40	1,126,159.53	711,348.51	5,548,146.40
	4,470,128.14	5,158,089.46	3,348,442.33	3,938,349.08	2,487,692.64	19,402,701.63
Трошкови разлике удела	2,281,488.73	2,632,614.24	1,708,996.52	2,010,076.39	1,269,682.33	9,902,858.23
	913,636.95	1,054,247.43	684,378.73	804,948.12	508,452.52	3,965,663.74
	3,195,125.68	3,686,861.67	2,393,375.25	2,815,024.51	1,778,134.85	13,868,521.96

- доступна популација: 8,916 (3,571-12,487) болесника;
- трошкови у динарима, представљени као средња вредност и 95% границе поверења, за појединачни сценарио и појединачни тест;
- н.п.-није применљиво.

## 5. ДИСКУСИЈА

Инфекција *C. trachomatis* је најчешћа сексуално преносива бактеријска инфекција у свету (54). Инфекција углавном погађа младе сексуално активне особе, тако да су и највише стопе случајева забележене код младих жена од 16 до 24 године. Из године у годину, у САД-у се бележи стални пораст хламидијалне инфекције. У 2016 години стопа пријављених хламидијалних инфекција је показала повећање за 4,7% у односу на 2015 годину (55). Овај тренд се наставља, обзиром да је у 2017 години центру за контролу и превенцију болести укупно пријављено 1,708,569 случајева, што даје повећање од 6,9% у поређењу са стопом у 2016 години. Највећа стопа пријављивања је забележена код младих и адолесцената старости од 16 до 24 године. Иако је стопа пријављених случајева хламидијалне инфекције у 2017 години код мушкараца укључујући геј популацију и бисексуалце нижа у односу на жене, она ипак показује повећање (55).

У 2016 години, у Европи од стране 26 земаља пријављено је 403 807 случајева хламидијалне инфекције што би чинило 185 случајева на 100 000 становника, али са јасно израженим варијацијама између земаља и њихових пријављених стопа. Ове варијације у стопама пријављених хламидијалних инфекција између земаља широм Европе се могу објаснити употребом различитих дијагностичких процедура, прикупљањем и надзором података као и различитим извештавањем. Иако је стопа пријављених хламидијалних инфекција у Европи велика, ипак показује стабилност.

Недијагностикована и сходно томе нелечена хламидијална инфекција може довести до озбиљних компликација и последица на репродуктивном тракту код жена (57, 161). Клиничке манифестације гениталне хламидијалне инфекције код жена, пре свега обухватају инфекције доњег гениталног тракта, које се најчешће испољавају појавом цервицитиса. У неким случајевима долази до спонтане резолуције инфекције, док код неких жена инфекција се шири у горњи репродуктивни тракт доводећи до озбиљних оштећења и компликација као што су пелвична инфламаторна болест, тубални фактор инфертилитета и ектопична трудноћа. Fitz-Hugh-Curtis синдром углавном се јавља након или у току салпингитиса, и чешће се повезује са хламидијалном него са гонококном инфекцијом (59). Код мушкараца хламидијална инфекција углавном доводи до уретритиса. Хламидијална

инфекција се повезује и са Рајтеровим синдромом код мушкараца и жена (89). Висока учесталост и асимптоматска природа хламидијалне инфекције, доводи до континуираног преноса, обзиром да особе које имају инфекцију, представљају значајан резервоар за даље преношење. Због тога, многе земље примењују различите програме контроле и превенције хламидијалне инфекције. Програми контроле хламидијалне инфекције су углавном базирани на скринингу асимптоматских инфекција код млађих сексуално активних жена, као и њихових партнера. Од ових програма се очекује да ће смањити број штетних последица хламидијалне инфекције на репродуктивно здравље жена, као и даље ширење инфекције.

Висока учесталост јављања инфекције без симптома и могућност неповољног исхода на репродуктивно здравље подстакла је развој осетљивијих дијагностичких тестова. Рана дијагностика акутне хламидијалне инфекције је изузетно важна, али и врло изазовна због асимптоматске природе и карактеристичног развојног циклуса *S. trachomatis*. У последњих тридесет година је остварен значајан напредак на пољу дијагностиковања хламидијалне инфекције. За детекцију *S. trachomatis* постоје вишеструке опције лабораторијског тестирања, мада неке не могу бити препоручене за рутинску употребу. За успешну дијагнозу хламидијалних инфекција неопходно је направити добар одабир теста који обезбеђује високу сензитивност и специфичност али и брзину извођења теста, што су по препорукама европског и америчког центра за контролу болести (ECDC i CDC) тестови амплификације нуклеинских киселина (108, 109). Међутим, висока цена економских трошкова ових тестова, уз техничку комплексност везану за простор, кадар и опрему, условили су да је за већину дијагностичких лабораторија у земљама са нижим приходима овај стандард недостижан. Отуда не чуди податак да се у Србији дијагностика акутне хламидијалне инфекције гениталног тракта, у преко 90% лабораторија, заснива на директној имунофлуоресценцији и серолошким тестовима, који као такви нису препоручени ни од америчког ни од европског центра за контролу болести.

Сходно томе, основни циљ наше студије био је да се утврди дијагностичка ефикасност четири теста за детекцију акутне хламидијалне инфекције и директних и индиректних медицинских трошкова тестирања. У складу са наведеним циљем испитали



смо слагање резултата RT-PCR теста за детекцију *C. trachomatis* (златни стандард) са резултатима добијеним употребом директне имунофлуоресценције (DIF) и брзог имунохроматског теста (EIA) за квалитативно откривање хламидијалних антигена и имуноензимских тестова за детекцију серумског нивоа IgA и IgG антитела специфичних за хламидијални MOMP антиген (ELISA).

Наша студија пружа клиничке и економске препоруке у вези са селекцијом дијагностичких тестова у откривању акутне хламидијалне инфекције у случајевима када су технике амплификације нуклеинских киселина недоступне из било ког разлога. На основу пажљиве анализе резултата појединачних тестова, наша студија је показала да најбољу дијагностичку ефикасност показује брзи тест. У одабиру тестова за детекцију хламидијалне инфекције, поред дијагностичке ефикасности, веома је битна и брзина извођења теста и добијања резултата ради благовременог иницирања лечења. Тестови латералне хроматографије (брзи имунохроматографски тестови – БТ) за квалитативно откривање хламидијалних антигена представљају нову генерацију имуноензимских тестова који свакако испуњавају овај услов, обзиром да су резултати теста доступни за десет минута, тако да пацијенти са позитивним резултатом теста могу одмах кренути са антибиотском терапијом. Сматра се да ови тестови могу да смање ниво трансмисије и инциденцу хламидијалних инфекција и последичне секвеле по репродуктивно здравље жена управо тако што смањују време између постављања дијагнозе и почетка третмана (62). Дијагностика заснована на другим тестовима захтева другу посету пацијената, што потенцијално доводи до одложеног лечења или изостанка лечења уколико се пацијенти не појаве, што може довести до пораста инциденце инфекције. Међутим, и поред високе специфичности и кратког времена извођења теста, због разочаравајуће ниске сензитивности наша студија не препоручује ову методу за дијагнозу асимптоматских и симптоматских хламидијалних инфекција. Наши налази су у складу са препорукама других студија где је примећена ниска сензитивност (20-60%) брзих тестова (132 - 136, 162). Међутим, једна студија указује на још нижу сензитивност (11,6%-27,3%) брзих тестова која се у неким случајевима може објаснити тестирањем асимптоматских пацијената код којих је инфекција на самом почетку (163). Међутим, иако се тестирањем ендоцервикалних узорака код симптоматских пацијената сензитивност брзих тестова може повећати (22,7%-37,7%), она је и даље на незадовољавајућем нивоу (164). Међутим

и поред ниске сензитивности ову дијагностичку методу поменути аутор препоручује за рутинску употребу у скрининг програму хламидијалне инфекције обзиром на њихову исплативост и високу специфичност(164). Даље, ЕИА тестови показују ниску сензитивност и у односу на ћелијску кутуру као референтни метод. Због знатног броја лажно позитивних резултата не препоручују се њихова употреба у условима ниске преваленце (165). Са друге стране, неки аутори препоручују баш ову дијагностичку методу у условима ниске и умерене преваленце у примарним установама, а ниску осетљивост објашњавају мањим оптерећењем инфекцијом (166). Инфекција *C. trachomatis* током трудноће може да доведе до коњујктивитиса и пнеумоније новорођенчета, као и до постпарталног ендометритиса мајке (167). Обзиром на овакве последице хламидијалне инфекције током трудноће, у популацији трудница са ниском преваленцом, ЕИА тестови нису поуздани и не могу се препоручити као дијагностичке методе (137). Тестови амплификације нуклеинских киселина су значајно допринели напретку у дијагнози хламидијалне инфекције захваљујући својим перформансама, али високи трошкови ових тестова у већини земаља са ниским стандардом чине их недоступним. Сходно томе, једна студија истиче да би се ови проблеми превазишли развојем осетљивијих брзих тестова, уз повољније трошкове, брзо и лако извођење теста (168). Карактеристике нових „идеалних“ брзих тестова биле би једноставно коришћење, неинвазивни узорци, висока сензитивност уз очувану специфичност. Овако дизајниран тест нуди дијагнозу и лечење при једној посети лекару, уз високу дијагностичку ефикасност, и као такав би имао препоруке за дијагнозу хламидијалне инфекције (169). Ипак, неки аутори се не слажу са овим препорукама и кажу да повећану осетљивост (преко 80%) прати висок проценат недефинисаних и лажно позитивних резултата који смањују специфичност (170). Наравно, ово правило се не односи на друге методе, посебно када су у питању НААТ тестови. Тако Ампликор PCR тест идентификује око 30% више инфекција од уобичајних ЕИА тестова у популацији са ниском преваленцом. Стога, иако је PCR техника скупља, смањен морбидитет који је резултат откривања и лечења иначе недијагностикованих случајева од стране ЕИА тестова такође треба размотрити у било којој економској анализи трошкова скрининг метода (171). Насупрот томе, једна студија управо због ниских трошкова ове методе препоручују ЕИА тестове као примарну методу у програму скрининга хламидијалне инфекције код жена, али уз напомену да је због ниске осетљивости ових тестова неопходно потврђивање негативних резултата тестом амплификације нуклеинских

киселина (172). Обзиром да је улога скрининга да открије што је више могуће случајева инфекције и на тај начин спречи трансмисију, компликације и озбиљне последице на репродуктивном тракту жена неки аутори се не слажу са овим препорукама. Обзиром да се у условима реалне клиничке праксе EIA тестови доста користе у детекцији асимптоматских хламидијалних инфекција, вероватно ће због ниске осетљивости пропустити велики проценат инфекције у програму скрининга (173). Супротно нашим резултатима, неки аутори су показали да тренутно доступни брзи тестови показују високу осетљивост (60-99%) и пружају могућност тестирања популација којима је тешко приступити, што ће омогућити третман више случајева, али ипак не препоручују лабораторијску употребу ових тестова (174, 175).

Други приступ директног потврђивања хламидијалне инфекције тј. детекције хламидијалних антигена у клиничким узорцима, укључује тестирање узорака тестом директне имунофлуоресценције (DIF), који користи врсно специфична моноклонска антитела за детекцију главног протеина спољашње мембране (MOMP) хламидија. Анализом наших резултата показали смо да DIF има добро уравнотежен однос сензитивности и специфичности (сен: 77,8% ; спец: 72,4%), али изузетно ниску позитивну предиктивну вредност, што је главни разлог зашто се на основу резултата наше студије овај тест не може препоручити за дијагнозу акутне хламидијалне инфекције. Ниска позитивна предиктивна вредност ове методе се може повећати у субпопулацијама са високом преваленцом, а смањење сензитивности може се објаснити мањим оптерећењем инфекцијом у групама са ниском преваленцом (168). У сагласности са нашим истраживањем су и друге студије, које су приказале сличне или исте вредности сензитивности и специфичности ове дијагностичке методе (176, 177, 178, 125). У односу на ћелијску културу као референтни метод DIF метода показује већу сензитивност (80-90%), уз очувану високу специфичност, али и даље није погодна и не препоручује се за велики број узорака, јер захтева дуготрајан и интензиван рад (179). Компаративном анализом резултата добијених употребом EIA и DIF методе је показано да су EIA тестови у предности, обзиром да DIF показује ниже вредности сензитивности и осталих дијагностичких параметра у поређењу са EIA тестовима (168). За разлику од наших резултата, неки аутори наводе и веома ниске вредности сензитивности (36%) ове дијагностичке методе, али и значајно већу PPV (81,5%), што се вероватно може објаснити

тестирањем различитих група (180). Међутим, супротно нашим налазима, неке од ранијих студија препоручују DIF методу као практичну и јефтину, релевантну у рутинској лабораторијској пракси и погодну за рано откривање инфекције због своје високе осетљивости (177, 178, 181). Са овим резултатима се слажу и аутори студије у којој је приказана сензитивност DIF-а од чак 100% у односу на PCR као златни стандард, а овако високе вредности сензитивности аутори објашњавају квалитетом ендоцервикалних узорака за анализу (178,182 ). Сходно томе, лажно негативни и лажно позитивни резултати се могу спречити проценом квалитета ендоцервикалних узорака присуством и бројем епителних ћелија, оцењивањем теста од стране искусног особља и коришћењем узорака за контролу квалитета. Када се користи проширени златни стандард, проценат сензитивности DIF-а поклапа се са вредностима из наше студије, уз нешто већу специфичност, али супротно нашим налазима исти аутори препоручују коришћење ових тестова у популацији са ниском преваленцом (125). Међутим, други сумњају у ову изјаву под претпоставком да се DIF не препоручује у условима ниске преваленце и треба га користити само у лабораторијама које обрађују мали број узорака (126). Закључно, обзиром да је ова метода субјективна, да захтева особу која је искусна у раду са флуоресцентним микроскопом, те да има незадовољавајућу сензитивност и ниску позитивну предиктивну вредност, сматрамо да се ова метода не може препоручити за детекцију акутне хламидијалне инфекције.

Серологија се не препоручује за дијагностиковање акутних хламидијалних инфекција доњег гениталног тракта, обзиром да се антитела могу детектовати тек неколико недеља од почетка инфекције, титар антитела може бити низак, а многи серолошки тестови нису у могућности да разликују антитела против различитих врста хламидија. Са изузетком, серологија може бити од користи код инфекција новорођенчади, пацијената са тубалним фактором инфертилитета (183, 184), ектопичном трудноћом (185), рекурентним побачајима (186) и пелвичном инфламаторном болешћу (187). Наши резултати пружају прилично задовољавајуће резултате за серумски ниво IgA и IgG антитела. Специфичност, негативна предиктивна вредност, као и Јуденов индекс и дијагностичка тачност су прилично високи, али због незадовољавајуће ниске осетљивости и позитивне предиктивне вредности, ови тестови се такође не могу препоручити као појединачне методе за дијагнозу хламидијалне инфекције. Велика већина претходних

студија указује да, осим код пацијената са хроничном хламидијалном инфекцијом горњег гениталног тракта, серолошки IgA и IgG тестови немају никаквог значаја за утврђивање дијагнозе акутне хламидијалне инфекције (62, 108, 109, 188, 176, 147,189). Резултати једне студије сугеришу да, иако је корелација серологије са активном инфекцијом доњег гениталног тракта веома ниска, ипак може искључити активну инфекцију са високом поузданошћу (190). Други аутори наглашавају да поред значајне улоге серолошког доказа код тубалног фактора инфертилитета, детектована IgA и IgG антитела могу бити од користи и при дијагнози акутне хламидијалне инфекције (191). Сагласни са овим препорукама су и други аутори који кажу да присуство серумских IgA антитела, која имају полуживот од око 5-7 дана, може бити користан маркер за активну инфекцију *C. trachomatis* или као маркер хроничне инфекције уз упорну антигенску стимулацију имуног система (192). Други дају предност секреторним sIgA антителима као бољим индикаторима хламидијалне инфекције у односу на циркулишућа антитела (193). Велики број студија је показао снажну корелацију између присуства анти-MOMP (194 - 198) и анти-cHSP60 (199 - 201) антитела и тежине гениталне инфекције *C. trachomatis*, PID, инфертилитета и тубалне патологије (202, 203). Супротно томе, Логан С. и сарадници скрећу пажњу да серолошки IgA и IgG тестови нису показали велику прецизност код тубалног фактора инфертилитета код субфертилних жена (204). У серодијагностици тубалног фактора инфертилитета неки аутори дају предност анти- MOMP IgA антителима у односу на анти- MOMP IgG антитела (205). Слично, показано је да су анти- MOMP IgA антитела најбољи имунолошки макер за дијагнозу хроничног простатиса (206), а такође су и у позитивној корелацији са хламидијалном инфекцијом код мушкараца са стерилитетом (207). Обећавајући резултати неких новијих студија указују да нови, синтетички, пептидни, врсно специфични серолошки тестови могу открити IgA и IgG антитела која су снажно повезана са активном инфекцијом (208, 209). Штавише, ови и други налази указују на то да у раним фазама могу бити присутна само серумска (IgA) или секреторна (IgG) антитела која указују на тренутну (активну) хламидијалну инфекцију (209, 210). Међутим, у свим овим истраживањима аутори сугеришу да је и у таквим случајевима IgA серопозитивности још увек потребна потврда тестом амплификације нуклеинских киселина. Неки аутори наглашавају да позитивни резултати PCR-а код цервикалних узорак представљају јак доказ присуства хламидијалне инфекције у доњем гениталном тракту, док негативни резултати PCR-а код цервикалних узорак не искључују

хламидијалну инфекцију горњег гениталног тракта код жена са стерилитетом. Сходно томе ови аутори предлажу, да се код жена у репродуктивном добу користи серологија за дијагнозу хламидијалне инфекције горњег гениталног тракта (211). Стога, иако нове серолошке методе засноване на употреби пептидних антигена бацају ново светло на улогу серологије у детекцији *C. trachomatis*, серолошке методе се не могу препоручити за детекцију акутне хламидијалне инфекције доњих партија гениталног тракта. Ипак, серологија може бити од користи како у епидемиолошким студијама, тако и у студијама које испитују клинички спектар хламидијалних инфекција, укључујући компликације акутне инфекције (реактивни артритис), перзистентну инфекцију, али и манифестације перзистентне инфекције (PID, TFI, ектопична трудноћа).

У земљама где постоје економски, просторни и кадровски услови за извођење тестова амплификације нуклеинских киселина препоруке су јасне, међутим у земљама са ниским стандаром које не испуњавају ове услове, углавном се користе друге дијагностичке методе које нису препоручене за дијагнозу акутне хламидијалне инфекције. Обзиром да ни наша студија не препоручује ниједан од анализираних тестова због ниске дијагностичке ефикасности, покушали смо комбинацијом тестова да поправимо дијагностичку ефикасност у односу на појединачне тестове. Урадили смо две групе комбинације тестова: „позитивна два или више теста“ и „позитиван било који тест“. У комбинацији „позитивна два или више теста“ најбољу дијагностичку ефикасност, уз ниску сензитивност показују комбинације DIF/RT, DIF/RT/IgG и RT/IgG. Када се упореде са брзим тестом који је појединачно имао најбоље параметре, комбинације DIF/RT, DIF/RT/IgG и RT/IgG не поправљају дијагностичку ефикасност брзог теста који се појединачно показао као најбољи. Овом комбинацијом тестова очували смо високе вредности специфичности, али уз велики пад сензитивности. На тај начин, овим строгим критеријумом смо само повећали трошкове дијагностике, али не и дијагностичку ефикасност. Сходно томе, ове комбинације тестова се такође не могу препоручити за дијагнозу акутне хламидијалне инфекције. Са друге стране, комбинацијом тестова „позитиван било који тест“ поправили смо вредности сензитивности уз благ пад специфичности. У овој комбинацији тестова најбољу дијагностичку ефикасност показује комбинација RT/IgA, а затим RT/IgA/IgG и IgA/IgG које показују и највеће вредности дијагностичке тачности у односу на друге комбинације. Иако ове комбинације, у односу

на брзи тест, имају бољи баланс сензитивности и специфичности оне не поправљају дијагностичку ефикасност. Слично, комбинације DIF/IgA и DIF/RT/IgA имају најбољи баланс сензитивности и специфичности, али ни ове комбинације у односу на појединачне тестове не поправљају дијагностичку ефикасност. Финално, анализа резултата комбиноване употребе тестова је показала да се у случајевима када је немогуће радити тестове амплификације нуклеинских киселина може користити комбинација RT/IgA, како због високе ORA и kappa вредности, тако и због добро избалансираног односа сензитивности и специфичности, уз високу специфичност од 94,3%. Са друге стране у ситуацијама које захтевају високу сензитивност препоручена је комбинација DIF/IgA која у односу на све остале показује најбољи баланс сензитивности и специфичности уз сензитивност од 100%. Сличне резултате нашим пружа и студија у којој је показано да комбинација резултата различитих тестова амплификације нуклеинских киселина може, уз очувану специфичност, да поправи сензитивност детекције хламидијалне инфекције уз напомену да употребу појединачних тестова за дијагнозу хламидијалне инфекције треба ограничити посебно код младих жена (212). Насупрот овим, али и нашим резултатима су резултати студије у којој је комбинација тестова амплификације нуклеинских киселина по строгом критеријуму (оба позитивна резултата теста) показала ниску сензитивност и специфичност (213). Неки аутори предлажу да се резултати неколико несавршених тестова могу користити у комбинацији да би се дефинисао несавршени златни стандард према коме се може упоредити нови тест (214, 215, 216). Тако је у једној студији уз помоћ комбинације „позитивна два или више теста“ дефинисан златни стандард који је служио за упоређивање нових дијагностичких тестова (217). Даље претпоставке су да употреба три теста која су условно независна, а заснивају се на различитим клиничким методама, рецимо детекцији антигена, култури ћелија и ДНК амплификацији има мању вероватноћу да направи исту врсту грешке него ако комбинацију чине два теста амплификације (218).

По узору на друге студије које су ROC анализом и дефинисањем нових *cut-off* вредности успеле да поправе дијагностичку ефикасност тестова, урадили смо ROC анализу серумског нивоа IgA и IgG антитела на хламидијални MOMP антиген. ROC крива је статистичка метода која се често користи у биомедицинским истраживањима за процену ефикасности дијагностичких тестова, односно њихове способности да дискриминишу оболеле (позитивне) од нормалних (негативних) случајева (219). Поред графичког приказа

ROC анализа даје и табеларни приказ вредности сензитивности и специфичности за одређене *cut-off* вредности које могу бити од користи за поређење дијагностичког учинка два или више тестова (220). Поред тога, површина испод криве (AUC) служи као добра мера укупне клиничке тачности теста, односно представља способност теста да разликује позитивне од негативних налаза. Приликом одређивања нове *cut-off* вредности, уобичајено се тежи смањењу броја лажно негативних и лажно позитивних дијагноза. Међутим, уобичајено је да смањење броја лажно позитивних дијагноза (повећање специфичности) резултира повећањем броја лажно негативних (смањење сензитивности) и обрнуто. На основу резултата добијених ROC анализом, можемо рећи да је основни допринос наше студије, пре свега, одређивање оптималне *cut-off* вредности засноване на идеалном односу сензитивности и специфичности теста чиме смо повећали број тачних дијагноза, док је број погрешних дијагноза сведен на минимум. Наиме, на основу карактеристика ROC криве (IgA: AUC = 0,952; IgG: AUC = 0,930) дефинисане су нове *cut-off* вредности (IgA: S/Co  $\geq$  0,87; IgG: Ru/ml  $\geq$  17,57) за серумски ниво IgA и IgG антитела на хламидијални MOMP антиген. Показали смо да се употребом ових нових *cut-off* вредности дијагностичка ефикасност серумског нивоа IgA и IgG антитела на хламидијални MOMP може значајно побољшати. Прегледом доступне литературе прикупљене детаљним и систематским претраживањем доступних биомедицинских база података „Medline“, „KOBSON“, „Embase“ и „ScienceDirect“ помоћу следећих кључних речи: „C. trachomatis“, „ROC analysys“, „serum“, „IgA“ и „IgG“ нису пронађене студије сличног дизајна и методолошког приступа.

Хламидијалне генитоуринарне инфекције су значајан медицински и економски проблем савременог света. Непосредне здравствене последице и опасност од хроничних секвела, међу којима је водећи проблем појава инфертилитета, сврставају ове инфекције у јавно-здравствене болести од посебног интереса, посебно за популацију младих. Последично, економске последице су врло озбиљне. Процењено је нпр. да су годишњи трошкови хламидијалне инфекције у Канади, за популацију доби од 10 до 39 година укупно 51.4 милиона долара (221). У држави Илиноис трошкови генитоуринарних хламидијалних инфекција су процењени од око 27,6 до 28,8 милиона долара, за популацију од 100,000 становника у којој је годишња инциденца овог обољења била од око 5,000 до 5,300 случајева (222). Тим поводом, многе студије су истраживале економске



аспекте врло разноврсних дијагностичко-терапијских стратегија које су имале за циљ искорењивање или смањивање последица ових обољења. Модели масовних односно организованих тестирања и контроле болести у популацији (223), примене дијагностике у кућним условима (224), економске перформансе дијагностичких метода примењених у циљу сузбијања секвела инфекције (225) и економске последице хроничних компликација (226) само су неке од бројних тема које су биле предмет истраживања последњих година у овој области.

Савремена дијагностика генитоуринарне хламидијалне инфекције почива на могућностима избора више метода, од којих тестови амплификације нуклеинских киселина имају најбоље дијагностичке перформансе. Међутим, релативно виша цена ових метода, у односу на друге врсте тестирања, може да буде неповољан економски чинилац који условљава ширу примену јефтинијих, мање поузданих дијагностичких тестова што је и примењено као дуготрајна пракса (227). Чињени су напори да се технолошким унапређењима побољша трошкова ефикасност нових дијагностичких метода. У једној студији у Великој Британији нпр. је показано да би трошкови примене молекуларне дијагностике уз болесника (*point of care nucleic acid amplification test*) могли да буду мањи за 11.7 милиона фунти, у односу на стандардну дијагностику, уз остваривање 46 више година квалитеног живљења и укупно 95000 избегнутих непотребних кура лечења (228).

Резултати наше економске анализе су показали да примена тестова амплификације нуклеинских киселина није исплатива економска стратегија у односу на друге дијагностичке методе, посебно брзи и серолошки тестови. Додатно, иницијално комбиновање два или више дијагностичка теста, које је знатно раширена пракса у Србији, посебно у лабораторијама у приватном власништву, је такође изразито економски нерационално. Студије које су истраживале релативне односе економских перформанси различитих дијагностичких метода хламидијалне генитоуринарне инфекције, интересантно, нису честе у свету, а код нас, како се може наћи у доступним изворима, нису ни спровођене. У једном детаљном систематском прегледу ранијих студија, за услове економског система у Великој Британији, учињена је таква компаративна економска анализа. Показало се да је примена тестова амплификације нуклеинских киселина не само

ефикаснија него и економски исплативија (130). Наиме, у том моделу популација је била хипотетична кохорта од 1000 особа, укупни трошкови за тест амплификације нуклеинских киселина (NAATs) су израчунати на 7070 фунти а правилно лечење би било спроведено код 12.63 инфицираних болесника. С друге стране, укупни трошкови за брзи тест односно тест имуноесеја антигена (*Clearview Chlamydia test*) су израчунати на 7180 и 7170 фунти а правилно лечење би било спроведено код 10.98 односно 7.14 особа са гениторуринарном хламидијалном инфекцијом. Дакле, тестови амплификације нуклеинских киселина су били доминанта економска стратегија у тој економској анализи, са мањим укупним трошковима и већом клиничком ефикасношћу.

Неповољан економски профил тестова амплификације нуклеинских киселина у нашој студији, за разлику од других сличних истраживања у развијеним земљама, може да се објасни разликама у друштвено – економским приликама. Наиме, цена услуга здравствених радника и фармакотерапије генитоуринарне хламидијалне инфекције у националном здравственом систему је вишеструко нижа од цена дијагностичких тестова. Последично, боље дијагностичке перформанске тестова амплификације нуклеинских киселина, које резултују знатно мањим бројем особа које се поновно дијагностикују и непотребно лечење не могу да компензују високу, почетну трошковну разлику. Уопште узев, у нашем здравственом систему у трошковнику третмана уобичајених инфекција уринарног тракта доминирају трошкови конвенционалне дијагностике (уринокултура са антибиограмом), док је учешће трошкова лекарских прегледа и лечења појединачно далеко испод половине укупне вредности трошкова (229).

Резултати анализе циљне популације у нашој студији, у поређењу са другим, истраживањима у развијеним земаљама као што су претходно поменуте у Канади и Сједињеним Америчким државама, подупиру овакав закључак (221, 222) Наиме, укупни трошкови за еквивалентну популацију оболелих су, за код нас вишеструко пута нижи него они процењени у поменутим студијама. Студија у држави Илиноис је, слично нашем истраживању, такође укључила само директне здравствене трошкове који су, на популационом ниову, процењени на више милиона долара. С друге стране, за разлику од студије у Канади, чије су методе обухватиле ширу, друштвену перспективу, наша студија није узела у разматрање неке индиректне здравствене трошкове, попут нпр. трошкова за

лечење нежељених дејстава примењене фармакотерапије ни нездравствене трошкове као што су трошкови губитка радне способности, квалитета живота, путни трошкови и друго. Ипак, разлика у процењеним трошковима је тако велика да се чини да ни укључивање таквих трошкова у нашу студију не би значајније променило основни наш закључак о релативном односу економских профила појединачних дијагностичких метода у нашој земљи.

У закључку, наша економска анализа доноси раритетне, ако не и прве резултате у нашем здравственом систему који се односе на компаративни приказ економског профила различитих дијагностичких метода за хламидијалне гениторуинарне инфекције. Они представљају теоријску основу за планирање дијагностичко-терапијских стратегија овог обољења и спровођења даљих истраживања која би требала да укључе анализу додатних типова трошкова и клиничких исхода и шире односно другојачије перспективе као што је сценарио лечења у приватној здравственој пракси. Такође, сазнања о трошковном профилу анализираних стратегија и укупној економској оптерећености друштва које доносе инфекције генитоуринарног тракта хламидијом могу да буду од користи у планирању мера унапређења управљања системом здравствене заштите у Србији.

## 6. ЗАКЉУЧЦИ

1. Упоредном анализом резултата добијених помоћу златног стандарда (RT-PCR) са резултатима добијеним употребом скрининг тестова (DIF, BT, IgA и IgG) утврђено је постојање слабог слагања добијених резултата. Најбоље слагање у односу на златни стандарпоказује брзи тест латералне хроматографије (BT).
2. Комбинацијом тестова по критеријуму „позитивна два или више теста“ нисмо поправили слагање резултата у односу на појединачне скрининг тестове, при чему најбоље слагање у односу на златни стандар показује комбинација директне имунофлуоресценције и брзог теста (DIF+BT), мада ни овом комбинацијом није поправљено слагање у односу на BT.
3. Комбинацијом тестова по критеријуму „позитиван било који тест“ такође нисмо поправили слагање резултата у односу на појединачне скрининг тестове. При томе, најбоље слагање у односу на златни стандар показује комбинација брзог теста и серумског нивоа IgA (BT/IgA), али ни овом комбинацијом није поправљено слагање у односу на BT.
4. Поређењем дијагностичке ефикасности појединачних скрининг тестова утврдили смо да BT, по већини анализираних параметара, уз супериорну специфичност (100%), позитивну предиктивну вредност (100%), проширен Јуденов индекс (130%) и дијагностичку тачност (97%) показује најбољу дијагностичку ефикасност. Ипак, због ниске сензитивности (33%) ова методасе не може препоручити за дијагнозу акутне хламидијалне инфекције.
5. Тест директне имунофлуоресценције и серумски ниво IgA и IgG антитела, у односу на BT, показују боље уравнотежен однос сензитивности и специфичности, али се због изразито ниске позитивне предиктивне вредности ни ови тестови не могу препоручити за дијагнозу акутне хламидијалне инфекције.
6. Комбинацијом тестова по критеријуму „позитивна два или више теста“ нисмо успели да поправимо дијагностичку ефикасносту односу на појединачне скрининг тестове, односно BT који је појединачно имао најбоље параметре дијагностичке ефикасности. Сходно томе, ове комбинације тестова се не могу препоручити за дијагнозу акутне хламидијалне инфекције.
7. Комбинацијом тестова по критеријуму „позитиван било који тест“ такође нисмо успели да поправимо дијагностичку ефикасносту односу на појединачне скрининг тестове. Ипак, комбинација DIF/IgA која показује добро избалансиран однос сензитивности и специфичности уз супериорну сензитивност од 100% се и поред ниске

позитивне предиктивне вредности може користити у ситуацијама које захтевају високу сензитивност.

8. ROC анализом серумског нивоа IgA и IgG антитела на хламидијални MOMP антиген и одређивањем нових *cut-off* вредности (на основу карактеристика ROC криве) поправили смо дијагностичку ефикасност ових тестова у односу на резултате добијене на основу *cut-off* вредности препоручених од стране произвођача теста.
9. Коришћењем нових *cut-off* вредности серумски ниво IgG показује високо избалансиран однос сензитивности и специфичности уз супериорну сензитивност од 100%, те се и поред ниске позитивне предиктивне вредности може користити у ситуацијама које захтевају високу сензитивност.
10. Применом нових *cut-off* вредности дефинисаних на основу ROC анализе, дијагностичка ефикасност комбинације IgA+IgG теста (позитивна оба теста) и комбинације IgA/IgG (позитиван било који тест) је значајно повећана у односу на резултате добијене на основу *cut-off* вредности препоручених од стране произвођача теста.
11. Економска анализа указује да су, за дати сценарио, најмањи укупни трошкови по пацијенту код коришћења брзог теста, те је стога примена овог теста доминантна економска стратегија, а прве алтернативе су серолошке методе.
12. Примена комбинације тестова није исплатива економска стратегија јер су укупни трошкови по пацијенту већи од трошкова примене појединачних тестова, а у случају комбинације директног и серолошких тестова приближавају се најмање исплативој стратегији, примени PCR методе. Имајући у виду претходну анализу дијагностичке ефикасности комбинованих тестова, таквом праксом се једино увећавају трошкови анализе, без битно унапређених дијагностичких перформанси.
13. Иако су дијагностичке перформансе свих тестова, како појединачних, тако и комбинованих, у односу на PCR методу знатно слабије, њена висока почетна цена, у условима трошкова националног здравственог система, не може да се компензује бољим дијагностичким резултатима у укупном економском профилу датог сценарија.

## 7. ЛИТЕРАТУРА

1. Cherilyn Elwell, Kathleen Mirrashidi, Joanne Engel. *Chlamydia* cell biology and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol.* 2016;14:385–400.
2. Moulder JW. Interaction of chlamydiae and host cells in vitro. *Microbiol Rev.* 1991; 55:143–90.
3. Jacquier N, Viollier PH, Greub G. The role of peptidoglycan in chlamydial cell division: towards resolving the chlamydial anomaly. *FEMS Microbiol Rev.* 2015;39:262–75.
4. Wyrick PB, Knight ST. Pre-exposure of infected human endometrial epithelial cells to penicillin in vitro renders *Chlamydia trachomatis* refractory to azithromycin. *J Antimicrob Chemother.* 2004;54:79–85.
5. Wyllie S, Ashley RH, Longbottom D, Herring AJ. The major outer membrane protein of *Chlamydia psittaci* functions as a porin-like ion channel. *Infect Immun.* 1998;66:5202–7.
6. Millman KL, Tavaré S, Dean D. Recombination in the *ompA* gene but not the *omcB* gene of *Chlamydia* contributes to serovar-specific differences in tissue tropism, immune surveillance, and persistence of the organism. *J Bacteriol.* 2001;183:5997–6008.
7. Dean D, Bruno WJ, Wan R, Gomes JP, Devignot S, Mehari T, de Vries HJ, Morré SA, Myers G, Read TD, Spratt BG. Predicting phenotype and emerging strains among *Chlamydia trachomatis* infections. *Emerg Infect Dis.* 2009;15:1385–94.
8. Lampe MF, Stamm WE. Purification of *Chlamydia trachomatis* strains in mixed infection by monoclonal antibody neutralization. *J Clin Microbiol.* 1994;32:533–5.
9. Vandahl BB, Birkelund S, Christiansen G. Genome and proteome analysis of *Chlamydia*. *Proteomics.* 2004;4:2831–42.
10. Stephens RS, Kalman S, Lammel C, Fan J, Marathe R, Aravind L, Mitchell W, Olinger L, Tatusov RL, Zhao Q, Koonin EV, Davis RW. Genome sequence of an obligate intracellular pathogen of humans: *Chlamydia trachomatis*. *Science* 1998;282:754–9.
11. Peeling RW, Patton DL, Cosgrove Sweeney YT, Cheang MS, Lichtenwalner AB, Brunham RC, Stamm WE. Antibody response to the chlamydial heat-shock protein 60 in an experimental model of chronic pelvic inflammatory disease in monkeys (*Macaca nemestrina*). *J Infect Dis.* 1999;180:774–9.
12. Eckert LO, Hawes SE, Wölner-Hanssen P, Money DM, Peeling RW, Brunham RC, Stevens CE, Eschenbach DA, Stamm WE. Prevalence and correlates of antibody to

- chlamydial heat shock protein in women attending sexually transmitted disease clinics and women with confirmed pelvic inflammatory disease. *J Infect Dis.* 1997;175:1453–8.
13. Ault KA, Statland BD, King MM, Dozier DI, Joachims ML, Gunter J. Antibodies to the chlamydial 60 kilodalton heat shock protein in women with tubal factor infertility. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 1998;6:163–7.
  14. Cornelis GR, Van Gijsegem F. Assembly and function of type III secretory systems. *Annu Rev Microbiol.* 2000; 54:735–74.
  15. Jewett TJ, Fischer ER, Mead DJ, Hackstadt T. Chlamydial TARP is a bacterial nucleator of actin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103:15599–604.
  16. Kawa DE, Stephens RS. Antigenic topology of chlamydial PorB protein and identification of targets for immune neutralization of infectivity. *J Immunol.* 2002;168:5184–91.
  17. Kumar Y, Valdivia RH. Actin and intermediate filaments stabilize the *Chlamydia trachomatis* vacuole by forming dynamic structural scaffolds. *Cell Host Microbe.* 2008;4:159–69.
  18. Pirbhai M, Dong F, Zhong Y, Pan KZ, Zhong G. The secreted protease factor CPAF is responsible for degrading pro-apoptotic BH3-only proteins in *Chlamydia trachomatis*-infected cells. *J Biol Chem.* 2006;281:31495-501.
  19. Choroszy-Król IC, Frej-Mądrzak M, Jama-Kmiecik A, Bober T, Jolanta Sarowska J. Characteristics of the *Chlamydia trachomatis* species - immunopathology and infections. *Adv Clin Exp Med.* 2012;21:799–808.
  20. Hammerschlag MR. The intracellular life of chlamydiae. *Semin Pediatr Infect Dis.* 2002;13:239–48.
  21. Baehr W, Zhang YX, Joseph T, Su H, Nano FE, Everett KD, Caldwell HD. Mapping antigenic domains expressed by *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988;85:4000–4.
  22. Wang SP, Grayston JT. Three new serovars of *Chlamydia trachomatis*: Da, Ia, and L2a. *J Infect Dis.* 1991;163:403–5.
  23. Shachter J. Chlamydial infection. *N Engl J Med* 1978;298:428-35.
  24. Brunham R, Yang C, Maclean I, Kimani J, Maitha G, Plummer F. *Chlamydia trachomatis* from individuals in a sexually transmitted disease core group exhibit frequent sequence variation in the major outer membrane protein (omp1) gene. *J Clin Invest.* 1994;94:458–63.

25. Dautry-Varsat A, Subtil A, Hackstadt T. Recent insights into the mechanisms of Chlamydia entry. *Cell Microbiol.* 2005;7:1714-22.
26. Su H, Raymond L, Rockey DD, Fischer E, Hackstadt T, Caldwell HD. A recombinant Chlamydia trachomatis major outer membrane protein binds to heparan sulfate receptors on epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93:11143-8.
27. Menozzi FD, Pethe K, Bifani P, Soncin F, Brennan MJ, Locht C. Enhanced bacterial virulence through exploitation of host glycosaminoglycans. *Mol Microbiol.* 2002;43:1379-86.
28. Wehrl W, Brinkmann V, Jungblut PR, Meyer TF, Szczepek AJ. From the inside out—processing of the Chlamydial autotransporter PmpD and its role in bacterial adhesion and activation of human host cells. *Mol Microbiol.* 2004;51:319-34.
29. Hackstadt T, Rockey DD, Heinzen RA, Scidmore MA. Chlamydia trachomatis interrupts an exocytic pathway to acquire endogenously synthesized sphingomyelin in transit from the Golgi apparatus to the plasma membrane. *EMBO J.* 1996;15:964-77.
30. Scidmore MA, Hackstadt T. Mammalian 14-3-3beta associates with the Chlamydia trachomatis inclusion membrane via its interaction with IncG. *Mol. Microbiol.* 2001;39:1638-50.
31. Hackstadt T, Rockey DD, Heinzen RA, Scidmore MA. Chlamydia trachomatis interrupts an exocytic pathway to acquire endogenously synthesized sphingomyelin in transit from the Golgi apparatus to the plasma membrane. *EMBO J.* 1996;15:964-77.
32. Moore ER, Fischer ER, Mead DJ, Hackstadt T. The chlamydial inclusion preferentially intercepts basolaterally directed sphingomyelin-containing exocytic vacuoles. *Traffic.* 2008;9:2130-40.
33. Carabeo RA, Mead DJ, Hackstadt T. Golgi-dependent transport of cholesterol to the Chlamydia trachomatis inclusion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:6771-6.
34. Wylie JL, Hatch GM, McClarty G. Host cell phospholipids are trafficked to and then modified by Chlamydia trachomatis. *J Bacteriol.* 1997;179:7233-42.
35. Hackstadt T, Todd WJ, Caldwell HD. Disulfide-mediated interactions of the chlamydial major outer membrane protein: role in the differentiation of chlamydiae? *J Bacteriol.* 1985;161:25-31.
36. Belland RJ, Zhong G, Crane DD, Hogan D, Sturdevant D, Sharma J, Beatty WL, Caldwell HD. Genomic transcriptional profiling of the developmental cycle of Chlamydia trachomatis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:8478-83.



37. Cocchiaro JL, Valdivia RH. New insights into Chlamydia intracellular survival mechanisms. *Cell Microbiol.* 2009;11:1571–8.
38. Morré SA, van den Brule AJ, Rozendaal L, Boeke AJ, Voorhorst FJ, de Blok S, Meijer CJ. The natural course of asymptomatic Chlamydia trachomatis infections: 45% clearance and no development of clinical PID after one-year follow-up. *Int J STD AIDS.* 2002;13 Suppl 2:12–8.
39. Kokcu A, Yavuz E, Celik H, Bildircin D. A panoramic view to relationships between reproductive failure and immunological factors. *Arch Gynecol Obstet.* 2012;286:1283–9.
40. Beatty WL, Belanger TA, Desai AA, Morrison RP, Byrne GI. Role of tryptophan in gamma interferon-mediated chlamydial persistence. *Ann N Y Acad Sci.* 1994 Aug 15;730:304–6.
41. Beatty WL, Belanger TA, Desai AA, Morrison RP, Byrne GI. Tryptophan depletion as a mechanism of gamma interferon-mediated chlamydial persistence. *Infect Immun.* 1994;62:3705–11.
42. Beatty WL, Morrison RP, Byrne GI. Reactivation of persistent Chlamydia trachomatis infection in cell culture. *Infect Immun.* 1995;63:199–205.
43. Peeling RW, Kimani J, Plummer F, Maclean I, Cheang M, Bwayo J, Brunham RC. Antibody to chlamydial hsp60 predicts an increased risk for chlamydial pelvic inflammatory disease. *J Infect Dis.* 1997;175:1153–8.
44. Ness RB, Soper DE, Richter HE, Randall H, Peipert JF, Nelson DB, Schubeck D, McNeeley SG, Trout W, Bass DC, Hutchison K, Kip K, Brunham RC. Chlamydia antibodies, chlamydia heat shock protein and adverse sequelae after pelvic inflammatory disease: the PID Evaluation and Clinical Health (PEACH) Study. *Sex Transm Dis.* 2008;35:129–35.
45. Ault KA, Statland BD, King MM, Dozier DI, Joachims ML, Gunter J. Antibodies to the chlamydial 60 kilodalton heat shock protein in women with tubal factor infertility. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 1998;6:163–7.
46. Centers for Disease Control and Prevention. Sexually Transmitted Disease Surveillance 2007 Supplement, Chlamydia Prevalence Monitoring Project Annual Report 2007. Atlanta: US Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, 2009.
47. Weinstock H, Berman S, Cates W Jr. Sexually transmitted diseases among American youth: incidence and prevalence estimates, 2000. *Perspect Sex Reprod Health* 2004;36:6–10.
48. Darville T, Hiltke TJ. Pathogenesis of genital tract disease due to Chlamydia trachomatis. *J Infect Dis.* 2010;201 Suppl 2:S114–25.

49. Morrison SG, Su H, Caldwell HD, Morrison RP. Immunity to murine *Chlamydia trachomatis* genital tract reinfection involves B cells and CD4(+) T cells but not CD8(+) T cells. *Infect Immun* 2000;68:6979–87.
50. Grayston JT, Wang SP, Yeh LJ, Kuo CC. Importance of reinfection in the pathogenesis of trachoma. *Rev Infect Dis*. 1985;7:717–725.
51. Watkins NG, Hadlow WJ, Moos AB, Caldwell HD. Ocular delayed hypersensitivity: a pathogenetic mechanism of chlamydial conjunctivitis in guinea pigs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986;83:7480–4.
52. Cruz A, Khader SA, Torrado E, Eraga A, Pearl JE, Cooper AM, Castro A et al. Cutting edge: IFN-gamma regulates the induction and expansion of IL-17-producing CD4 T cells during mycobacterial infection. *J Immunol*. 2006;177:1416–20.
53. Sami L, Gottlieb, David H, Martin, Fujie Xu, Gerald I, Byrne, Robert C, Brunham. The natural history and immunobiology of *Chlamydia trachomatis* genital infection and implications for hlamydia control. *Journal of infectious Diseases*. 2010;201:190-204.
54. O'Connell CM, Ferone ME. *Chlamydia trachomatis* genital infections. *Microb cell* 2016;3: 390-403.
55. Centers for Disease Control and Prevention. *Sexually Transmitted Disease Surveillance 2016*. Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services; 2017.
56. Satterwhite CL, Torrone E, Meites E, Dunne EF, Mahajan R, Ocfemia MC, Su J, Xu F, Weinstock H. Sexually transmitted infections among US women and men: Prevalence and incidence estimates, 2008. *Sex Trans Dis* 2013;40: 187–193.
57. Stamm WE. *Chlamydia trachomatis* infections of the adult. In: Holmes KK, Sparling FF, Stamm WE. *Sexually transmitted diseases*. NY: mCgRAW-hILLcOMPANIES, Inc. 2007:575-94.
58. US Preventive Services Task Force. Screening for chlamydial infection: recommendation statement. *Ann Intern Med*. 2007; 147:128–34. PubMed PMID: 17576996.
59. Bébéar C, de Barbeyrac B. Genital *Chlamydia trachomatis* infections. *Clin Microbiol Infect*. 2009;15:4–10.
60. Cluver C, Novicova N, Ericsson DO, Bengtsson K, Lingman GK. Interventions for treating genital *Chlamydia trachomatis* infection in pregnancy. *Cochrane Database Syst Rev* 2017;22;9:CD010485.
61. Monden K, Kumon H. Genital chlamydial infection. *Nihon Rinsho*. 2009;67:125-8.
62. Meyer T. Diagnostic Procedures to Detect *Chlamydia trachomatis* Infections. *Microorganisms*. 2016;5:4.

63. CDC. Sexually transmitted disease surveillance. Department of Health and Human Services 2016. Available from: [https://www.cdc.gov/std/stats16/CDC\\_2016\\_STDS\\_Report-for508WebSep21\\_2017\\_1644.pdf](https://www.cdc.gov/std/stats16/CDC_2016_STDS_Report-for508WebSep21_2017_1644.pdf).
64. ECDC. European Centre for Disease Prevention and Control. Annual Epidemiological Report 2016 - Chlamydia. Available from: <https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/Chlamydia%20AER.pdf>.
65. Golinowska S, Sowa A, TopórMądryR. Health status and health care systems in central and eastern European countries: Bulgaria, Estonia, Poland, Slovakia and Hungary. Brussels: European Network of Economic Policy Research Institute/Centre for European Policy Studies;2006 (ENEPRI Research Report No. 31). Available from: <https://www.ceps.eu/system/files/book/1417.pdf>.
66. Lanjouw E, Ouburg S, HJ de Vries, Stary A, Radcliffe K, Unemo M. 2015 European guideline on the management of *Chlamydia trachomatis* infections. International Journal of STD&AIDS 2015; 1-16.
67. US Centers for Disease Control and Prevention. Male chlamydia screening consultation Atlanta. Georgia. 2006.
68. Wasserheit JN. Effect of changes in human ecology and behavior on patterns of sexually transmitted diseases, including human immunodeficiency virus infection. Proc Natl Acad Sci USA. 1994;91:2430-5.
69. Peipert JF. Clinical practice. Genital chlamydial infections. N Engl J Med. 2003;349:2424–30.
70. Haggerty CL, Gottlieb SL, Taylor BD, Low N, Xu F, Ness RB. Risk of sequelae after *Chlamydia trachomatis* genital infection in women. J Infect Dis. 2010; 15:134–55.
71. Paavonen J, Eggert- Kruse W. *Chlamydia trachomatis* impact on human reproduction. Hum Reprod Update. 1999;5:433-47.
72. Stamm WE, Guinan ME, Johnoson C, Starcher T, Holmes KK, Mc Cormack WM. Effect of treatment regimens for *Neisseria gonorrhoeae* on simultaneous infection with *Chlamydia trachomatis*. New Engl J Med 1984;310:545-9.
73. Rees E. The treatment of pelvic inflammatory disease. Am J Obstet Gynecol 1980;138:1042-7.
74. Bevan CD, Johal BJ, Mumtaz G, Ri dgwaj GL, Siddle NC. Clinical, laparoscopic and microbiological findings in acute salpingitis: report on a United Kingdom cohort. Br J Obstet Gynaecol 1995;102:407-14.
75. Morcos R, Frost N, Hnat M, Petrunak A, CalditoGet. Laparoscopic versus clinical diagnosis of acute pelvic inflammatory disease. J Reprod Med 1993;38:53-6.

76. Recommendations arising from the 31<sup>st</sup> Study Group: The Prevention of Pelvic Infection. London: RCOG Pres, 1996. Pp. 267-70.
77. Trent M, Bass D, Ness RB, Haggerty C. Recurrent PID, subsequent STI and reproductive health outcomes: findings from the PID evaluation and clinical health (PEACH) study. *Sex Transm Dis* 2011;38:879-81.
78. Westrom L, Joesoef R, Reynolds G, Hagdu A, Thompson SE. Pelvic inflammatory disease and fertility. A cohort study of 1, 844 women with laparoscopically verified disease and 657 control women with normal laparoscopic results. *Sex Transm Dis* 1992;19:185-92.
79. Chow JM, Yonekura ML, Richwald GA, Greenland S, Sweet RL, Schachter J. The association between *Chlamydia trachomatis* and ectopic pregnancy. A matched-pair, case-control study. *JAMA* 1990;263:3164-7.
80. Miettinen A, Heinonen PK, Teisala K, Hakkarainen K, Punnonen R. Serologic evidence for the role of *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma hominis* in the etiology of tubal factor infertility and ectopic pregnancy. *Sex Transm Dis* 1990;17:10-14.
81. Ness RB, Trautmann G, Richter HE, Randall H, Peipert JF, Nelson DB, Schubeck D, McNeeley SG, Trout W, Bass DC, Soper DE. Effectiveness of treatment strategies of some women with pelvic inflammatory disease: a randomized trial. *Obstet Gynecol* 2005;106:573-80.
82. Gibbs RS. The origins of stillbirth: infectious diseases. *Semin Perinatol.* 2002;26:75–8.
83. Screening for Chlamydial Infection: U.S. Preventive Services Task Force Recommendation Statement. *Annals of Internal Medicine* 2007;147:2.
84. Jain S. Perinatally acquired *Chlamydia trachomatis* associated morbidity in young infants. *J Matern Fetal Med.* 1999;8:130–3.
85. Hammerschlag MR, Cummings C, Roblin PM, Williams TH, Delke I. Efficacy of neonatal ocular prophylaxis for the prevention of chlamydial and gonococcal conjunctivitis. *N Engl J Med.* 1989;320:769–72.
86. Peipert JF. Clinical practice. Genital chlamydial infections. *N Engl J Med* 2003;349:2424-30.
87. Numazaki K, Kusaka T, Chiba S. Perinatal complications are associated with seropositivity for *Chlamydia trachomatis* during pregnancy. *Clin Infect Dis.* 1996;23:208.
88. Gencay M, Koskiniemi M, Saikku P, Puolakkainen M, Raivio K, Koskela P, Vaheri A. *Chlamydia trachomatis* seropositivity during pregnancy is associated with perinatal complications. *Clin Infect Dis.* 1995;211:424-426.

89. Hicks D. Complications of *Chlamydia trachomatis* infection in men. In: Moss TR, ed. International handbook of *Chlamydia*, 3<sup>rd</sup> edn. Haslemere. UK: Alden Press, 2008;99-109.
90. Barbeyrac de B, Papaxanthos Roche A, Mathieu C, Germain C, Brun JL, Gachet M, Mayer G, Bebear C, Chene G, Hocke C. *Chlamydia trachomatis* in subfertile couples undergoing an in vitro fertilization program: a prospective study. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2006;129:46-53.
91. Bezold G, Politch JA, Kiviat NB, Kuyrers JM, Wolff H, Anderson DJ. Prevalence of sexually transmissible pathogens in semen from asymptomatic male infertility patients with and without leucocytospermia. Fertil Steril 2007;87:1087-97.
92. Greendale GA, Haas ST, Holbrook K, Walsh B, Schachter J, Philips R Set al. The relationship of *Chlamydia trachomatis* infection and male infertility. Am J Public Health 1993;83:996-1001.
93. Joki-Korpela P, Sahrakorpi N, Halttunen M, Surcel HM, Paavonen J, Tiitinen A. The role of *Chlamydia trachomatis* infection in male infertility. Fertil Steril 2009;91: 1448-50.
94. Bally F, Quach A. Chlamydia: from population screening to individual repeat screening. Rev Med Suisse 2014;10:1884-6.
95. Ljubin- Sternak S, Meštrović T. *Chlamydia trachomatis* and genital Mycoplasmas: Pathogens with an impact on human reproductive health. J Pathog 2014;183167.
96. Lydia A. Shrier, Deborah Dean, Ellen Klein, Kimberly Harter, Peter A. Rice. Limitations of screening tests for the detection of *Chlamydia trachomatis* in asymptomatic adolescent and young adult women. American Journal of Obstetrics and Gynecology 2004;190: 654-62
97. Morré SA, van Valkengoed IGM, de Jong A, Boeke AJ, van Eijk Mejer CJ, van den Brule AJ. Mailed, home-obtained urine specimens: a reliable screening approach for detecting asymptomatic *Chlamydia trachomatis* infections. J Clin Microbiol 1999;37:976-980.
98. Kacena KA, Quinn SB, Howell MR, Madico GE, Quinn TC, Gaydos CA. Pooling urine samples for ligase chain reaction screening for genital *Chlamydia trachomatis* infection in asymptomatic women. J Clin Microbiol 1998;36:481-485.
99. Schachter J, Chernesky MA, Willis DE, Fine PM, Martin DH, Fuller D, Jordan JA, Janda W, Hook EW. Vaginal swabs are the specimens of choice when screening for *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*: results from a multicenter evaluation of the APTIMA assays for both infections. Sex Transm Dis 2005;32:725-8.
100. Masek BJ, Arora N, Quinn N, Aumakhan B, Holden J, Hardick A, Agreda P, Barnes M, Gajdos CA. Performance of three nucleic acid amplification tests for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* by use of self-collected vaginal

- swabs obtained via an internet-based screening program. *J Clin Microbiol* 2009;47:1663-7.
101. Shafer M-A, Moncada J, Boyer CB, Betsinger K, Flinn SD, Schachter J. Comparing first-void urine specimens, self-collected vaginal swabs, and endocervical specimens detect *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* by a nucleic acid amplification test. *J Clin Microbiol* 2003;41:4395-9.
  102. Schachter J, McCormack WM, Chernesky MA, Martin DH, Van Der Pol B, Rice PA, Hook EW, Stamm WC, Quinn TC, Chow JM. Vaginal swabs are appropriate specimens for diagnosis of genital tract infection with *Chlamydia trachomatis*. *J Clin Microbiol* 2003;41:3784-9.
  103. Hsieh Y-H, Howell MR, Gajdos JC, McKee KT Jr, Quinn TC, Gajdos CA. Preference among female army recruits for use of self-administered vaginal swabs or urine to screen for *Chlamydia trachomatis* genital infections. *Sex Transm Dis* 2003;30:769-73.
  104. Michel CC, Sonnex C, Carne CA, White JA, Magbana JP, Nadala EC Jr, Lee HH. *Chlamydia trachomatis* load at matched anatomical sites: implications for screening strategies. *J Clin Microbiol* 2007;45:1395-402.
  105. Falk L, Coble BI, MjÖrnberg PA, Fredlund H. Sampling for *Chlamydia trachomatis* infection—a comparison of vaginal, first-catch urine, combined vaginal and first-catch urine and endocervical sampling. *Int J STD AIDS* 2010;21:283-7.
  106. Howell MR, Quinn TC, Gaydos CA. Screening for *Chlamydia trachomatis* in asymptomatic women attending family planning clinics. A cost-effectiveness analysis of three strategies. *Ann Intern Med* 1998;128:277-84.
  107. Marrazzo JM, Celum CL, Hillis SD, Fine D, DeLisle S, Handsfield HH. Performance and cost-effectiveness of selective screening criteria for *Chlamydia trachomatis* infection in women. Implications for a national *Chlamydia* control strategy. *Sex Transm Dis* 1997;24:131-41.
  108. CDC. Recommendations for the Laboratory –Based Detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*. Recommendations and Reports - 2014 [Online]. Available: <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr6302a1.htm>. [Accessed 29.10. 2017].
  109. E. Lanjouw, S Ouburg, HJ de Vries, et al. European guideline on the management of *Chlamydia trachomatis* infections. *Int J STD AIDS* 2016;27:333-48.
  110. Ripa KT, Mardh PA. Cultivation of *Chlamydia trachomatis* in cycloheximide-treated McCoy cells. *J Clin Microbiol* 1977;6:328-31.
  111. Johnson RE, Newhall WJ, Papp JR, Knapp JS, Black CM, Gift TL, Steece R, Markowitz LE, Devine OJ, Walsh CM. Screening tests to detect *Chlamydia*

- trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* infections—2002. *MMWR Recomm. Rep.* 2002;11:1–38.
112. Barnes RC. Laboratory diagnosis of human chlamydial infections. *Clin Microbiol Rev* 1989;2:119-36.
  113. Papp J.R, Schachter J, Gaydos C.A, et al. Recommendations for the laboratory-based detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*-2014. *MMWR Recomm. Rep* 2014;63:1–19.
  114. Pate MS, Hook EW. Laboratory to laboratory variation in *Chlamydia trachomatis* culture practices. *Sex Transm Dis* 1995;22:322-6.
  115. Stamm WE, Tam M, Koester M, Cles L. Detection of *Chlamydia trachomatis* inclusions in McCoy cell cultures with fluorescein-conjugated monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol.* 1983;17:666–8.
  116. Yoder BL, Stamm WE, Koester CM, Alexander ER. Microtest procedure for isolation of *Chlamydia trachomatis*. *J Clin Microbiol.* 1981;13:1036–9.
  117. Robinson A.J., Ridgway G.L. Modern diagnosis and management of genital *Chlamydia trachomatis* infection. *Br. J. Hosp. Med.* 1996;55:388–393.
  118. Black CM, Marrazzo J, Johnson RE, Hook EW 3rd, Jones RB, Green TA, Schachter J, Stamm WE, Bolan G, St Louis ME, Martin DH. Head-to-head multicenter comparison of DNA probe and nucleic acid amplification tests for *Chlamydia trachomatis* infection in women performed with an improved reference standard. *J Clin Microbiol.* 2002;40:3757-63.
  119. Jang D, Sellors JW, Mahony JB, Pickard L, Chernesky MA. Effects of broadening the gold standard on the performance of a chemiluminometric immunoassay to detect *Chlamydia trachomatis* antigens in centrifuged first void urine and urethral swab samples from men. *Sex Transm Dis* 1992;19: 315–319.
  120. CDC. False-positive results with the use of chlamydial tests in the evaluation of suspected sexual abuse –Ohio 1999. *MMWR* 1991;39:932-5.
  121. Stamm WE. Diagnosis of *Chlamydia trachomatis* genitourinary infections. *Ann Intern Med* 1988;108:710-7.
  122. Kellogg JA, Seiple JW, Hick ME. Cross-reaction of clinical isolates of bacteria and yeasts with the Chlamydiazyme test for chlamydial antigen, before and after use of a blocking reagent. *Am J Clin Pathol* 1992;97:309-12.
  123. CDC. Screening Tests To Detect *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* infections Recommendations and Reports-2002. *MMWR* 2002;51:15.
  124. Friedek D, Ekiel A, Martirosian G. *Chlamydia trachomatis*: etiopathogenesis and diagnosis of infection. *Przegl Epidemiol.* 2005;59:723-30.

125. Thejls H, Gnarpe J, Gnarpe H, Larsson PG, Platz-Christensen JJ, Ostergaard L, Victor A. Expanded gold standard in the diagnosis of *Chlamydia trachomatis* in a low prevalence population: diagnostic efficacy of tissue culture, direct immunofluorescence, enzyme immunoassay, PCR and serology. *Genitourin Med.* 1994;70:300-3.
126. Schachter J. DFA, EIA, PCR, LCR and other technologies: what tests should be used for diagnosis of chlamydia infections? *Immunol Invest.* 2013;26:157-61.
127. Van Dommelen L, Van Tiel FH, Ouburg S, et al. Alarming poor performance in *Chlamydia trachomatis* point-of-care testing. *Sex Transm Infect.* 2010;86:355-9.
128. van der Helm JJ, Sabajo LO, Grunberg AW, Morre SA, Speksnijder AG, de Vries HJ. Point-of-care test for detection of urogenital *Chlamydia* in women shows low sensitivity. A performance evaluation study in two clinics in Suriname. *PLoS One* 2012;7:e32122.
129. Libbus MK. *Chlamydia Rapid Test* was moderately accurate for diagnosing *Chlamydia* infection in women. *Evid Based Nurs.* 2008;11: 89.
130. Hislop J, Quayyum Z, Flett G, Boachie C, Fraser C, Mowatt G. Systematic review of the clinical effectiveness and cost-effectiveness of rapid point-of-care tests for the detection of genital *Chlamydia* infection in women and men Review. *Health Technol Assess* 2010;14:1–97.
131. Skidmore S. Poorly performing point-of-care tests for chlamydia: What can be done? *Sex Transm Infect* 2010;86:330.
132. Schachter J. Point-of-care tests using enzyme detection to diagnose *Chlamydia trachomatis* infection do not work. But when they fail in clinical trials, they reappear under different names. *Sex Transm Infect.* 2016;92:406-7.
133. Abbai-Shaik NS, Reddy T, Govender S, Ramiec G. Poor Performance of the *Chlamydia Rapid Test Device* for the detection of Asymptomatic Infections in South African Men: A Pilot Study. *Sex Transm Infect. J Sex Transm Dis.* 2016: 8695146.
134. Suhland KL, Counts JM, Stamm WE. Laboratory methods for detection of *Chlamydia trachomatis*: survey of laboratories in Washington State. *J Clin Microbiol.* 1997;35:3210-4.
135. Bañuelos Pánuco CA, Deleón Rodríguez I, Hernández Méndez JT, Martínez Guzman LA, Akle Fierro D, Miranda Murillo J, Reyes Maldonado E. Detection of *Chlamydia trachomatis* in pregnant women by the Papanicolaou technique, enzyme immunoassay and polymerase chain reaction. *Acta Cytol* 2000;44:114-23.
136. Van Dyck E, Ieven M, Pattyn S, Van Damme L, Laga M. Detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* by enzyme immunoassay, culture, and three nucleic acid amplification tests. *J Clin Microbiol.* 2001;39:1751-6.



137. Persson K. The role of serology, antibiotic susceptibility testing and serovar determination in genital chlamydial infections. *Best Pract. Res Clin Obstet Gynaecol* 2002;16:801-14.
138. Clad A, Freidank HM, Kunze M, Schnoeckel U, Hofmeier S, Flecken U, Petersen EE. Detection of seroconversion and persistence of *Chlamydia trachomatis* antibodies in five different serological tests. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000;19:932-7.
139. Mouton JW, Peeters MF, van Rijssort-Vos JH, Vercoyen RP. Tubal factor pathology caused by *Chlamydia trachomatis*: the role of serology. *Int J STD AIDS* 2002;13:26-29.
140. Schachter J, Cles J, Ray R, Hines PA: Failure of serology in diagnosing chlamydial infections of the female genital tract. *J Clin Microbiol.* 1979;10:647-9.
141. Mabey D, Peeling RW. Lymphogranuloma venereum. *Sex Transm Infect.* 2002;78:90-2.
142. Convaj D, Glazener CM, Caulo EO, Hodgson J, HullMG, Clarke SK, Stirrat GM. Chlamydial serology in fertile and infertile women. *Lancet* 1984;1:191-3.
143. Richmond SJ, Caul EO. Fluorescent antibody studies in chlamydial infections. *J Clin Microbiol* 1975;1:345-52.
144. Morre SA, Munk C, Person K, Kruger- Kjaers S, van Dijk R, Meijer CJ, van Den Brule AJ. Comparison of three commercially available peptide-based immunoglobulin G (IgG) and IgA assays to microimmunofluorescence assay for detection of *Chlamydia trachomatis* antibodies. *J Clin Microbiol* 2002;40:584-7.
145. Land JA, den Hartog JE. Chlamydia antibody testing in subfertile women. *Drugs Today* 2006;42:35-42.
146. Pokrzywnicka M, Krajewski P, Kwiatkowska M. Chlamydia infections in the neonatal period. *MedWiek Rozwoj* 2005;9:65-9.
147. Puolakkainen M. Laboratory diagnosis of persistent human chlamydial infection. *Front Cell Infect Microbiol.* 2013;3:99.
148. Taylor- Robinson D. Evaluation and comparison of tests to diagnose *Chlamydia trachomatis* genital infections. *Hum Reprod.* 1997;12 (suppl):113-20.
149. Elias J, Frosch M, Vogel U. Neisseria. In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW, editors. *Manual of clinical microbiology.* 10th ed. American Society of Microbiology; Washington, DC: 2011; pp. 559-603.
150. Davies PO, Ridgway GL. The role of polymerase chain reaction and ligase chain reaction for the detection of *Chlamydia trachomatis*. *Int J STD AIDS.* 1997;8:731-8.

151. Cook RL, Hutchison SL, Ostergaard L, Braithwaite RS, Ness RB. Systematic review: noninvasive testing for *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *Ann Intern Med* 2005;142:914–25.
152. Schachter J, Chow JM, Howard H, Bolang G, Moncada J. Detection of *Chlamydia trachomatis* by nucleic acid amplification testing: our evaluation suggests that CDC-recommended approaches for confirmatory testing are ill-advised. *J Clin Microbiol* 2006;44: 2512–7.
153. Workowski KA and Bolan GA. Centers for Disease Control and Prevention Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2015. *MMWR Recomm Rep* 2015;64:1–137.
154. Schachter J, Hook EW, Martin DH, Willis D, Fine P, Fuller D, Jordan J, Janda WM, Chernesky M. Confirming positive results of nucleic acid amplification tests (NAATs) for *Chlamydia trachomatis*: all NAATs are not created equal. *J Clin Microbiol*. 2005;43:1372–3.
155. Moncada J, Donegan E, Schachter J. Evaluation of CDC-recommended approaches for confirmatory testing of *Neisseria gonorrhoeae* nucleic acid amplification results. *J Clin Microbiol*. 2008;46:1614–9.
156. Howell MR, Quinn TC, Brathwaite W, Gaydos CA. Screening women for *Chlamydia trachomatis* in family planning clinics: the cost-effectiveness of DNA amplification assays. *Sex Transm Dis*. 1998;25:108–17.
157. Hu D, Hook EW, III, Goldie SJ. Screening for *Chlamydia trachomatis* in women 15 to 29 years of age: a cost-effectiveness analysis. *Ann Intern Med*. 2004;141:1501–13.
158. Hamers FF, Massol J, Maillère P; participates of Round Table n° 5 Giens XXV. How to best define target populations of medicines in view of their coverage by the national health insurance scheme? *Therapie*. 2010;65:341-5, 335-9.
159. Newman L, Rowley J, Vander Hoorn S, Wijesooriya NS, Unemo M, Low N, Stevens G, Gottlieb S, Kiarie J, Temmerman M. Global Estimates of the Prevalence and Incidence of Four Curable Sexually Transmitted Infections in 2012 Based on Systematic Review and Global Reporting. *PLoS One*. 2015; 8:10:e0143304.
160. Hong H, Choi Y, Hahn S, Park SK, Park BJ. Nomogram for sample size calculation on a straightforward basis for the kappa statistic. *Ann Epidemiol* 2014;24:673-80.
161. Westrom L, Joesoef R, Reynolds G, Hagdu A, Thompson SE. Pelvic inflammatory disease and fertility: a cohort study of 1,844 women with laparoscopically verified disease and 657 control women with normal laparoscopic results. *Sex Transm Dis*. 1992;19:185-92.
162. Donders GG, van Gerven V, de Wet HG, van Straten AM, de Boer F. Rapid antigen tests for *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* are not accurate for

- screening women with disturbed vaginal lactobacillary flora. *J Infect Dis.* 1996;28:559-62.
163. Van Dommelen L, van Tiel F.H, Ouburg S, Brouwers EE, Terporten PH, Savelkoul PH, Morre SA, Bruggeman CA, Hoebe CJ. Alarming poor performance in *Chlamydia trachomatis* point-of-care testing. *Sex. Transm. Infect* 2010;86: 355–9.
  164. Nuñez-ForeroL, Moyano-ArizaL, Gaitán-DuarteH, Ángel-MüllerE, Ruiz-ParraA, GonzálezP, RodríguezA, TolosaJE. Diagnostic accuracy of rapid tests for sexually transmitted infections in symptomatic women. *Sex Transm Infect.* 2016;92:24-8.
  165. Schachter J. DFA, EIA, PCR, LCR and other technologies: what tests should be used for diagnosis of chlamydia infections? *Immunol Invest.* 1997; 26:157-61.
  166. Gann PH, Herrmann JE, Candib L, Hudson RW. Accuracy of *Chlamydia trachomatis* antigen detection methods in a low-prevalence population in a primary care setting. *J Clin Microbiol.* 1990; 28:1580-5.
  167. Cluver C, Novicova N, Ericsson DO, Bengtsson K, Lingman GK. Interventions for treating genital *Chlamydia trachomatis* infection in pregnancy. *Cochrane Database Syst Rev.* 2017; 22; 9:CD010485. doi: 10.1002/14651858.CD010485
  168. Su WH, Tsou TS, Chen CS, Ho TY, Lee WL, Yu YY, Chen TJ, Tan CH, Wang PH. Diagnosis of *Chlamydia* infection in women. *Taiwan J Obstet Gynecol.* 2011;50:261-7.
  169. Hsieh YH, Hogan MT, Barnes M, Jett-Goheen M, Huppert J, Rompalo AM, Gaydos CA. Perceptions of an ideal point-of-care test for sexually transmitted infections – a qualitative study of focus group discussions with medical providers. . *PLoS One.* 2010; 30;5:e14144.
  170. Hesse EA, Patton SA, Huppert JS, Gaydos CA. Using a rapid communication approach to improve a POC *Chlamydia* test. *IEEE Trans Biomed Eng.* 2011;58:837-40.
  171. Hase AM, Bagshaw S, George PM. Improved detection of *Chlamydia trachomatis* in endocervical samples by using a new polymerase chain reaction assay. *N Z Med J.* 1995;28:108:292-4.
  172. Nateghi Rostami M, Hossein Rashidi B, Aghsaghloo F, Nazari R. Comparison of clinical performance of antigen based-enzyme immunoassay (EIA) and major outer membrane protein (MOMP)-PCR for detection of genital *Chlamydia trachomatis* infection. *Int J Reprod Biomed.* 2016;14:411-20.
  173. Emma J Watson, Allan Templeton, Ian Russell, Pavonen J, Mardh PA, Stary A, Pederson BSet al. The accuracy and efficacy of screening tests for *Chlamydia trachomatis*: a systematic review. *J. Med. Microbiol.* 2002;51:1021–31.

174. Gift TL, Pate MS, Hook EW 3<sup>rd</sup>, Kassler WJ. The rapid test paradox: When fewer cases detected lead to more cases treated. *Sex Transm Dis.* 2013;26: 232-40.
175. Huang W, Gaydos CA, Barnes MR, Jett-Goheenm, Blake DR. Comparative effectiveness of a rapid point-of-care test for detection of *Chlamydia trachomatis* among women in a clinical setting. *Sex Transm Infect.* 2013;89:108-14.
176. MA Chernesky. The laboratory diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections. *Can J Infect Dis Med Microbio.* 2005;16:39-44.
177. Estany A, Todd M, Vasquez M, McLaren R. Early detection of genital chlamydial infection in women: an economic evaluation. *Sex Transm Dis.* 1989;16:21-7.
178. Ozüberk OÖ, Gökahmetoğlu S, Özçelik B, Ekimkcioğlu O. Investigation of *Chlamydia trachomatis* with Cell Culture, DFA and PCR Methods in the Genital Swab Samples of Symptomatic Patients. *Mikrobiyol Bul.* 2013;47:79-86.
179. Kaveh Manavi. A review on infection with *Chlamydia trachomatis*. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology* 2006;20:941-51.
180. Churakov AA Kulichenko AN, Kazskova ES, Serebrianik NE, Suvorov AP, Kuttyrev VV, Gybochko PV. Laboratory diagnostics of urogenital clamidiosis. *Klin Lab Diagn.* 2005;2:43-7.
181. Mukherjee A(1), Sood S, Bala M, Satpathy G, Mahajan N, Kapil A, Sharma VK. The role of a commercial enzyme immuno assay antigen detection system for diagnosis of *C. trachomatis* in genital swab samples. *Indian J Med Microbiol.* 2011;29:411-3.
182. Skulska E, Młynarczyk-Bonikowska B, Walter de Walthoffen S, Młynarczyk G, Malejczyk M, Majewski S. The Comparison of Real-Time PCR and direct immunofluorescence in laboratory diagnostics of chlamydiosis in patients of Department of Dermatology and Venereology Medical University of Warsaw. *Med Dosw Mikrobiol.* 2015;67:173-80.
183. Arya R, Mannion PT, Woodcock K, Haddad NG. Incidence of genital *Chlamydia trachomatis* infection in the male partners attending an infertility clinic. *J Obstet Gynaecol.* 2005;25:364-7.
184. den Hartog JE, Lardenoije CM, Severens JL, Land JA, Evers JL, Kessels AG. Screening strategies for tubal factor subfertility. *Hum Reprod* 2008;23:1840-8.
185. Machado AC, Guimarães EM, Sakurai E, Fioravante FC, Amaral WN, Alves MF. High titers of *Chlamydia trachomatis* antibodies in Brazilian women with tubal occlusion or previous ectopic pregnancy. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 2007;24816.
186. Baud D, Regan L, Greub G. Emerging role of *Chlamydia* and *Chlamydia*-like organisms in adverse pregnancy outcomes. *Curr Opin Infect Dis.* 2008;21:70-6.

187. Ness RB, Soper DE, Richter HE, Randall HE, Peipert JF, Nelson DB, Schubeck D, McNeeley SG, Trout W, Bass DC, Huthison K, Kip K, Brunham RC. Chlamydia antibodies, chlamydia heat shock protein, and adverse sequelae after pelvic inflammatory disease: the PID Evaluation and Clinical Health (PEACH) Study. *Sex Transm Dis.* 2008;35:129–35.
188. McComb DE, Nichols RL, Semine DZ, Evrard JR, Alpert S, Crockett VA, Rosner B, Zinner SH, McCormack WM: Chlamydia trachomatis in women: antibody in cervical secretions as a possible indicator of genital infection. *J Infect Dis* 1979;139:628–33.
189. Muvunyi CM, Dhont N, Verhelest R, Temmerman M, Claeys G, Pedalko E. *Chlamydia trachomatis* infection in fertile and subfertile women in Rwanda: prevalence and diagnostic significance of IgG and IgA antibodies testing. *Hum Reprod.* 2011;26:3319-26.
190. Rabenau HF, Köhler E, Peters M, Doerr HW, Weber B. Low correlation of serology with detection of *Chlamydia trachomatis* by ligase chain reaction and antigen EIA. *Infection* 2000;28:97-102.
191. Budrys NM, Gong S, Rodgers AK, Wang J, Loudon C, Shain R, Schenken RS, Zhong G. *Chlamydia trachomatis* Antigens Recognized by Women With Tubal Factor Infertility, Normal Fertility, and Acute Infection. *Obstet Gynecol.* 2012;119:1009–16.
192. Mascellino MT, Ciardi MR, Oliva A, Cecinato F, Hassemer MP, Borgese L. *Chlamydia trachomatis* detection in a population of asymptomatic and symptomatic women: correlation with the presence of serological markers for this infection. *New Microbiol.* 2008;31:249-56.
193. Tuuminen T, Palomäki P, Paavonen J. The use of serologic tests for the diagnosis of chlamydial infections. *J Microbiol Method* 2000;42:265-79.
194. Jones CS, Maple PA, Andrews NJ, Paul ID, Caul EO. Measurement of IgG antibodies to *Chlamydia trachomatis* by commercial enzyme immunoassays and immunofluorescence in sera from pregnant women and patients with infertility, pelvic inflammatory disease, ectopic pregnancy, and laboratory diagnosed *Chlamydia psittaci/Chlamydia pneumoniae* infection. *J Clin Pathol* 2003;56:225–9.
195. Paukku M, Närvänen A, Puolakkainen M, Dreesbach K, Tiitinen A, Hao W, Anttila TI, Paavonen J. Detection of *Chlamydia trachomatis* antibodies by 2 novel tests: ELISA and peptide EIA. *Int J STD AIDS.* 1998;9:604-7.
196. Bas S, Muzzin P, Vischer TL. *Chlamydia trachomatis* serology: diagnostic value of outer membrane protein 2 compared with that of other antigens. *J Clin Microbiol.* 2001;39:4082-5.

197. Land JA, Gijsen AP, Kessels AG, Slobbe ME, Bruggeman CA. Performance of five serological chlamydia antibody tests in subfertile women. *Hum Reprod* 2003;18:2621–27.
198. Bax CJ, Mutsaers JA, Jansen CL, Trimbos JB, Dorr PJ, Oostvogel PM. Comparison of serological assays for detection of *Chlamydia trachomatis* antibodies in different groups of obstetrical and gynecological patients. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003;10:174–6.
199. Gazzard CM, Wood RN, Debattista J, Allan JA, Allan JM, Timms P. Use of a commercial assay for detecting the 60 kDa chlamydial heat shock protein in a range of patient groups. *Sex Transm Dis* 2006;33:77–9.
200. Dutta R, Jha R, Salhan S, Mittal A. *Chlamydia trachomatis*-specific heat shock proteins 60 antibodies can serve as prognostic marker in secondary infertile women. *Infection* 2008;36:374–8.
201. Bax CJ, Dörr PJ, Trimbos JB, Spaargaren J, Oostvovogel PM, Pena AS, Morre SA. *Chlamydia trachomatis* heat shock protein 60 (cHSP60) antibodies in women without and with tubal pathology using a new commercially available assay. *Sex Transm Infect.* 2004;80:415–6.
202. Conwaj D, Glazener CM, Caul EO, Hodgson J, Hull MG, Clirke SK, Stirat GM. Chlamydial serology in fertile and infertile women. *Lancet* 1984;1:191-3.
203. Richmond SJ, Caul EO. Fluorescent antibody studies in chlamydial infections. *J Clin Microbiol* 1975;1:345-52.
204. Logan S, Gazvani R, McKenzie H, Templeton A, Bhattacharya S. Can history, ultrasound, or ELISA chlamydial antibodies, alone or in combination, predict tubal factor infertility in subfertile women? *Hum Reprod.* 2003;18:2350-6.
205. Mouton JW, Peeters MF, van Rijssort-Vos JH, Verkooyen RP. Tubal factor pathology caused by *Chlamydia trachomatis*: the role of serology. *Int J STD AIDS.* 2002;13(Suppl 2):26–9.
206. Mazzoli S, Cai T, Rupealta V, Gavazzi A, Castricchi Pagliai R, Mondaini N, Bartoletti R. Interleukin 8 and anti-*Chlamydia trachomatis* mucosal IgA as urogenital immunologic markers in patients with *C. trachomatis* prostatic infection. *Eur Urol.* 2007;51:1385–93.
207. Wolff H(1), Neubert U, Volkenandt M, Zöchling N, Schlüpen EM, Bezold G, Meurer M. Detection of *Chlamydia trachomatis* in semen by antibody-enzyme immunoassay compared with polymerase chain reaction, antigen-enzyme immunoassay, and urethral cell culture. *Fertil Steril.* 1994 Dec; 62(6):1250-4.
208. Verkooyen RP, Peeters MF, van Rijsoort-Vos JH, van der Meijden W, Mouton JW. Sensitivity and specificity of three new commercially available *Chlamydia trachomatis* tests. *Int J STD AIDS* 2002;2:23-5.

209. Komoda T. Kinetic study of antibodies (IgG, IgA) to *Chlamydia trachomatis*: importance of IgA antibody in screening test for *C. trachomatis* infection by peptide-based enzyme immunosorbent assay. *Jpn J Infect Dis.* 2007;60:347-51.
210. Fresse AS, Sueur JM, Hamdad F. Diagnosis and follow-up of genital chlamydial infection by direct methods and by detection of serum IgG, IgA and secretory IgA. *Indian J Med Microbiol.* 2010;28: 326-31.
211. Arustamian KK. Analysis of methods for diagnostics of chlamy[Comparative dial infection in women of reproductive age]. *Georgian Med News.* 2006;139:73-5.
212. Martin DH, Nsuami M, Schachter J, Hook EW 3rd, Ferrero D, Quinn TC, Gaydos C. Use of multiple nucleic acid amplification tests to define the infected-patient"gold standard" in clinical trials of new diagnostic tests for *Chlamydia trachomatis* infections. *Clin Microbiol.* 2004;42:4749-58.
213. Hadgu A, Dendukuri N, Wang L. Evaluation of screening tests for detecting *Chlamydia trachomatis*: bias associated with the patient-infected-status algorithm. *Epidemiology.* 2012;23:72-82.
214. Shrier LA, Dean D, Klein E, Harter K, Rice PA. Limitations of screening tests for the detection of *Chlamydia trachomatis* in asymptomatic adolescent and young adult women. *Am J Obstet Gynecol.* 2004;190:654-62.
215. Alonzo, T. A. and Pepe, M. S. 'Assessing the accuracy of a new diagnostic test when a gold standard does not exist', Technical Report 156, Department of Biostatistics, University of Washington, 1998.
216. Torrance-Rynard, V. and Walter, S. 'Effects of dependent errors in the assessment of diagnostic test performance', *Statistics in Medicine*, 16, 2157{2175 (1997).
217. TODD A. ALONZO AND MARGARET S. PEPE Using combination of reference tests to assess the accuracy of a new diagnostic test. *Statist. Med.* 1999; 18, 2987{3003.
218. David H. Martin, Malanda Nsuami, Julius Schachter, et al. Use of multiple Nucleic Acid Amplification Tests To Define the infeted –Patient “Gold Standard” in Clinical Trials of New Diagnostic Tests For *Chlamydia trachomatis* Infections. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY.* 2004;4749–58.
219. Jingqin Luo and Chengjie Xiong. Youden index and Associated Cut-points for Three Ordinal Diagnostic Groups. *Commun Stat Simul Comput.* 2013;42:1213–34.
220. Griner P. F., Mayewski R. J., Mushlin A. I., Greenland P. Selection and Interpretation of Diagnostic Tests and Procedures. *Annals of Internal Medicine* 1981;94: 555-600.

221. Tuite AR, Jayaraman GC, Allen VG, Fisman DN. Estimation of the burden of disease and costs of genital Chlamydia trachomatis infection in Canada. *Sex Transm Dis.* 2012; 39:260-7.
222. Pultorak E, Wong W, Rabins C, Mehta SD. Economic burden of sexually transmitted infections: incidence and direct medical cost of Chlamydia, gonorrhoea, and syphilis among Illinois adolescents and young adults, 2005-2006. *Sex Transm Dis.* 2009; 36:629-36.
223. Owusu-Edusei K Jr, Hoover KW, Gift TL. Cost-Effectiveness of Opt-Out Chlamydia Testing for High-Risk Young Women in the U.S. *Am J Prev Med.* 2016;51:216-24.
224. Smith KS, Kaldor JM, Hocking JS, Jamil MS, McNulty AM, Read P, Bradshaw CS, Chen MY, Fairley CK, Wand H, Worthington K, Blake S, Knight V, Rawlinson W, Saville M, Tabrizi SN, Garland SM, Donovan B, Guy R. The acceptability and cost of a home-based chlamydia retesting strategy: findings from the REACT randomised controlled trial. *BMC Public Health.* 2016;28;16:83.
225. Looker KJ, Wallace LA, Turner KM. Impact and cost-effectiveness of chlamydia testing in Scotland: a mathematical modelling study. *Theor Biol Med Model.* 2015;15;12-2.
226. Ong KJ, Soldan K, Jit M, Dunbar JK, Woodhall SC. Chlamydia sequelae cost estimates used in current economic evaluations: does one-size-fit-all? *Sex Transm Infect.* 2017; 93:18-24.
227. Jackson B. Relative cost-effectiveness of different tests for Chlamydia trachomatis. *Ann Intern Med.* 2005;15:142:308.
228. Turner KM, Round J, Horner P, Macleod J, Goldenberg S, Deol A, Adams EJ. An early evaluation of clinical and economic costs and benefits of implementing point of care NAAT tests for Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoea in genitourinary medicine clinics in England. *Sex Transm Infect.* 2014;90:104-11.
229. Lakić D, Tadić I, Odalović M, Kolundžić S. Upotreba antibakterijskih lekova u lečenju infekcija urinarnog trakta – farmakoekonomski aspekt. *Arh farm.* 2015;65:47-57.



## 8. БИОГРАФИЈА

Јелена Тошић Пајић мастер биологије рођена 20.10.1981. године у Крагујевцу. Средњу школу завршила је у Крагујевцу. Дипломирала је на Природно – математичком факултету Универзитета у Крагујевцу на студијској групи „Биологија“ и стекла звање дипломирани биолог- еколог са академским називом мастер, другог степена студија.

Докторске академске студије на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу уписала је школске 2011/2012 године, изборно подручје Хумана репродукција и развој и положила све програмом студија предвиђене испите, укључујући и усмени докторски испит у мају 2014 године.

Јелена Тошић Пајић је аутор и ко-аутор више оригиналних научних радова у часописима од међународног и националног значаја са рецензијом.

## 9. БИБЛИОГРАФИЈА

### A1. Радови објављени у часописима од међународног значаја:

1. **Jelena Tošić-Pajić**, Predrag Sazdanović, Marija Šorak, Jelena Čukić, Aleksandra Arsović, Dragan Milovanović, Dejan Baskić. Chlamydia trachomatis screening in resource-limited countries – Comparison of diagnostic accuracy of 3 different assays. J Infect Dev Ctries. 2018; 12(9):733-740. **M23**
2. **Jelena Tošić-Pajić**, Dejan Baskić, Dragan R. Milovanović, Violeta Ninković, Jelena Čukić, Predrag Sazdanović, Marija Šorak. Dijagnoza hlamidijalne infekcije. Med J (krag) 2018; 52(3): 105-112.
3. **Tošić-Pajić J**, Šeklić D, Radenković J, Marković S, Čukić J, Baskić D, Popović S, Todorovic M, Sazdanović P. Augmented oxidative stress in infertile women with persistent chlamydial infection. Reprod Biol 2017;17:120-125. **M23**
4. Milena Mišić, Aleksandra Arsović, Jelena Čukić, Milenko I. Rosić, **Jelena Tošić-Pajić**, Nevena Manojlović, Ivan Čekerevac, Dejan Vidanović, Milanko Šekler, Dejan Baskić. The prevalence of resistance to macrolides and lincosamides among community and hospital acquired Staphylococci and Streptococci isolates in southeast Serbia. Srp Arh Celok Lek 2017. DOI: <https://doi.org/10.2298/SARH170407197M> **M23**

### A2. Радови објављени у часописима од националног значаја:

1. Слободан Суботић, Весна Шуљагић, Христо Анђелски, Јасмина Суботић, Наташа Стојковић, **Јелена Тошић Пајић**. Етиолошки и предиспозирајући фактори ризика карцинома простате. Zdravstvena zaštita, vol. 44, br. 1, str. 11-18, 2015. M53, 1 бод

### A3. Зборници међународних скупова:

1. **Jelena Tošić-Pajić**, Dejan Baskić, Violeta Ninković, Mira Zečević, Jelena Čukić. Uperedna analiza četiri testa za detekciju akutne hlamidijalne infekcije. XI Kongres mikrobiologa Srbije sa regionalnim učešćem –MICROMED, 11-13 maja 2017., Beograd.

2. **Jelena Tošić-Pajić**, Predrag Sazdanović, Dragan R. Milovanović, Aleksandra Arsović, Violeta Ninković, Jelena Čukić, Mira Zečević, Dejan Baskić. Najčešće korišćeni testovi za dijagnozu hlamidijalne infekcije u državnim i privatnim laboratorijama u Srbiji. 51. Дани превентивне медицине – међународни Конгрес, 26-29. септембра 2017., Ниш.

# ПРИЛОГ

## КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАТИКА

### УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА У КРАГУЈЕВЦУ

Редни број – РБ:

Идентификациони број – ИБР:

Тип документације – ТД:

Монографска публикација

Тип записа – ТЗ:

Текстуални штампани материјал

Врста рада – ВР:

Докторска дисертација

Аутор – АУ:

Јелена Тошић Пајић

Ментор /ко-ментор – МН:

Др сци. мед. Марија Шорак, доцент

Наслов рада – НР:

„Дијагностичке перформансе и економски аспекти тестова за детекцију *Chlamydia-e trachomatis*“

Језик публикације – ЈП:

Српски (ћирилица)

Језик извода – ЈИ:

Српски/енглески

Земља публиковања – ЗП:

Србија

Уже географско подручје – УГП:

Србија

Година издавања – ГО:

2019.

Издавач – ИЗ:

Ауторски репринт

Место и адреса – МС:

34000 Крагујевац, Србија, Светозара Марковића 69

Физички опис рада – ФО:

Дисертација има 122 стране, садржи 7 поглавља, 9 слика, 23 табеле, 11 графикана, 1 шему, 229 референци

Научна област – НО:

Медицина

**Научна дисциплина – ДИ:**

Микробиологија

**Предметна одредница/кључне речи – ПО:**

*C. trachomatis*, дијагностички тестови, дијагностичка ефикасност, економски аспекти

**УДК:**

**Чува се – ЧУ:**

У библиотеци Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, 34000 Крагујевац, Србија, Светозара Марковића 69

**Важна напомена – ВН:**

**Извод – Ид:**

*C. trachomatis* је најчешћа сексуално преносива бактеријска инфекција у свету. Процењује се да хламидија сексуалним путем инфицира преко 100 милиона људи сваке године широм света. Акутне инфекције доњег гениталног тракта изазване *C. trachomatis* (уретритис код мушкараца, цервититис и уретритис код жена) су углавном асимптоматске те стога инфекције најчешће пролазе недијагностиковане и нелечене, а као последица тога код 20%-40% случајева инфекција се шири у горњи генитални тракт. У горњем гениталном тракту, и поред активације имунолошких механизма одбране, хламидије успевају да опстану захваљујући својој изузетној способности избегавања имунског одговора домаћина, што може довести до озбиљних оштећења и компликација везаних за репродуктивно здравље жена.

Асимптоматска природа инфекције као и специфичан развојни циклус хламидија представљају прави изазов за постављање дијагнозе акутне хламидијалне инфекције. За успешну дијагнозу хламидијалних инфекција неопходно је направити добар одабир теста који обезбеђује високу сензитивност и специфичност, али и брзину извођења теста, што су по препорукама европског и америчког центра за контролу болести свакако тестови амплификације нуклеинских киселина. Данас је доступан већи број комерцијалних PCR и RT-PCR тестова које карактерише висока сензитивност и специфичност. Међутим, висока цена економских трошкова ових тестова, уз техничку комплексност везану за простор, кадар и опрему, условили су да је за већину дијагностичких лабораторија у земљама са нижим приходима овај стандард недостижан. Тако је у избору оптималног дијагностичког приступа неопходно одабрати тест који има задовољавајуће, не само дијагностичке, већ и економске перформансе. Основни циљ овог истраживања је утврђивање дијагностичке ефикасности четири појединачна теста (DIF, BT, IgA и IgG), као и комбинације поменутих тестова, у односу на RT-PCR методу која представља златни стандард за постављање дијагнозе акутне хламидијалне инфекције. Поред испитивања дијагностичке ефикасности студија пружа увид и у економску анализу поменутих тестова у односу на RT-PCR методу.

Резултати наше студије указују на слабо слагање резултата добијених помоћу златног стандарда (RT-PCR) са резултатима добијеним употребом скрининг тестова (DIF, BT, IgA и IgG). Од свих анализираних тестова најбоље слагање у односу на златни стандард показује брзи тест латералне хроматографије (BT). Комбинацијом тестова покритеријуму „позитивна два или више теста“ и „позитиван било који тест“ нисмо поправили слагањерезултата у односу на појединачне скрининг тестове.

Анализирајући дијагностичку ефикасност појединачних скрининг тестова утврдили смо да BT повећини анализираних параметара показује најбољу

дијагностичку ефикасност, доктест директне имунофлуоресценције и серумски ниво IgA и IgG антитела, у односу на ВТ, показују боље уравнотежен однос сензитивности и специфичности. Комбинацијом тестова по критеријуму „позитивна два или више теста“ и „позитиван било који тест“ нисмо успели да поправимо дијагностичку ефикасност односу на појединачне скрининг тестове, односно ВТ који је појединачно имао најбоље параметре дијагностичке ефикасности. Сходно томе, ове комбинације тестова се не могу препоручити за дијагнозу акутне хламидијалне инфекције. Ипак, комбинација DIF/IgA (позитиван било који тест) која показује добро избалансирани однос сензитивности и специфичности уз супериорну сензитивност од 100% те се и поред ниске позитивне предиктивне вредности може користити у ситуацијама које захтевају високу сензитивност. Интересантан податак је да смо ROC анализом серумског нивоа IgA и IgG антитела на хламидијални МOMP антиген и одређивањем нових *cut-off* вредности (на основу карактеристика ROC криве) поправили дијагностичку ефикасност ових тестова у односу на резултате добијене на основу *cut-off* вредности препоручених од стране произвођача теста. Исто можемо да кажемо и за обе групе комбинација IgA+IgG теста (позитивна оба теста) и комбинације IgA/IgG (позитиван било који тест).

Економска анализа указује да су, за дати сценарио, најмањи укупни трошкови по пацијенту код коришћења брзог теста, те је стога примена овог теста доминантна економска стратегија, а прве алтернативе су серолошке методе. Примена комбинације тестова није исплатива економска стратегија јер су укупни трошкови по пацијенту већи од трошкова примене појединачних тестова. Имајући у виду претходну анализу дијагностичке ефикасности комбинованих тестова, таквом праксом се једино увећавају трошкови анализе, без битно унапређених дијагностичких перформанси. Иако су дијагностичке перформансе свих тестова, како појединачних, тако и комбинованих, у односу на PCR методу знатно слабије, њена висока почетна цена, у условима трошкова националног здравственог система, не може да се компензује бољим дијагностичким резултатима у укупном економском профилу датог сценарија.

**Датум прихватања теме**

**од стране ННВ – ДП:** 30.05.2018.

**Датум одбране – ДО:**

**Чланови комисије – КО:**

- Председник : Проф. др Марина Костић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Фармакологија и токсикологија
- Члан: Проф. др. Бранислава Коцић, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Нишу, за ужу научну област Микорбиологија и имунологија
- Члан: Проф. др Горан Бабић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Гинекологија и акушерство

## KEY WORDS DOCUMENTATION

### UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC FACULTY OF MEDICAL SCIENCES KRAGUJEVAC

**Accession number - ANO:**

**Identification number - INO:**

**Documentation type - DT:** Monographic publication

**Type of record - TR:** Textual printed material

**Contents code - CC:** PhD thesis

**Author - AU:** Jelena Tošić Pajić

**Menthor/co-mentor - MN:** Drsci.med. Marija Šorak, docent

**Title - TI:** „Diagnostic performance and economic aspects of tests for the detection of *Chlamydia-e trachomatis*“

**Language of text - LT:** Serbian (Cyrilic)

**Language of abstract:** Serbian/English

**Country of publication - CP:** Serbia

**Locality of publication - LP:** Serbia

**Publication year - PY:** 2019.

**Publisher - PU:** Author reprint

**Publication place - PP:** 34000 Kragujevac, Serbia, Svetozara Markovica str. 69

**Physical description - PD:** These contains 122 pages, 7 chapters, 9 images, 23 tables, 11 graphs, 1 scheme and 229 citations

**Scientific field - SF:** Medicine

**Scientific discipline - SD:** Microbiology

**Subject/key words - SKW:** *C. trachomatis*, diagnostic tests, diagnostic efficiency, economic aspects

**UDC:**

**Holding data:**

Library of Medical faculty of Kragujevac, 34000  
Kragujevac, Serbia Svetozara Markovica 69

**Note - N:****Abstract:**

*C. trachomatis* is the most common sexually transmitted bacterial infection in the world. It is estimated that chlamydia sexually infects more than 100 million people every year worldwide. Acute infections of the lower genital tract caused by *C. trachomatis* (urethritis in men, cervicitis and urethritis in women) are mostly asymptomatic, and therefore infections commonly passed undiagnosed and untreated. As a consequence, in 20% -40% of cases, the infection spreads to the upper genital tract. Despite the activation of immune defense mechanisms in the upper genital tract, chlamydia is able to survive owing to its remarkable ability to avoid the host immune response, which can lead to serious damage and complications related to the reproductive health of women.

The asymptomatic nature of the infection as well as the specific developmental cycle of chlamydia is a real challenge for establishing the diagnosis of an acute chlamydial infection. For a successful diagnosis of chlamydial infections it is necessary to make a good selection of the test which provides high sensitivity and specificity, as well as the speed of the test, which, according to the recommendations of the European and American Center for Disease Control, are certainly nucleic acid amplification tests. A number of commercial PCR and RT-PCR tests are available today, characterized by high sensitivity and specificity. However, the high price of the economic costs of these tests, with the technical complexity of space, personnel and equipment, has made it uncertain for the most diagnostic laboratories in low-income countries. In the selection of an optimal diagnostic approach, it is necessary to select a test that has satisfactory, not only diagnostic, but also the economic performances. The main objective of this study is to determine the diagnostic efficacy of four individual tests (DIF, BT, IgA and IgG), as well as combinations of these tests in relation to the RT-PCR method, which represents the golden standard for diagnosing an acute chlamydial infection. In addition to testing the diagnostic efficiency, the study provides an insight into the economic analysis of the tests mentioned above in relation to the RT-PCR method.

The results of our study indicate poor agreement between the results obtained by using the screening tests (DIF, BT, IgA and IgG) in relation to the golden standard (RT-PCR). Of the all analyzed tests, the best matching in relation to the golden standard shows a rapid test of the lateral chromatography (RT). We did not correct the matching of the results in relation to the individual screening tests by combining the tests with the criteria "positive two or more tests" and "positive any test".

Analyzing the diagnostic efficiency of individual screening tests, we have established that RT shows the best diagnostic efficacy in most of the analyzed parameters, while the direct immunofluorescence test and serum IgA and IgG antibody levels in comparison to RT show a more balanced relation of sensitivity and specificity. By combining the tests using the criteria "positive two or more



tests" and "positive any test", we were unable to improve the diagnostic efficiency in relation to individual screening tests that is RT, which individually had the best parameters of diagnostic efficiency. Consequently, these test combinations cannot be recommended for the diagnosis of an acute chlamydial infection. However, the combination of DIF/IgA (positive any test) that shows a well balanced sensitivity and specificity ratio with superior sensitivity of 100%, and despite a low positive predictive value, can be used in situations requiring high sensitivity. An interesting fact is that the ROC analysis of the serum IgA and IgG antibody levels to the chlamydial MOMR antigen and the determination of new cut-offs (based on the characteristics of the ROC curve) corrected the diagnostic efficacy of these tests in relation to the results obtained from the cut-off values recommended by the test manufacturers. The same can be said for both groups of combination IgA + IgG test (positive both tests) and IgA / IgG combinations (positive any test).

Economic analysis indicates that for the given scenario, the lowest total cost per patient is in the use of a rapid test, and therefore the application of this test is the dominant economic strategy, and the first alternatives are serological methods. Using a combination of tests is not a cost-effective economic strategy because the total cost per patient is greater than the cost of using individual tests. Taking into account the previous analysis of the diagnostic efficiency of combined tests, such practice only increases the cost of analysis, without significantly improved diagnostic performance. Although the diagnostic performances of all the tests, both individual and combined are considerably lower compared to the PCR method, its high starting price, in the terms of costs of the national healthcare system, cannot be compensated for better diagnostic results in the overall economic profile of the given scenario.

**Accepted by the Scientific Board on – ASB:** May 30<sup>th</sup> 2018

**Defended on - DE:**

**Thesis defended board**

**(Degree/name/surname/title/faculty) - DB:**

- |             |  |
|-------------|--|
| President : | Prof. dr Marina Kostic, associate professor of Farmacology and Toxicology, Faculty of Medicine, University of Kragujevac |
| Member:     | Prof. dr Branislava Kocic, Professor of Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, University of Nis              |
| Member:     | Prof. dr Goran Babic associate professor of Gynecology and Obstetrics, Faculty of Medicine, University of Kragujevac     |

## ОБРАЗАЦ 1

### ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Јелена Тошић Пајић, изјављујем да Докторска дисертација под насловом „Дијагностичке перформансе и економски аспекти тестова за детекцију *Chlamydia-e trachomatis*“ која је одбрањена на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу представља **оригинално ауторско дело** настало као резултат **сопственог истраживачког рада**.

**Овом изјавом такође потврђујем:**

- да сам **једини аутор** наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији нисам **извршила** повреду ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,
- да умножени примерак докторске дисертације у штампаној и електронској форми у чијем се прилогу налази ова Изјава садржи докторску дисертацију истоветну одбрањеној докторској дисертацији.

У Крагујевцу,

\_\_\_\_\_, 2019. године.

Потпис аутора

\_\_\_\_\_

## ОБРАЗАЦ 2

### ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Јелена Тошић Пајић:

Дозвољавам

Не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом „Дијагностичке перформансе и економски аспекти тестова за детекцију *Chlamydia-e trachomatis*“ која је одбрањена на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем **преузимања**.

Овом изјавом такође

Дозвољавам

Не дозвољавам<sup>1</sup>

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

---

<sup>1</sup>Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада<sup>2</sup>

У Крагујевцу

\_\_\_\_\_, 2019. године

Потпис аутора

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

<sup>2</sup>Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од Creative Commons лиценци да заокруже једну од понуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: <http://creativecommons.org.rs/>

**РАДОВИ КОЈИ СУ БИЛИ УСЛОВ ЗА ПРИЈАВУ ЗАВРШЕНЕ  
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Original Article

## ***Chlamydia trachomatis* screening in resource-limited countries – Comparison of diagnostic accuracy of 3 different assays**

Jelena Tošić-Pajić<sup>1</sup>, Predrag Sazdanović<sup>2</sup>, Marija Šorak<sup>2</sup>, Jelena Čukić<sup>3</sup>, Aleksandra Arsović<sup>4</sup>, Dragan Milovanović<sup>5</sup>, Dejan Baskić<sup>3,6</sup>

<sup>1</sup> Doctoral Academic Study, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Serbia

<sup>2</sup> Clinical Center Kragujevac, Clinic for Gynecology and Obstetrics, Kragujevac, Serbia

<sup>3</sup> Public Health Institute Kragujevac, Kragujevac, Serbia

<sup>4</sup> Institute of Medical Microbiology and Immunology, Faculty of Medical Sciences, University of Pristina, Kosovska Mitrovica, Serbia

<sup>5</sup> Department of Pharmacology and toxicology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Serbia

<sup>6</sup> Center for Molecular Medicine and Stem Cell Research, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

### **Abstract**

**Introduction:** Commercially available assays were evaluated in order to determine diagnostic accuracy of *Chlamydia trachomatis* specific tests for screening.

**Methods:** The study included 225 sexually active men and women, who were tested for genital chlamydial infection in Institute of Public Health Kragujevac. Three screening tests were used: direct immunofluorescence (DIF) and rapid lateral immunochromatographic test (RT) for qualitative detection of chlamydial antigens and immunoenzyme (ELISA) test for detection of serum levels of anti-chlamydial IgA and IgG antibodies. Diagnostic efficiency of these tests were determined in relation to results obtained by RT-PCR method.

**Results:** Statistical significance between the results obtained by RT-PCR as a gold standard and DIF, RT and ELISA were analyzed using chi-square ( $\chi^2$ ) test. Statistical analysis showed a significant difference between RT-PCR and analyzed screening tests: DIF ( $\chi^2 = 303$ ;  $p < 0.001$ ), RT ( $\chi^2 = 4.19$ ;  $p = 0.041$ ), serum IgA ( $\chi^2 = 4.19$ ;  $p = 0.041$ ) and serum IgG ( $\chi^2 = 67$ ;  $p < 0.001$ ) which indicates poor agreement between these tests. Large numbers of false positive (FP) and false negative (FN) results were observed for all tested assays. According to Youden's index, serum IgG and DIF testing demonstrated the most-balanced sensitivity-specificity rate. RT assay exhibits the highest expanded Youden's index, as well as the best overall diagnostic accuracy.

**Conclusions:** None of evaluated screening tests can be recommended as individual method for the diagnosis of acute infection. We suppose that RT-PCR is unlikely to be a cost-effective screening strategy within the Serbian health system.

**Key words:** *Chlamydia trachomatis*; acute infection; diagnostic methods.

*J Infect Dev Ctries* 2018; 12(9):733-740. doi:10.3855/jidc.10442

(Received 10 April 2018 – Accepted 21 July 2018)

Copyright © 2018 Tošić-Pajić *et al.* This is an open-access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

### **Introduction**

*Chlamydia trachomatis* infection is one of the most common sexually transmitted bacterial infections in the world [1,2]. In 2016, a total of 1,598,354 cases were reported to the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) [3]. Rates of chlamydial infections raised in all the parts of the United States in the period 2015-2016 [3]. The global rate of reported chlamydial infections in Europe is high, but shows stability. In the period from 2010 to 2014, the number of cases from 26 countries that were reported to the European Centre for Disease Prevention and Control increased from 358,489 to 396,128; however, there is a large variation between the countries and their reported rates [4].

Most of the chlamydial infections are asymptomatic and therefore undiagnosed and consequently untreated [5,6]. If *C. trachomatis* infection remains untreated, it can lead to serious consequences in reproductive tract in women including pelvic inflammatory disease (PID), tubal factor infertility as well as ectopic pregnancy [7,8]. Because of high prevalence and severe complications, CDC recommends annual screening of *C. trachomatis* in all sexually active adolescents and young women under 25 years old, for all pregnant women and all women with increased risk of infection due to risky sexual behaviour. CDC also recommends rescreening for all previously infected women three months after being treated for chlamydial infection [9].

The asymptomatic nature of infection, as well as the specific developmental cycle of *C. trachomatis* is the real challenge for establishing the diagnosis of acute chlamydial infection. Significant progress has been made in the field of diagnosing chlamydial infection in the last thirty years. Multiple laboratory testing options can be used to detect *C. trachomatis*, although some of them cannot be recommended for routine use [9,10].

*C. trachomatis* is an obligate intracellular bacterium and isolation in cell culture is the only test which can prove the presence of viable chlamydia in a patient's sample. This bacterial culture method, although rarely used nowadays, is still needed in some circumstances to prove a patient has *C. trachomatis* infection [11]. Isolation of *C. trachomatis* in cell culture shows high specificity, but at the same time there are several disadvantages, such as technical complexity and relatively high costs with relatively low sensitivity [12].

On the other hand, a number of commercial tests that are not based on cell culture are available today. Polyclonal antibodies for the detection of chlamydial lipopolysaccharide (LPS) or monoclonal antibodies for the detection of major proteins of the external membrane (MOMP) are used in chlamydial antigen detection assays. With a high specificity of 97-100%, the sensitivity of commercially available enzyme immunoassays (EIA) and direct immunofluorescence assays (DIF) ranges from 60-75% in relation to nucleic acid amplification tests (NAATs) [13]. Despite the high specificity, the unsatisfactory sensitivity and subjectivity of these tests means they are not recommended for routine testing of genital tract samples. Rapid lateral immunochromatographic test (RT) have similar diagnostic performances so their application in ambulance screening is being considered [11]. Despite the lower sensitivity (50–85%), RT as an easy-to-use, low-cost method which may provide an easy and reliable alternative in the detection of chlamydial infections, particularly in a developing countries [14,15]. Serological tests for the detection of antibodies specific to chlamydial MOMP are not recommended for the detection of chlamydial infections, except for neonatal infections and patients with tubal factor infertility [11,13].

Over the past decades, tests based on nucleic acid amplification have become available. NAATs are highly sensitive with a specificity comparable to cell culture. With the additional advantages of time saving and ease of sampling, NAATs can be implemented on a variety of clinical specimens particularly on non-invasive specimens such as urine and vulval swabs [16]. Therefore NAATs are considered as the method of

choice for detecting of chlamydial infections in the developed countries [17].

The American and European Center for Disease Control and Prevention recommends NAATs as the only tests for the detection of genital tract infections caused by *C. trachomatis* in both men and women, with or without symptoms, because of their superior sensitivity, specificity and speed [9,10]. According to the same sources, isolation of *C. trachomatis* in cell culture and direct immunofluorescence can be used to diagnose acute genital chlamydial infection only in case where nucleic acid amplification techniques are unavailable for any reason.

However, the high costs of these tests along with the technical complexity related to the space, equipment and human resources means that most diagnostic laboratories in developing, low-income countries are unable to meet this standard. For these reasons, the majority of laboratories in Serbia are unable to use NAATs, and the diagnosis of acute chlamydial infection of the genital tract in more than 90% laboratories is based on direct immunofluorescence, serological or rapid tests.

The main objective of this study was to determine the diagnostic accuracy of direct immunofluorescence test, rapid lateral immunochromatographic test, and two serological tests for the detection of *C. trachomatis*.

## Methodology

### *Study population*

Prospective study was conducted from January 2015 to December 2016 in Kragujevac, Serbia. The study population included 225 sexually active individuals, both males and females, who were successively tested for genital chlamydial infection in Institute of Public Health Kragujevac. The study excluded all persons: (I) under the age of 18 years, (II) who had any illness, condition or other factor that could significantly affect the result of the assessment (pregnancy, menstruation, recent use of antibiotics or topical preparations during the previous 72 hours, co-infection with other pathogens, etc.), (III) who were already taking part in another clinical trial or refused to participate in the study and (IV) who had any other circumstances that significantly inhibited their participation in the study. The study was approved by the Ethical Committee of the Institute of Public Health Kragujevac. In accordance with the Declaration of Helsinki, all the investigated patients signed the Ethical Committee approved informed consent and were in every respect informed about their examination.

**Sampling and data collection**

The samples were prepared under standard laboratory protocols. Two swabs were collected from all participants (cervical in women and urethral in men). The first swab was used for bacteriological and mycological examination, direct immunofluorescence (DIF) and rapid immunochromatographic (RT) tests for qualitative determination of anti-chlamydial antigens. The second swab was frozen at -20 °C for subsequent determination of specific sequences of chlamydia genome by RT-PCR test. A peripheral blood sample (3 mL) was also taken from all subjects, collected in polystyrene tubes, centrifuged at 400g and then serum samples were aliquoted and stored at -20 °C until further analysis. The serum samples were used to quantitate the serum levels of IgA and IgG antibodies to MOMP antigen of *C. trachomatis*.

**Screening methods**

**Direct immunofluorescence test (DIF) for qualitative detection of chlamydial antigen**

The Chlamydia Cel IF test is a commercially available rapid direct immunofluorescence test for the qualitative detection of chlamydial antigen in patients' samples (Cellabs Pty Ltd, Brookvale, Australia). The samples were tested according to the manufacturer's instructions.

**Rapid immunochromatographic test (RT) for qualitative detection of Chlamydia antigen**

Chlamydia test card is a commercially available rapid chromatographic immunoassay for the qualitative detection of chlamydial antigen in patients' samples (ulti med Products GmbH, Ahrensburg, Germany). The samples were tested according to the manufacturer's instructions.

**Determination of the serum level of the antibodies to the chlamydial MOMP antigen**

The serum samples were used to quantitate the serum levels of IgA and IgG antibodies specific for MOMP antigens of *Chlamydia trachomatis*. Tested

antibodies were determined by commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit according to the manufacturer's instructions (Euroimmun, Lubeck, Germany). Cut-off values were suggested by the manufacturer: RU/mL ≥ 22 for IgG and S/Co ≥ 1.1 for IgA.

**Diagnostic method**

**Real-time polymerase chain reaction (RT-PCR)**

*C. trachomatis* Real-TM PCR kit is a commercially available nucleic acid amplification test for qualitative detection of *C. trachomatis* DNA in the clinical materials by means of real-time hybridization-fluorescence detection. The test was performed on a Sa Cyclyer-96 thermocycler according to the manufacturer's instructions (Sacace Biotechnologies, Como, Italy).

**Diagnostic criteria**

All patients were tested by all screening and diagnostic methods. In this study, the primary (independent) variable is the result obtained by RT-PCR test, whereas secondary (dependent) variables are the results obtained by DIF, RT and ELISA. Results obtained by screening tests were read by a researcher who was blinded to the results obtained from RT-PCR tests. The diagnostic accuracy of the screening tests was compared with the results obtained by the RT-PCR method representing the recommended diagnostic method (gold standard regarded as the best test under reasonable conditions) for the detection of acute chlamydial infection.

**Statistical analysis**

Variables were presented as frequencies of individual parameters (categories), and statistical significance of differences was evaluated by chi-squared test and Fisher exact test using free on-line calculator (<http://www.physics.csbsju.edu/stats/>). For diagnostic test evaluation MEDCALC statistical software was used. Statistical difference of p < 0.05 was considered significant.

**Table 1.** Percentage of positive and negative results in men and women by four chlamydial screening tests.

	Female (n = 146)		Male (n = 55)		Total (n = 201)		Fisher Test
	positive	negative	positive	negative	positive	negative	
DIF	45 (30.8%)	101 (69.2%)	15 (27.3%)	40 (72.7%)	60 (29.9%)	141 (70.1%)	0.379
RT	2 (1.4%)	144 (98.6%)	1 (1.8%)	54 (98.2%)	3 (1.5%)	198 (98.5%)	0.619
IgA	12 (8.2%)	134 (91.8%)	3 (5.5%)	52 (94.5%)	15 (7.5%)	186 (92.5%)	0.372
IgG	25 (17.1%)	121 (82.9%)	8 (14.5%)	47 (85.5%)	33 (16.4%)	168 (83.6%)	0.419
RT-PCR	6 (4.1%)	140 (95.9%)	3 (5.5%)	52 (94.5%)	9 (4.5%)	192 (95.5%)	0.467

n – number of patients; DIF - direct immunofluorescence; RT- rapid lateral immunochromatographic test; IgA and IgG – antibodies; PCR – polymerase chain reaction.



## Results

Of the 225 subjects who were included in the study 55 were men aged 20-54 years (mean age 38.9 years) and 146 were women aged 20-62 years (mean age 35.4 years) had complete results for all screening and diagnostic tests. The statistical analysis of the results show that there is no statistically significant difference between testing results in men and women. All further analysis was performed in this cohort of 201 subjects since they had all diagnostic tests completed (while the other 24 subjects had not) (Table 1).

Using direct immunofluorescence test (DIF) we found 29.9% of patients tested positive for *C. trachomatis*, while 70.1% of the results were negative. By means of rapid immunochromatographic test (RT), 1.5% of patients were positive, while 98.5% were negative. The presence of serum IgA was found in 7.5% of cases, whereas 92.5% of tested patients were negative for IgA antibodies. Analyzing IgG we found that 16.4% of subjects were positive and 83.6% were negative for IgG antibodies. Using RT-PCR assay as gold standard we determined the presence of specific sequences of *C. trachomatis* gene in 4.5% cases, whereas in 95.5% the test result was negative.

For testing of statistical significance between the results obtained by RT-PCR as a gold standard and DIF, RT and ELISA chi-squared ( $\chi^2$ ) test were used. Statistical analysis showed a significant difference between RT-PCR and all four analyzed screening tests: DIF ( $\chi^2 = 303$ ;  $p < 0.001$ ), RT ( $\chi^2 = 4.19$ ;  $p = 0.041$ ), serum IgA ( $\chi^2 = 4.19$ ;  $p = 0.041$ ) and serum IgG ( $\chi^2 = 67$ ;  $p < 0.001$ ) which indicates poor agreement between these tests. As a consequence, a large number of false positive (FP) and false negative (FN) results were observed for all tested assays (Table 2). Analyzing DIF,

we found 53/192 of FP results where RT-PCR negative findings were categorized by DIF as positive, and 2/9 of FN results where RT-PCR positive findings were negative by DIF. Considering RT we did not find any FP result since all RT-PCR negative findings were properly designated by RT; however, a large-scale of disagreement was observed against RT-PCR positive findings with 6/9 of FN results. Similarly, comparing the results of the RT-PCR with the results obtained by ELISA IgA, only 11/192 of FP, but 5/9 of FN results were found. Finally, ELISA IgG assay incorrectly classified 27/192 of RT-PCR negative findings as positive (FP), whereas 3/9 of RT-PCR positive findings were FN.

Table 2 also shows measures of diagnostic accuracy determined according to results obtained by RT-PCR as a gold standard. Generally, sensitivities associated with screening tests ranged from approximately 33% (RT) to almost 80% (DIF), with negative predictive value >95% for all assays. Although all evaluated assays have satisfactory high specificity RT demonstrated perfect sensitivity (100%) and convincingly showed the highest positive predictive value (100.0%), whereas other screening test have much lower positive predictive values ranging from approximately 10-30%. To select the most relevant assay maintaining an accurate and well-balanced sensitivity-specificity value Youden's index were calculated. According to Youden's index, serum IgG and DIF testing demonstrate, although low, the most balanced sensitivity-specificity rate of ~50%. However, taking into account positive and negative predictive value as well, RT assay exhibit the highest expanded Youden's index (130%), as well as the best overall diagnostic accuracy (97%).

**Table 2.** Diagnostic accuracy of four chlamydial screening tests.

Statistic	DIF	RT	IgA	IgG
True positive	77.8%	33.3%	44.4%	66.7%
True negative	72.4%	100%	94.3%	85.9%
False positive	27.6%	0%	5.7%	14.1%
False negative	22.2%	66.7%	55.6%	33.3%
Sensitivity (Sen)	77.8%	33.3%	44.4%	66.7%
Specificity (Spec)	72.4%	100.0%	94.3%	85.9%
Positive likelihood ratio	2.8	/	7.8	4.7
Negative likelihood ratio	0.3	0.7	0.6	0.4
Disease prevalence	4.5%	4.5%	4.5%	4.5%
Positive predictive value (PPV)	11.7%	100.0%	26.7%	18.2%
Negative predictive value (NPV)	98.6%	96.9%	97.3%	98.2%
Youden's index	50.2%	33.3%	38.7%	52.6%
Youden's index (exp.)	60.4%	130.3%	62.7%	69.0%
Accuracy	72.6%	97.0%	92.0%	85.1%

Youden's index = (Sen+Spec)-100; Youden's index (exp.) = (Sen+Spec+PPV+NPV)-200; DIF - direct immunofluorescence, RT- rapid lateral immunochromatographic test, IgA and IgG – antibodies.

## Discussion

Undiagnosed and consequently untreated *C. trachomatis* infections can lead to serious complications and consequences in the reproductive tract [7, 8]. Early diagnostics of an acute chlamydial infection is exceptionally important, but highly challenging due to its asymptomatic nature and unique development cycle of *C. trachomatis*. A large number of tests for the diagnosis of chlamydial infection are available today. According to recommendations of American and European Center for Disease Control, NAATs are highly recommended for detection of genital tract infections caused by *C. trachomatis* due to their high sensitivity, specificity and performance speed.

Our study provides theoretical basis for practical recommendations regarding to the selection of screening tests in the detection of an acute chlamydial infection in cases where nucleic acid amplification techniques are inaccessible for any reason. One potential limitation of our study is detection bias. Namely, NAATs are evidently better for urine samples than cervical/urethral swabs and first void urine is recommended first choice specimen for men. In this study we used urethral swabs for chlamydia detection in male patients which may influence chlamydia detection. However, our study was designed so the screening tests and gold standard (RT-PCR) are performed using the same sample. Although the number of positive cases may be underestimated, the diagnostic accuracy of the screening tests can be directly compared to the results obtained from the gold standard. Another obstacle could be sexual history of patients, as samples selected for chlamydia testing would depend on the sexual orientation of the patient. Yet, we assumed that one could doubt the validity of a sexual history as patients in Serbia may not be honest due to social norms and stigmas. While this part is interesting, we consider that the absence of these anamnestic data can not affect the diagnostic accuracy of the tests and validity of the study.

Based on a careful analysis of the results of individual tests, our study showed that the rapid test has demonstrated the best diagnostic accuracy. However, due to disappointing low sensitivity it cannot be recommended for the diagnosis of an acute chlamydial infection. Our findings are in accordance with findings from other studies where low sensitivity (20-60%) of rapid tests was observed [18-22]. Moreover, the study of Nateghi Rostami *et al.* suggest primary screening of chlamydial infection in women by the low-cost EIA, but confirmation of the negative results by a DNA

amplification method is required because of low sensitivity of EIA assays [23]. Contrary to our results, some authors showed that currently available rapid tests show high sensitivity (60-99%) and offer the possibility of testing patients more difficult to access, which will also allow the treatment of more cases but still do not recommend the laboratory use of these tests [24,25].

We also showed that DIF has well balanced ratio of sensitivity and specificity, but extremely low positive predictive value, which is the main reason why this test cannot be recommended for the diagnosis of an acute chlamydial infection. Similar values of DIF sensitivity and specificity are also presented in other studies [13,26-28]. However, opposite to our findings, some of these earlier studies recommend DIF method as practical and inexpensive, relevant in routine laboratory practice and suitable for the early detection of infection because of its high sensitivity [26,27]. Nevertheless, false negative and false positive results should be prevented by taking quality clinical samples, evaluating of test by the experienced staff and using quality control samples [27]. When the expanded golden standard is used, percentage of DIF sensitivity coincides with the values from our study, with a slightly higher specificity, but contrary to our findings some authors recommend the use of this tests in low-prevalence population [28]. However, other doubt this statement assuming that DIF is not recommended in low prevalence conditions and should be used only in the laboratories that process a small number of samples [13,29].

Our results also provide satisfying results for serum IgA and IgG testing. These tests had specificity, negative predictive value, as well as Youden's index and overall accuracy that were quite high, but due to low sensitivity and positive predictive value these tests also cannot be recommended as sole methods for the diagnosis of chlamydial infection. The vast majority of previous studies indicate that, except in patients with suspected chronic CT infection of upper genital tract, serological IgA and IgG testing have no relevance in establishing the diagnosis of acute chlamydial infection [9-13,30]. The results of one study suggest that, although the correlation of the serology with the active infection of lower genital tract is very low, it can exclude the active infection with high reliability [31]. On the other hand, it has been shown that new, synthetic peptide-based, species specific, serological tests can detect IgA and IgG antibodies that strongly correlated with active infection [32,33]. Moreover, this and other findings suggest that only the serum IgA or secretory sIgA antibody may be present at early stages indicating active chlamydial infection [33,34]. However, in all of

these studies, authors suggest that in such cases of IgA seropositivity, confirmation via detection of *C. trachomatis* nucleic acid is still needed.

Our research did not include cost-effectiveness analysis of the three screening test strategies, because there are no national data available about. The international studies are rare and primarily coming from the highest-income countries [20]. Taking into account the price tariffs for different health services within the Serbian health system as well as the prices for reimbursed drugs, both regulated by the national fund for health care insurance, we could propose that the screening test for chlamydial infection with the best diagnostic performances, RT-PCR, is highly unlikely to be cost-effective strategy here [35,36]. The RT-PCR test has very high price (4.2-5.4 times more expensive than the other tests) and the physician services and drugs effective for chlamydial infections (tetracyclines, macrolides) have low-to-moderate tariffs. Therefore, the savings which would be achieved with RT-PCR testings, due to avoidance of unnecessary costs for diagnostics and treatments of the patients with false positive and false negative results on other screening test, probably could not compensate the large difference within initial test expenses.

One currently available screening strategy for controlling chlamydia infection, that is being considered in resource limited health care systems in developing countries, is the use of point-of-care (POC) tests [14,15,37-39]. Although some rapid POC tests are easy to perform, specific and affordable, currently there is a little confirmative evidence on POC tests in screening settings [20,40]. Another possibility, where NAATs could be good candidate for POC settings, is usage of pooled urine samples. Urine samples are noninvasive, acceptable in screening context especially in men, quick to analyse, do not require trained personnel and even when pooled, remain an accurate method for chlamydia detection [41,42]. Therefore, the use of pooled urine samples would make any global-based screening strategy easier to implement and more cost-effective, particularly in developing countries. Nevertheless, the most cost-effective method for diagnosis of chlamydia in Serbia and other countries with similar socio-economic status remain unknown until appropriate data of future, health-economic studies are published.

## Conclusion

In conclusion, as in other cases of screenings, the diagnosis of acute chlamydial infections implies a delicate balance among benefits and risks. Increase in

sensitivity came at cost of amplifying false positive and opposite enhancing specificity will lead to increase in false negative results. According to our results, none of evaluated screening tests can be recommended as individual methods for the diagnosis of acute chlamydial infection. When they are affordable, NAATs are still preferred as of their superior sensitivity and specificity. However, for the most diagnostic laboratories in countries with low incomes, such as Serbia, this standard will remain unavailable. Until there is a quite sophisticated cost benefit study or a change in the market pricing, it seems that DIF and RT will remain widely used tests for vast majority laboratories in Serbia and other countries with similar health care and socio-economic environments.

## Acknowledgements

This study was supported by grant No. III41010 from the Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia.

## References

- O'Connell CM, Ferone ME (2016) *Chlamydia trachomatis* genital infections. *Microb cell* 3: 390-403.
- Nenoff P, Manos A, Ehrhard I, Krüger C, Paasch U, Helmbold P, Handrick W (2017) Non-viral sexually transmitted infections - Epidemiology, clinical manifestations, diagnostics and therapy: Part 2: Chlamydia and mycoplasma. *Hautarzt* 68: 50-58.
- Centers for Disease Control and Prevention (2017). Sexually transmitted disease surveillance 2016. Available: [https://www.cdc.gov/std/stats17/2017-STD-Surveillance-Report\\_CDC-clearance-9.10.18.pdf](https://www.cdc.gov/std/stats17/2017-STD-Surveillance-Report_CDC-clearance-9.10.18.pdf). Accessed: 29th November 2018
- European Centre for Disease Prevention and Control (2018). Chlamydia infection - Annual epidemiological report for 2016. Available [https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/AER\\_for\\_2016-chlamydia.pdf](https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/AER_for_2016-chlamydia.pdf). Accessed: 14th January 2018
- Peipart JF (2003) Genital chlamydial infections. *N Engl J Med* 349: 2424-2430.
- Bally F, Quach A (2014) Chlamydia: From population screening to individual repeated screening. *Rev Med Suisse* 10: 1884-1886.
- Ljubin-Sternak S, Meštrović T (2014) *Chlamydia trachomatis* and genital mycoplasmas: pathogens with an impact on human reproductive health. *J Pathog* 2014: 1-15
- Haggerty CL, Gottlieb SL, Taylor BD, Low N, Xu F, Ness RB (2010) Risk of sequelae after *Chlamydia trachomatis* genital infection in women. *J Infect Dis* 15: 134-155.
- Centers for Disease Control and Prevention (2014) Recommendations for the laboratory –Based detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* - 2014. *MMWR Recomm Rep* 63: 1-19.
- Lanjouw E, Ouburg S, de Vries HJ, Sary A, Radcliffe K, Unemo M (2015) 2015 European guideline on the management

- of *Chlamydia trachomatis* infections. *Int J STD AIDS* 27: 333-348.
11. Meyer T (2016) Diagnostic procedures to detect *Chlamydia trachomatis* infections. *microorganisms* 4: 1-10.
  12. Johnson RE, Newhall WJ, Papp JR, Knapp JS, Black CM, Gift TL, Steece R, Markowitz LE, Devine OJ, Walsh CM, Wang S, Gunter DC, Irwin KL, DeLisle S, Berman SM (2002) Screening tests to detect *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* infections - 2002. *MMRW Recomm Rep* 51: 1-38.
  13. MA Chernesky (2005) The laboratory diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections. *Can J Infect Dis Med Microbiol* 16: 39-44.
  14. Van Dyck E, Ieven M, Pattyn S, Van Damme L, Laga M (2001) Detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* by enzyme immunoassay, culture, and three nucleic acid amplification tests. *J Clin Microbiol* 39: 1751-1756.
  15. Vickerman P, Watts C, Alary M, Mabey D, Peeling RW (2003) Sensitivity requirements for the point of care diagnosis of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in women. *Sex Transm Infect* 79: 363-368.
  16. Black CM (1997). Current methods of laboratory diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections. *Clin Microbiol Rev* 10: 160-184
  17. Ho MK, Lo JY, Lo AC, Cheng FK, Chan FK (2009) Evaluation of replacing the existing diagnostic strategy for *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* infections with sole molecular testing of urine specimens in a sexually transmitted infection clinic setting. *Sex Transm Infect* 85: 322-325.
  18. Schachter J (2016) Point-of-care tests using enzyme detection to diagnose *Chlamydia trachomatis* infection do not work. But when they fail in clinical trials, they reappear under different names. *Sex Transm Infect* 92: 406-407.
  19. Abbai-Shaik NS, Reddy T, Govender S, Ramjee G (2016) Poor performance of the Chlamydia rapid test device for the detection of asymptomatic infections in South African men: A pilot study. *J Sex Transm Dis* 2016: 1-3.
  20. Hislop J, Quayyum Z, Flett G, Boachie C, Fraser C, Mowatt G (2010) Systematic review of the clinical effectiveness and cost-effectiveness of rapid point-of-care tests for the detection of genital Chlamydia infections in women and men. *Health Technol Assess* 14: 1-97.
  21. Pánuco CAB, Rodríguez ID, Méndez JTH, Guzmán LAM, Fierro DA, Murilo JM, Maldonado ER (2000) Detection of *Chlamydia trachomatis* in pregnant women by the Papanicolaou technique, enzyme immunoassay and polymerase chain reaction. *Acta Cytol* 44: 114-123.
  22. Nateghi Rostami M, Hossein Rashidi B, Aghsaghloo F, Nazari R (2016) Comparison of clinical performance of antigen based-enzyme immunoassay (EIA) and major outer membrane protein (MOMP)-PCR for detection of genital *Chlamydia trachomatis* infection. *Int J Reprod BioMed* 14: 411-420.
  23. Gift TL, Pate MS, Hook EW, Kassler WJ (1999) The rapid test paradox: When fewer cases detected lead to more cases treated: A decision analysis of tests for *Chlamydia trachomatis*. *Sex Transm Dis* 26: 232-240.
  24. Huang W, Gaydos CA, Barnes MR, Jett-Goheenm, Blake DR (2013) Comparative effectiveness of a rapid point-of-care test for detection of *Chlamydia trachomatis* among women in a clinical setting. *Sex Transm Infect* 89: 108-114.
  25. Estany A, Todd M, Vasquez M, McLaren R (1989) Early detection of genital chlamydial infection in women: an economic evaluation. *Sex Transm Dis* 16: 21-27.
  26. Ozüberk OÖ, Gökahmetoğlu S, Özçelik B, Ekmekçiöğlu O (2013) Investigation of *Chlamydia trachomatis* with cell culture, DFA and PCR methods in the genital swab samples of symptomatic patients. *Mikrobiyol Bul* 47: 79-86.
  27. Thejls H, Gnarpe J, Gnarpe H, Larsson PG, Platz-Christensen JJ, Ostergaard L, Victor A (1994) Expanded gold standard in the diagnosis of *Chlamydia trachomatis* in a low prevalence population: diagnostic efficacy of tissue culture, direct immunofluorescence, enzyme immunoassay, PCR and serology. *Genitourin Med* 70: 300-303.
  28. Schachter J (1997) DFA, EIA, PCR, LCR and other technologies: What tests should be used for diagnosis of chlamydia infections? *Immunol Invest* 26: 157-161.
  29. Puolakkainen M (2013) Laboratory diagnosis of persistent human chlamydial infection. *Front Cell Infect Microbiol* 3: 1-8.
  30. Rabenau HF, Köhler E, Peters M, Doerr HW, Weber B (2000) Low correlation of serology with detection of *Chlamydia trachomatis* by ligase chain reaction and antigen EIA. *Infection* 28: 97-102.
  31. Verkooyen RP, Peeters MF, van Rijsoort-Vos JH, van der Meijden W, Mouton JW (2002) Sensitivity and specificity of three new commercially available *Chlamydia trachomatis* tests. *Int J STD AIDS* 2: 23-25.
  32. Komoda T (2007) Kinetic study of antibodies (IgG, IgA) to *Chlamydia trachomatis*: Importance of IgA antibody in screening test for *C. trachomatis* infection by peptide-based enzyme immunosorbent assay. *Jpn J Infect Dis* 60: 347-351.
  33. Fresse AS, Sueur JM, Hamdad F (2010) Diagnosis and follow-up of genital chlamydial infection by direct methods and by detection of serum IgG, IgA and secretory IgA. *Indian J Med Microbiol* 28: 326-331.
  34. Kosanovic R (2014) The rule book on the prices of health services at the secondary and tertiary level on the health care. In: Djordjevic I, editor. *The Official Gazette*. Belgrade: The Official Gazette. 6-120.
  35. Mandic V (2018) The rule book on the Medicines List which is prescribed and issued at the expense of compulsory health insurance. In: Djordjevic M, editor. *The Official Gazette*. Belgrade: The Official Gazette. 50-276.
  36. Nuñez-Forero L, Moyano-Ariza L, Gaitán-Duarte H, Ángel-Müller E, Ruiz-Parra A, González P, Rodríguez A, Tolosa JE (2015) Diagnostic accuracy of rapid tests for sexually transmitted infections in symptomatic women. *Sex Transm Infect* 92: 24-28.
  37. Su WH, Tsou TS, Chen CS, Ho TY, Lee WL, Yu YY, Chen TJ, Tan CH, Wang PH (2011) Diagnosis of Chlamydia infection in women. *Taiwan J Obstet Gynecol* 50: 261-267.
  38. Hsieh YH, Hogan MT, Barnes M, Jett-Goheen M, Huppert J, Rompalo AM, Gaydos CA (2010) Perceptions of an ideal point-of-care test for sexually transmitted infections – A qualitative study of focus group discussions with medical providers. *PLoS One* 30: 5: e14144.
  39. Kelly H, Coltart CEM, Pant Pai N, Klausner JD, Unemo M, Toskin I, Peeling RW (2017) Systematic reviews of point-of-care tests for the diagnosis of urogenital *Chlamydia trachomatis* infections. *Sex Transm Infect* 93 Suppl 4: 22-30
  40. Kacena KA, Quinn SB, Howell MR, Madico GE, Quinn TC, Gaydos CA (1998) Pooling urine samples for ligase chain



reaction screening for genital *Chlamydia trachomatis* infection in asymptomatic women. *J Clin Microbiol* 36: 481–485.

41. Butylkina R, Juseviciute V, Kasparaviciene G, Vagoras A, Pagirskas E, Unemo M, Domeika M (2007) Pooling of urine specimens allows accurate and cost-effective genetic detection of *Chlamydia trachomatis* in Lithuania and other low-resource countries. *Scand J Infect Dis* 39: 209-212.

### **Corresponding author**

Dejan Baskić  
Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac  
Svetozara Markovića Street 69, 34000 Kragujevac, Serbia  
Tel: +381 65 877 66 33  
Fax: +381 34 306 800  
e-mail: dejan.baskic@gmail.com

**Conflict of interests:** No conflict of interests is declared.



## Original article

# Augmented oxidative stress in infertile women with persistent chlamydial infection



Jelena Tošić-Pajić<sup>a</sup>, Dragana Šeklić<sup>b</sup>, Jelena Radenković<sup>b</sup>, Snežana Marković<sup>b</sup>,  
Jelena Čukić<sup>c</sup>, Dejan Baskić<sup>c,d,\*</sup>, Suzana Popović<sup>d</sup>, Milos Todorović<sup>d</sup>,  
Predrag Sazdanović<sup>d,e</sup>

<sup>a</sup> Doctoral Academic Study, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Svetozara Markovica 69, 34000 Kragujevac, Serbia

<sup>b</sup> Department for Biology and Ecology, Faculty of Science, University of Kragujevac, Radoja Domanovica 12, 34000 Kragujevac, Serbia

<sup>c</sup> Public Health Institute Kragujevac, Nikole Pasica 1, 34000 Kragujevac, Serbia

<sup>d</sup> Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Svetozara Markovica 69, 34000 Kragujevac, Serbia

<sup>e</sup> Department of Gynecology and Obstetrics, Clinical Center Kragujevac, Zmaj Jovina 30, 34000 Kragujevac, Serbia

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 18 October 2016

Received in revised form 6 March 2017

Accepted 7 March 2017

Available online 20 March 2017

## Keywords:

Oxidative stress

Persistent chlamydial infection

Tubal factor infertility

## ABSTRACT

There is established association between oxidative stress, infections of genital tract and fertility. Genital tract infections may provoke increased production of free radicals and generate oxidative stress that can be involved in pathophysiology of a number of reproductive diseases and complications during pregnancy. The aim of this study was to determine connection between oxidative stress and infertility associated with persistent chlamydial infection. Serum samples of infertile women with tubal factor infertility (TFI), women with multiple spontaneous abortions (MSA) and fertile women were screened for *C. trachomatis* MOMP specific IgG and IgA antibodies and cHSP60 specific IgG antibodies using ELISA. The levels of superoxide anion radical, nitric oxide and reduced glutathione were determined spectrophotometrically. Serum levels of testosterone, luteinizing hormone and follicle stimulating hormone were determined by enzyme-linked fluorescent immunoassay method. Our results showed that persistent infection was more prevalent in TFI than in MSA group, whereas seropositivity was higher in MSA than in TFI group of patients. We also found that superoxide anion was significantly lower, while LH was markedly higher in TFI and MSA group of patients. However, when our results were analyzed according to the serological status of chlamydial infection, we found that parameters of oxidative stress, superoxide anion and index of oxidative stress, defined as relative ratio between superoxide anion and nitrites sum and glutathione  $((O_2^{\cdot-} + NO_2^-)/GSH)$  were significantly elevated in infertile patients with persistent chlamydial infection compared to seropositive and seronegative patients. Our findings point to the possible impact of *Chlamydia trachomatis* infection on prooxidative-antioxidative balance that can influence fertility potential in women with persistent chlamydial infection.

© 2017 Society for Biology of Reproduction & the Institute of Animal Reproduction and Food Research of Polish Academy of Sciences in Olsztyn. Published by Elsevier Sp. z o.o. All rights reserved.

## 1. Introduction

Oxidative stress (OS) is a condition characterized by an imbalance between prooxidants and antioxidants. This relationship can be disrupted by increased levels of reactive nitrogen species (RNS) and/or reactive oxygen species (ROS), or by reduction of antioxidant defense mechanisms [1]. A certain amount of ROS is required for maintenance of normal cellular functions. On the

other hand, overproduction of ROS can overpower antioxidant defense mechanisms, thereby creating an environment that is unsuitable for normal physiological reactions. In women, this imbalance has been involved in the pathophysiology of a number of reproductive diseases including tubal factor infertility, polycystic ovary syndrome, endometriosis and unexplained infertility. In addition, this condition is associated with pregnancy complications such as miscarriage, recurrent pregnancy losses, preeclampsia, as well as intrauterine growth restriction [2]. Nitric oxide (NO) is a signal molecule with vasodilatory properties involved in several physiological and pathological processes [2]. Although the vasodilatory effect of NO may be therapeutic, excessive production

\* Corresponding author at: Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Svetozara Markovica 69, 34000 Kragujevac, Serbia.

E-mail address: [dejan.baskic@gmail.com](mailto:dejan.baskic@gmail.com) (D. Baskić).

can influence the structure and function of proteins, thereby causing changes in the catalytic activities of enzymes, changes in the organization of the cytoskeleton, and disturbances in cell signal transduction. Moreover, NO is a key factor that leads to the endothelial dysfunction associated with infertility states in both men and women [3].

Among others, *C. trachomatis* genital tract infection is widely associated with the failure of human reproduction. Spread of chlamydial infection to the upper part of the female genital tract can cause pelvic inflammatory disease with serious scarring in the fallopian tubes leading to tubal factor infertility [4]. Inflammatory responses to genital chlamydial infection lead to activation of polymorphonuclear leukocytes and macrophages, resulting in an increased production of ROS and oxidative stress. In that way, OS may possibly participate in multiple pathological changes that affect reproductive function of both men and women. Pathological mechanisms include lipid peroxidation, oxidative DNA damage, modulation of gene expression and inhibition of protein synthesis [5]. In several cell lines, chlamydial infection has proved to be the cause of the release of ROS and the products of lipid peroxidation [6]. Peroxidation of surrounding cells may induce cell lysis and consequently can facilitate spreading of chlamydial elementary bodies. This may partially explain the inflammation and cell damage occurring during chlamydial infections [7]. Moreover, infection of epithelial cells of fallopian tubes can cause oxidative damage to DNA, which may result in elevated levels of 8-OHdG (8-hydroxy-2-deoxyguanosine), as observed in women with chlamydial infection and tubal infertility [8]. A biomarker of endogenous oxidative DNA damage, 8-OHdG is also associated with a lower rate of fertilization and low quality oocytes [9].

It has been reported, in both human and animal studies, that female sex hormones might influence host susceptibility, innate and adaptive immune response and outcome of chlamydial infection. [10–13]. Other findings suggest that oxidative stress genes are, at least in part, under the control of sex hormones which may exert either antioxidative [14–16] or prooxidative effects [17,18]. Finally, hormonal imbalance is considered as a common cause of female infertility [19–21].

The complex interplay between oxidative stress response, sex hormones and persistent chlamydial infection in the etiology of female infertility is poorly understood. Understanding the mechanisms of their mutual relationships may provide useful for treatment and/or prognosis of infertility patients. Therefore, serum levels of oxidative stress biomarkers and female reproductive hormones were estimated in Chlamydia positive and negative women with tubal factor infertility, multiple spontaneous abortions and in fertile women with the aim to determine their possible association with persistent chlamydial infection and tubal factor infertility.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Study population and design

This prospective case control study involved female patients presenting to the Department of Gynecology and Obstetrics, at the Clinical Center in Kragujevac between July 2011 and December 2012. The Ethical Committee at the Public Health Institute Kragujevac approved the study and written informed consent was obtained from all subjects as stated by the Declaration of Helsinki.

In this study, infertility was defined according to WHO definition as failure to achieve a clinical pregnancy after 12 months or more of regular unprotected sexual intercourse either due to the inability to conceive or carry a pregnancy to a live birth. In agreement with this definition, inclusion criteria for study entry were infertility due to tubal factor or multiple spontaneous abortions for at least 12 months duration. Fertile controls were women who had given birth within

the last 18 months. Exclusion criteria were the use of contraceptive therapy, known uterine anomalies, history of uterine surgery, current vaginal or cervical infection, chronic or systemic illness and male factor infertility.

A total of 104 age matched women, 33 with tubal factor infertility (TFI), 54 with multiple spontaneous abortions (MSA) and 17 fertile controls were consecutively recruited in the study. Infertility assessment was carried out by standard procedures. Tubal factor infertility was verified by hysterosalpingography and multiple spontaneous abortions were identified by means of patients' medical records. Out of 104 enrolled patients, 94 patients (10 patients were excluded from this analysis due to indeterminate serological data, see 2.3. antibody analysis) were additionally subdivided in 3 groups based on their Chlamydia antibody positivity into: seropositive patients with serological evidence of persistent chlamydial infection (n = 23), seropositive patients with serological evidence of previous/recent chlamydial infection (n = 29) and seronegative patients (n = 49).

### 2.2. Microbiology screening

After clinical examination, vaginal and cervical samples were collected from all subjects. Sterile dacron-tipped swabs were taken from the vaginal sidewall and cervical canal, inserted in sterile tube containing transport medium and transported to the laboratory within 2 h. All subjects were tested for the presence of *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis*, *Candida albicans* and *Treponema pallidum* using standard microbiology methods.

### 2.3. Antibody analysis

Serum samples were obtained from peripheral blood, centrifuged and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until further analysis. All samples were screened for *C. trachomatis* MOMP specific IgG and IgA and *C. trachomatis* HSP60 (heat shock protein 60) specific IgG using commercial ELISA kits (Dia.Pro, Milano, Italy and Medac, Wedel, Germany, respectively). Serum samples were diluted 1:101 (MOMP) or 1:50 (cHSP60) with sample buffer and tested in microplate wells, according to the manufacturer's instructions. The absorbance was measured at 450 nm using RT-2100C microplate reader (Rayto, Shenzhen, PR China). Results were evaluated semiquantitatively by calculating ratio of optical density of sample value (S) and cut-off value (Co). The result was interpreted as negative when the S/Co ratio was less than 0.9, undefined when S/Co ratio was greater than or equal to 0.9 and less than 1.1, and positive when the ratio was greater than or equal to 1.1. Anti-MOMP IgG and/or IgA seropositive patients with concurrent anti-cHSP60 seropositivity are defined as patients with serological evidence of persistent chlamydial infection (cHSP60 seropositive). Patients who were anti-MOMP IgG and/or IgA seropositive, but lacking anti-cHSP60 IgG antibody, are defined as seropositive patients with serological evidence of previous/recent chlamydial infection (MOMP seropositive). Finally, patients lacking anti-MOMP and anti-cHSP60 antibodies are defined as seronegative patients without serological verification of chlamydial infection. Six patients seropositive for anti-cHSP60 IgG antibody, but seronegative for IgA/IgG against *C. trachomatis* MOMP and four patients with anti-cHSP60S/Co values in the equivocal zone were excluded from serological analysis.

### 2.4. Determination of superoxide anion radical (NBT assay)

The concentration of superoxide anion radical ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) was determined by spectrophotometric method based on the reduction of nitroblue tetrazolium (NBT) to nitroblue-formazan in the

presence of  $O_2^{\bullet -}$  [22]. Briefly, 10  $\mu$ l of 5 mg/ml NBT was added to 100  $\mu$ l of each plasma samples and incubated for 45 min at 37 °C. The formazan was solubilized in 10  $\mu$ l DMSO and the resulting color reaction was measured spectrophotometrically at 550 nm on microplate reader (RT-2100C, Rayto, Shenzhen, PR China). The results were expressed as nmol/ml.

### 2.5. Nitrite measurement (Griess assay)

The spectrophotometric determination of nitrites ( $NO_2^-$ ), as an indicator of the nitric oxide level, was performed using the Griess method [23]. Briefly, the nitrite standard solution (100 mM) was serially diluted from 100 to 1.6  $\mu$ M in triplicate in a 96-well, flat-bottomed, microtiter plate. One hundred microliters of freshly prepared Griess reagent [equal volumes of 0.1% *N*-(1-naphthyl) ethylenediamine and 1% sulfanilic acid (solution in 5% phosphoric acid) mixed together immediately prior to application to the plate] was added in 50  $\mu$ l of each plasma samples. The absorbance at 550 nm was measured following incubation (5–10 min) using a microplate reader (RT-2100C, Rayto, Shenzhen, P.R. China). The results were expressed in nmol  $NO_2^-$ /ml from a standard curve established in each test, constituted of known molar concentrations of nitrites.

### 2.6. Determination of reduced glutathione

This assay is based on the oxidation of the reduced form of glutathione (GSH) with sulphide reagent 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), forming a yellow product of 5'-thio-2-nitrobenzoic acid (TNB) [24]. Equal volumes of samples and sulphosalicylic acid (2.5%) were incubated 10 min at 0 °C. Color reaction was measured spectrophotometrically on microplate reader at 405 nm (RT-2100C, Rayto, Shenzhen, PR China) following incubation for 5 min. The results were expressed in nmol/ml from a standard curve established in each test, constituted of known molar GSH concentrations.

### 2.7. Hormone detection

Testosterone (TEST), luteinizing hormone (LH) and follicle stimulating hormone (FSH) levels were determined by enzyme-

linked fluorescent immunoassay (ELFA) method according to the manufacturer's instructions (Tosoh AIA-360 automated immunoassay analyzer, Tosoh Corporation, Japan).

### 2.8. Statistical analysis

Statistical analysis was performed with the appliance of commercial SPSS program (version 19.0, SPSS Inc., Chicago, IL). Biological activity data were obtained from duplicate samples. The data distributions were evaluated for normality by Kolmogorov-Smirnov test. Statistical significance was determined using the Student's *t*-test or the one-way ANOVA, Mann-Whitney *U* test or Kruskal-Wallis depending on data distribution. Chi square test was used for analysis of non-quantitative variables. The data are expressed as percentage or median and interquartile range. A *p* value < 0.05 was considered as statistically significant.

## 3. Results

A high rate of seropositivity against chlamydial antigens was found in our study population. Serological evidence of chlamydial infection was found in 51.5% and 72.2% of TFI and MSA patients, respectively, whereas only 5.9% of fertile women showed anti-chlamydial antibody response (*p* < 0.001). Compared to the group of fertile women, the prevalence of both cHSP60 and MOMP seropositivity were higher in TFI and MSA patients. Serological evidence of persistent infection (cHSP60 seropositive) tended to be more prevalent in TFI than in MSA group (45.4% vs 24.1%), whereas serological evidence of previous/recent infection (MOMP seropositive) was higher in MSA (48.1%) than in TFI group of patients (6.1%) (*p* < 0.001) (Table 1).

In order to define whether oxidative stress is more affected by the clinical cause of infertility or serological status of chlamydial infection, different parameters of oxidative stress were compared between women with tubal factor infertility or multiple spontaneous abortions and fertile women. The data presented in Table 1 show that compared with the fertile controls, the concentration of superoxide anion radicals is significantly lower in both, TFI and MSA group of patients (*p* < 0.05). Determining the level of nitrites, as a nitric oxide level indicator, we found that there was no statistically significant difference between TFI, MSA and control groups. We also found that values of glutathione (GSH) were

**Table 1**  
Serological status, oxidative stress markers and hormone levels in TFI, MSA and fertile women.

Parameter	TFI n = 33	MSA n = 54	Fertile n = 17	p-value
<b>Serology</b>				
Seronegative (%)	48.5	27.8	94.1	<i>p</i> < 0.0003
MOMP seropositive (%)	6.1	48.1	0	<i>p</i> < 0.0006
cHSP60 seropositive (%)	45.4	24.1	5.9	<i>p</i> < 0.0006
Total seropositive (%)	51.5	72.2	5.9	<i>p</i> < 0.0008
<b>OS markers</b>				
$O_2^{\bullet -}$ (nmol/ml)	39.7 (31.1–61.4)	39.8 (30.3–52.9)	59.6 (43.3–77.8)	<i>p</i> < 0.035
$NO_2^-$ (nmol/ml)	20.8 (16.8–24.2)	19.8 (16.5–24.5)	20.1 (18.2–24.4)	<i>p</i> > 0.05
GSH (nmol/ml)	25.3 (16.8–24.2)	25.0 (19.4–31.6)	22.9 (17.9–37.2)	<i>p</i> > 0.05
$((O_2^{\bullet -} + NO_2^-)/GSH)$ (nmol/ml)	2.5 (1.6–4.3)	2.3 (1.7–3.6)	3.0 (2.6–5.1)	<i>p</i> > 0.05
<b>Hormones</b>				
TEST (ng/dl)	51.4 (37.8–69.5)	51.9 (37.5–74.7)	49.2 (35.3–55.8)	<i>p</i> > 0.05
LH (mIU/ml)	5.9 (2.9–10.8)	5.8 (4.2–7.8)	3.7 (2.5–19.1)	<i>p</i> < 0.043
FSH (mIU/ml)	5.3 (3.0–7.8)	5.7 (4.4–7.4)	5.6 (4.6–5.8)	<i>p</i> > 0.05
LH/FSH (mIU/ml)	1.0 (0.6–1.9)	1.1 (0.8–1.5)	0.9 (0.5–3.1)	<i>p</i> > 0.05

TFI = Tubal Factor Infertility, MSA = Multiple Spontaneous Abortions, cHSP60 seropositive = Anti-MOMP IgG and/or IgA seropositive/anti-cHSP60 IgG seropositive, MOMP seropositive = anti-MOMP IgG and/or IgA seropositive/anti-cHSP60 IgG seronegative, OS = Oxidative Stress, GSH = Glutathione,  $O_2^{\bullet -}$  = Superoxide Anion,  $NO_2^-$  = Nitrites, TEST = Testosterone, LH = Luteinizing Hormone, FSH = Follicle Stimulating Hormone. The data are expressed as percentage or median and interquartile range.



slightly higher in the TFI and MSA group than in the control group, but this difference was not statistically significant. Given that we found that TFI and MSA patients have reduced levels of the superoxide anion and slightly increased levels of glutathione, we determined the index of oxidative stress as a relative ratio between the sum of superoxide anions and nitrites and glutathione ( $(O_2^{\cdot-} + NO_2^-)/GSH$ ) for each group of subjects. This analysis showed that the index of oxidative stress was lower in the TFI (2.5) and MSA groups (2.3), as compared to the control group (3.0), but this difference was not statistically significant.

As noted in Table 1 a significant variation was observed in the serum level of LH among the tested groups. Although the serum level of LH was higher in TFI and MSA patients, their LH values were still within the normal range. Differences between serum levels of testosterone, and FSH and LH/FSH ratio did not reach statistical significance. Importantly, in all three groups, the majority of patients had balanced LH/FSH ratios.

Infertile women are heterogeneous in nature, differing both in terms of the etiologies of their infertility and the serological status of chlamydial infection. Therefore, based on the anti-MOMP and anti-cHSP60 antibody values, patients are classified into three groups: seronegative, seropositive with serological evidence of previous infection (MOMP seropositive) and seropositive patients with serological evidence of persistent infection (cHSP60 seropositive).

Table 2 shows the values of oxidative stress markers and sex hormones in female patients classified by serological status of chlamydial infection. We found that the concentration of superoxide anion radicals was significantly higher in the group of cHSP60 seropositive patients compared with both, seronegative and MOMP seropositive subjects ( $p < 0.05$ ). Nitrate levels, were also slightly higher in cHSP60 seropositive patients. The values of GSH were inversely correlated with serological status of chlamydial infection, as the levels of this antioxidant were notably lower in cHSP60 seropositive. As our results show, patients with serological evidence of persistent infection have elevated levels of superoxide anion, slightly higher levels of nitrites and reduced levels of glutathione. Therefore, we determined the oxidative stress index for each of the three groups. This analysis showed that oxidative stress index was significantly higher in cHSP60 seropositive patients (3.8;  $p < 0.05$ ).

Comparison of hormone levels between seronegative and seropositive patients showed no differences between investigated groups. Moreover, the majority of patients have approximately equal amounts of LH and FSH, with a LH/FSH ratio just about one in all three tested groups.

#### 4. Discussion

Preservation of cellular physiological functions depends on the homeostatic balance between oxidants and antioxidants. Although free radicals play an important role in cardiovascular, endocrine, reproductive and other physiological processes [25,18,26] excessive ROS can cause cellular damage, as well as changes in cell signaling mechanisms, which interfere with the physiological processes that are required for normal functions and activities of human cells [2]. Moreover, OS has been identified as a factor that plays a crucial role in pathogenesis of infertility in both men and women. Endometriosis, polycystic ovary syndrome, pregnancy complications such as hypertension, preeclampsia, intrauterine growth restriction, spontaneous abortion and recurrent pregnancy loss can also be consequence of excessive ROS [2,27].

Genital chlamydial infection is a sexually transmitted bacterial infection with the highest prevalence in the world [7]. It is described as a potential major cause of fallopian tubes occlusion and infertility due to damage to the fallopian tubes in women [28,29]. Pathological mechanisms include complex relationship between pathological immune responses, both systemic and local, oxidative stress [8] and harmful effects of these responses [30] leading to tissue damage – chronic endometritis, salpingitis, pelvic inflammatory disease and scarring in the fallopian tubes with distal fallopian tube obstruction [28]. In addition, some studies showed that hormonal status at the time of infection might influence host susceptibility and outcome of chlamydial infection [10–13]. Further, LH was shown to increase expression of antioxidant enzymes [31,32]. Finally, particular associations between female sex hormones, immune responses to Chlamydia and redox balance have been reported in tubal infertility [8,33].

In this study, we investigated possible associations of oxidative stress parameters related to chlamydial infection and tubal pathology or spontaneous abortion. Surprisingly, our study showed that, compared with controls, parameters of OS tend to be lower in TFI and MSA patients. Our results seem to be a contradictory to a literature data showing that infertile patients display an oxidant/antioxidant imbalance presented through amplified production of reactive oxygen species and low-grade antioxidant capacity. Increased concentrations of reactive oxygen species, lipid peroxidation, iron, lead and cadmium, but reduced levels of total antioxidant capacity, superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase, as well as vitamins A, C and E has been found in plasma, serum, follicular and peritoneal fluid of infertile women [34–37].

**Table 2**

Oxidative stress markers and hormone levels in Chlamydia positive and negative women.

Parameter	cHSP60 seropositive n = 23	MOMP seropositive n = 29	Seronegative n = 42	p-value
<b>OS markers</b>				
$O_2^{\cdot-}$ (nmol/ml)	55.9 (31.4–66.6)	40.6 (31.5–51.8)	39.4 (31.8–53.8)	$p < 0.023$
$NO_2^-$ (nmol/ml)	21.8 (18.7–26.0)	19.5 (16.4–23.8)	19.3 (16.6–23.9)	$p > 0.05$
GSH(nmol/ml)	21.7 (17.5–25.8)	26.3 (19.3–31.8)	24.5 (19.3–31.3)	$p > 0.05$
$((O_2^{\cdot-} + NO_2^-)/GSH)$ (nmol/ml)	3.8 (2.5–4.6)	2.4 (1.6–3.6)	2.3 (1.6–3.6)	$p < 0.031$
<b>Hormones</b>				
TEST (ng/dl)	55.2 (42.3–68.1)	48.3 (33.2–77.7)	45.1 (33.9–57.1)	$p > 0.05$
LH (mIU/ml)	4.7 (2.4–7.4)	5.6 (4.2–8.6)	6.4 (4.5–11.0)	$p > 0.05$
FSH (mIU/ml)	4.4 (2.7–5.7)	5.4 (4.1–8.0)	5.8 (4.2–9.3)	$p > 0.05$
LH/FSH (mIU/ml)	1.0 (0.6–1.5)	1.2 (0.8–1.6)	1.1 (0.7–1.5)	$p > 0.05$

cHSP60 seropositive = Anti-MOMP IgG and/or IgA seropositive/anti-cHSP60 IgG seropositive, MOMP seropositive = anti-MOMP IgG and/or IgA seropositive/anti-cHSP60 IgG seronegative, OS = Oxidative Stress, GSH = Glutathione,  $O_2^{\cdot-}$  = Superoxide Anion,  $NO_2^-$  = Nitrites, TEST = Testosterone, LH = Luteinizing Hormone, FSH = Follicle Stimulating Hormone. The data are expressed as median and interquartile range.

However, differences between our data and the previous literature data should be assessed critically. This apparent disagreement can be clarified by the fact that infertile patients represent a heterogeneous group of women who differ not only in terms of clinical causes of infertility but also in serological status of chlamydial infection. Stratifying infertile women based on the etiology of infertility revealed that amplified OS in infertile patients was mostly due to endometriosis [35,38–40,41,42], polycystic ovarian syndrome [36,43,42] or unexplained infertility [34,43,44], but not TFI or MSA. Importantly, parameters of OS in patients with TFI were lower than in infertile women with other causes contributing to infertility [34–36,38–40,43,42]. Additionally, TFI represents a diverse group of patients with multifactorial etiologies [45,46], while chlamydia induced tubal pathology represents a significant portion of TFI cases [28]. Similarly, the causes of MSA are also multifactorial and traditionally related to chromosomal abnormalities, hormonal imbalances, immunologic causes, but also infections [47]. Some recent studies have shown that a large proportion of patients with multiple spontaneous abortions have serologic evidence of chlamydial infection (anti-ChSP60 and/or anti-MOMP antibodies) suggesting that spontaneous abortions might also be provoked by endometrial damage from a past/recent or persistent chlamydial infection [48,49].

When our results were analyzed according to the serological status of chlamydial infection, we found that infertile patients with serological evidence of persistent chlamydial infection have significantly elevated parameters of oxidative stress. Although oxidative stress-related female infertility caused by other factors is rather well studied, much less is known about the complex interplay between chlamydial infection, oxidative stress and tubal infertility or spontaneous abortions. A systematic review of the literature in the databases: PubMed, Medline, Embase, Scopus, Web-of-science, and Google Scholar revealed only three studies referring to this topic. One study found no difference in oxidative stress parameters between fertile Chlamydia negative and Chlamydia positive women with or without tubal infertility [33]; a second study showed inferior antioxidant capacity and amplified oxidative stress in infertile Chlamydia positive women with tubal etiology compared to fertile Chlamydia negative control [8]; the third study suggests that chlamydial infection could be an important factor in the pathogenesis of threatened abortion as it increase oxidative stress [50].

In this study, we also measured levels of female reproductive hormones in Chlamydia positive and negative women with tubal factor infertility, multiple spontaneous abortions and in fertile women. We did not suppose that hormone profile would be different between fertile and infertile women. The hormone profile was examined only to eliminate potential confounder. However, compared to the fertile controls, we found that patients with TFI and MSA have elevated level of LH. We cannot fully explain this association, however elevated LH may be involved in immunopathologic mechanism of *C. trachomatis* induced damage or may be a consequence of increased oxidative damage related to chronic inflammation caused by chlamydial persistence or frequent reinfections. However, we found no difference in the serum levels of LH between Chlamydia seropositive and their corresponding seronegative patients, suggesting that elevated LH could be of little importance in the settings of persistent chlamydial infection.

Our results clearly show that there is no difference in any of the examined parameters among patients with diverse clinical cause of infertility (TFI vs MSA). Yet, the differences in the level of oxidative stress are primarily related to the serological status of chlamydial infection and not to the clinical cause of infertility.

Finally, to achieve pregnancy, infertile couples typically rely on assisted reproductive techniques. Regardless of the infertility cause, increased ROS levels in infertile women are associated with

abnormalities of folliculogenesis and poor quality of oocytes and embryos [38,40,51]. Moreover, reduced TAC levels in infertile women [52] are associated with increased susceptibility to ROS-induced damage, with concentrations of glutathione peroxidase and GSH in the follicular fluid being negatively correlated with the maturity and number of high quality embryos [53]. This, in turn, affects the fertilization rate and outcome of *in vitro* fertilization techniques [42,54–56]. Concerning that a large proportion (~50%) of our patients showed serological evidence of past/recent or persistent chlamydial infection it is expected that the success of *in vitro* fertilization in such cases will be less effective. Therefore, while assisted fertility offers excellent opportunities to infertile couples, we should not overlook the importance of chlamydial persistence and its impact on prooxidative-antioxidative balance.

### Conflict of interests

We declare no conflicts of interest.

### Acknowledgements

This study was supported by grant III41010 from the Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia. We are grateful to Dr. Stephan Munich for supplying additional English editing services.

### References

- [1] Burton GJ, Jauniaux E. Oxidative stress. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2010;25:287–99.
- [2] Agrawal A, Aponte-Mellado A, Premkumar B, Shaman A, Gupta S. The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. *Reprod Biol Endocrinol* 2012;10:49.
- [3] Visioli F, Hagen TM. Antioxidants to enhance fertility: role of eNOS end potential benefits. *Pharmacol Res* 2011;64:431–7.
- [4] Pa Mardh. Tubal factor infertility, with special regard to chlamydial salpingitis. *Curr Opin Infect Dis* 2004;17:49–52.
- [5] Ray SD, Lam TS, Rotollo JA, Phadke S, Patel C, Dontabhaktuni A, et al. Oxidative stress is the master operator of drug and chemically-induced programmed and unprogrammed cell death: implications of natural antioxidants *in vivo*. *Biofactor* 2004;21:223–32.
- [6] Azenabor AA, Mahony JB. Generation of reactive oxygen species and formation and membrane lipid peroxides in cells infected with *Chlamydia trachomatis*. *Int J Infect Dis* 2000;4:46–50.
- [7] Rusconi B, Greub G. Chlamydiales and the innate immune response: friend or foe. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2011;61:231–44.
- [8] Nsonwu-Anyanwu AC, Charles-Davies MA, Taiwo VO, Li B, Oni AA, Bello FA. Female reproductive hormones and biomarkers of oxidative stress in genital chlamydia infection in tubal factor infertility. *J Reprod Infertil* 2015;16:82–9.
- [9] de Carvalho LF, Abrao MS, Biscotti C, Sharma R, Agarwal A, Falcone T. Mapping histological levels of 8-hydroxy-2 deoxyguanosine in female reproductive organs. *J Mol Histol* 2013;44:111–6.
- [10] Hafner LM, Cunningham K, Beagley KW. Ovarian steroid hormones: effects on immune responses and *Chlamydia trachomatis* infections of the female genital tract. *Mucosal Immunol* 2013;6:859–75.
- [11] Agrawal T, Vats V, Wallace PK, Salhan S, Mittal A. Cervical cytokine responses in women with primary or recurrent chlamydial infection. *J Interferon Cytokine Res* 2007;27:221–6.
- [12] Agrawal T, Vats V, Wallace PK, Salhan S, Mittal A. Role of cervical dendritic cell subsets, costimulatory molecules, cytokine secretion profile and beta-estradiol in development of sequelae to *Chlamydia trachomatis* infection. *Reprod Biol Endocrinol* 2008;6:46.
- [13] Agrawal T, Vats V, Wallace PK, Singh A, Salhan S, Mittal A. Recruitment of myeloid and plasmacytoid dendritic cells in cervical mucosa during *Chlamydia trachomatis* infection. *Clin Microbiol Infect* 2009;15:50–9.
- [14] Bellanti F, Matteo M, Rollo T, De Rosario F, Greco P, Vendemiale G, et al. Sex hormones modulate circulating antioxidant enzymes: impact of estrogen therapy. *Redox Biol* 2013;1:340–6.
- [15] Wactawski-Wende J, Schisterman EF, Hovey KM, Howards PP, Browne RW, Hediger M, et al. BioCycle Study Group: bioCycle study: design of the longitudinal study of the oxidative stress and hormone variation during the menstrual cycle. *Paediatr Perinat Epidemiol* 2009;23:171–84.
- [16] Demirbag R, Yilmaz R, Erel O. The association of total antioxidant capacity with sex hormones. *Scand Cardiovasc J* 2005;39:172–6.
- [17] Dabrosin CI, Hammar M, Ollinger K. Impact of oestradiol and progesterone on antioxidant activity in normal human breast epithelial cells in culture. *Free Radic Res* 1998;28:241–9.

- [18] Fujii J, Iuchi Y, Okada F. Fundamental roles of reactive oxygen species and protective mechanisms in the female reproductive system. *Reprod Biol Endocrinol* 2005;3:43.
- [19] Tsai YH, Wang TW, Wei HJ, Hsu CY, Ho HJ, Chen WH, et al. Dietary intake, glucose metabolism and sex hormones in women with polycystic ovary syndrome (PCOS) compared with women with non-PCOS-related infertility. *Br J Nutr* 2013;109:2190–8.
- [20] Unuane D, Tournaye H, Velkeniers B, Poppe K. Endocrine disorders & female infertility. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2011;25:861–73.
- [21] Luciano AA, Lanzone A, Goverde AJ. Management of female infertility from hormonal causes. *Int J Gynaecol Obstet* 2013;2:S9–17.
- [22] Auclair C, Voisin E. Nitroblue tetrazolium reduction. *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. Boca Ration: RA Greenwald; 1985.
- [23] Griess P. Bemerkungen Zu der Abhandlung per HH. Weselsky und Benedikt Ue Bereinige Azoverbindungen Ber Dtsch Chemges 1879;12:426–8.
- [24] Baker MA, Cerniglia GJ, Zaman A. Microtiter plate assay for the measurement of glutathione and glutathione disulfide in large numbers of biological samples. *Anal Biochem* 1990;190:360–5.
- [25] Agrawal A, Gupta S, Sharma RK. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol* 2005;3:28.
- [26] Goud Anuradha P, T.Goud Pravin, Diamond Michael P, Gonik Bernard, Abu-Soud Husam M. Reactive oxygen species and oocyte aging: role of superoxide, hydrogen peroxide and hypochlorous acid. *Free Radic Biol Med* 2008;44:1295–304.
- [27] Liu L, Trimarchi JR, Keefe DL. Involvement of mitochondria in oxidative stress-induced cell death in mouse zygotes. *Biol Reprod* 2000;62:1745–53.
- [28] Den Hartog JE, Moree SA, Land JA. Chlamydia trachomatis associated tubal factor subfertility, immunogenetic factors and serological screening. *Hum Reprod Update* 2006;12:719–30.
- [29] Kokcu A, Yavuz E, Celik H, Bildircin D. A panoramic view to relationships between reproductive failure and immunological factors. *Arch Gynecol Obstet* 2012;15:467–73.
- [30] Chandra A, Surti N, Sh Kesavan, Agarwal A. Significance of oxidative stress in human reproduction. *Arch Med Sci* 2009;5:528–42.
- [31] Borekci B, Ingeç M, Kumtepe Y, Karaca M, Koc F, Salman S, et al. Effect of estrogen, progesterone, LH, and FSH on oxidant and antioxidant parameters in rat uterine tissue. *Int J Fertil Steril* 2009;3(3):119–28.
- [32] Kawaguchi S, Sakumoto R, Okuda K. Induction of the expressions of antioxidant enzymes by luteinizing hormone in the bovine corpus luteum. *J Reprod Dev* 2013;59(3):219–24.
- [33] Nsonwu-Anyanwu AC, Charles-Davies MA, Oni AA, Taiwo VO, Bello FA. Chlamydial infection, plasma peroxidation and obesity in tubal infertility. *Ann Ib Postgrad Med* 2011;9:83–8.
- [34] Polak G, Koziol-Montewka M, Gogacz M, Błaszowska I, Kotarski J. Total antioxidant status of peritoneal fluid in infertile women. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2001;94:261–3.
- [35] Prieto L, Quesada JF, Cambero O, Pacheco A, Pellicer A, Codoceo R, et al. Analysis of follicular fluid and serum markers of oxidative stress in women with infertility related to endometriosis. *Fertil Steril* 2012;98:126–30.
- [36] Turan V, Sezer ED, Zeybek B, Sendag F. Infertility and the presence of insulin resistance are associated with increased oxidative stress in young, non-obese Turkish women with polycystic ovary syndrome. *J Pediatr Adolesc Gynecol* 2015;28:119–23.
- [37] Soleimani Rad S, Abbaszadeh S, Ghorbani Haghjo A, Sadagheyani M, Montaseri A, Soleimani Rad J. Evaluation of the melatonin and oxidative stress markers level in serum of fertile and infertile women. *Iran J Reprod Med* 2015;13:439–44.
- [38] Seino T, Saito H, Kaneko T, Takahashi T, Kawachiya S, Kurachi H. Eight-hydroxy-2'-deoxyguanosine in granulosa cells is correlated with the quality of oocytes and embryos in an in vitro fertilization-embryo transfer program. *Fertil Steril* 2002;77:1184–90.
- [39] Lee KS, Joo BS, Na YJ, Yoon MS, Choi OH, Kim WW. Relationships between concentrations of tumor necrosis factor- $\alpha$  and nitric oxide in follicular fluid and oocyte quality. *J Assist Reprod Genet* 2000;17:222–8.
- [40] Singh AK, Chattopadhyay R, Chakravarty B, Chaudhury K. Markers of oxidative stress in follicular fluid of women with endometriosis and tubal infertility undergoing IVF. *Reprod Toxicol* 2013;42:116–24.
- [41] Augoulea A, Mastorakos G, Lambrinoudaki I, Christodoulakos G, Creatsas G. The role of the oxidative-stress in the endometriosis-related infertility. *Gynecol Endocrinol* 2009;25:75–81.
- [42] Karuputhula NB, Chattopadhyay R, Chakravarty B, Chaudhury K. Oxidative status in granulosa cells of infertile women undergoing IVF. *Syst Biol Reprod Med* 2013;59:91–8.
- [43] Pekel A, Gönenç A, Turhan NÖ, Kafalı H. Changes of sFas and sFasL, oxidative stress markers in serum and follicular fluid of patients undergoing IVF. *J Assist Reprod Genet* 2015;32:233–41.
- [44] Veena Bhaskar S, Sharmila U, Satish Kumar A, Pratap Kumar N. Evaluation of oxidative stress, antioxidants and prolactin in Infertile women. *Indian J Clin Biochem* 2008;23:186–90.
- [45] Kodaman PH, Arici A, Seli E. Evidence-based diagnosis and management of tubal factor infertility. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2004;16:221–9.
- [46] Miettinen A, Heinonen PK, Teisala K, Hakkarainen K, Punnonen R. Serologic evidence for the role of Chlamydia trachomatis, Neisseria gonorrhoeae, and Mycoplasma hominis in the etiology of tubal factor infertility and ectopic pregnancy. *Sex Transm Dis* 1990;17(1):10–4.
- [47] Christiansen OB, Steffensen R, Nielsen HS, Varming K. Multifactorial etiology of recurrent miscarriage and its scientific and clinical implications. *Gynecol Obstet Invest* 2008;66(4):257–67.
- [48] Baud D, Goy G, Jatou K, Osterheld MC, Blumer S, Borel N, et al. Role of Chlamydia trachomatis in miscarriage. *Emerg Infect Dis* 2011;17:1630–5.
- [49] Arsovic A, Nikolov A, Sazdanovic P, Popovic S, Baskic D. Prevalence and diagnostic significance of specific IgA and anti-heat shock protein 60 Chlamydia trachomatis antibodies in subfertile women. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2014;33(5):761–6.
- [50] Bałajewicz-Nowak M, Kazimierz P, Małgorzata M. Antioxidative system in pregnant women infected by Chlamydia trachomatis, Mycoplasma hominis, Ureaplasma urealyticum. *Ginekolog Pol* 2011;82(10):732–7.
- [51] Goud PT, Goud AP, Joshi N, Puscheck E, Diamond M, Abu-Soud MH. Dynamics of nitric oxide, altered follicular microenvironment, and oocyte quality in women with endometriosis. *Fertil Steril* 2014;102:151–9.
- [52] Manohar M, Khan H, Sirohi VK, Das V, Agarwal A, Pandey A, et al. Alteration in endometrial proteins during early – and mid – secretory phases of the cycle in women with unexplained infertility. *PLoS One* 2014;18(November (11)): e111687.
- [53] Choi Ys, Cho SH, Seo SK, Park JH, Kim SH, Lee BS. Alteration in the intrafollicular thiol-redox system in infertile women with endometriosis. *Reproduction* 2015;149:155–62.
- [54] Oyawoye O, Abdel Gadir A, Garner A, Constantinovici N, Perrett C, Hardiman P. Antioxidants and reactive oxygen species in follicular fluid of women undergoing IVF: relationship to outcome. *Hum Reprod* 2003;18:2270–4.
- [55] Liu J, Li Y. Effect of oxidative stress and apoptosis in granulosa cells on the outcome of IVF-ET. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2010;35:990–4.
- [56] Jana SK, NB K, Chattopadhyay R, Chakravarty B, Chaudhury K. Upper control limit of reactive oxygen species in follicular fluid beyond which viable embryo formation is not favorable. *Reprod Toxicol* 2010;29:447–51.

## ORIGINAL ARTICLE / ОРИГИНАЛНИ РАД

# The prevalence of resistance to macrolides and lincosamides among community- and hospital-acquired staphylococci and streptococci isolates in southeast Serbia

Milena Mišić<sup>1</sup>, Aleksandra Arsović<sup>2</sup>, Jelena Čukić<sup>3</sup>, Milenko I. Rosić<sup>4</sup>, Jelena Tošić-Pajić<sup>5</sup>, Nevena Manojlović<sup>5</sup>, Ivan Čekerevac<sup>6,7</sup>, Dejan Vidanović<sup>8</sup>, Milanko Šekler<sup>8</sup>, Dejan Baskić<sup>3,9</sup>

<sup>1</sup>Vranje Public Health Institute, Department of Microbiology, Vranje, Serbia;

<sup>2</sup>University of Priština, Faculty of Medical Sciences, Institute of Medical Microbiology and Immunology, Kosovska Mitrovica, Serbia;

<sup>3</sup>Public Health Institute, Department of Microbiology, Laboratory for Virology and Immunology, Kragujevac, Serbia;

<sup>4</sup>University Clinic of Cardiovascular Surgery Sremska Kamenica, Institute for Cardiovascular Diseases of Vojvodina, Novi Sad, Serbia;

<sup>5</sup>University of Kragujevac, Faculty of Medical Sciences, Doctoral Academic Studies, Kragujevac, Serbia;

<sup>6</sup>University of Kragujevac, Faculty of Medical Sciences, Department of Internal Medicine, Kragujevac, Serbia;

<sup>7</sup>Kragujevac Clinical Centre, Pulmonology Clinic, Kragujevac, Serbia;

<sup>8</sup>Kraljevo Veterinary Specialized Institute, Department of Laboratory Diagnostics, Republic of Serbia National Reference Laboratory for Avian Influenza and Newcastle Disease of Poultry, Kraljevo, Serbia;

<sup>9</sup>University of Kragujevac, Center for Molecular Medicine and Stem Cell Research, Faculty of Medical Sciences, Department of Microbiology and Immunology, Kragujevac, Serbia



## SUMMARY

**Introduction/Objective** The increasing resistance to macrolides and lincosamides among staphylococci and streptococci is becoming a global problem. The aim of this study was to investigate the prevalence of macrolide-lincosamide-streptogramin (MLS) resistance phenotypes in staphylococcal and streptococcal isolates in southeast Serbia.

**Methods** The MLS phenotypes were determined by the double-disk diffusion method in 2,121 inpatient and outpatient staphylococcal and streptococcal isolates collected during a one-year period at the Center for Microbiology.

**Results** The methicillin-resistant staphylococci isolates were significantly more resistant to penicillin, erythromycin, clindamycin, gentamicin, and ciprofloxacin (100%, 100%, 29.2%, 65.6%, and 53.1%, respectively) than the methicillin-sensitive ones (93.6%, 64.9%, 12%, 28.9%, and 11.7%, respectively). The inducible clindamycin resistance phenotype was dominant in *S. aureus* and coagulase-negative staphylococci isolates. *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, and *S. agalactiae* isolates showed very high resistance to erythromycin (77.8%, 46.2%, and 32.4%, respectively). All staphylococci and streptococci isolates were sensitive to vancomycin and linezolid, and all beta-hemolytic streptococci isolates to penicillin and ceftriaxone.

**Conclusion** The phenotypic triage of staphylococci is necessary in order to separate inducible resistant and truly clindamycin-sensitive isolates. Macrolides should not be recommended for empirical therapy of streptococcal infections. Penicillins remain the drug of choice for treatment of streptococcal infections in our local area.

**Keywords:** staphylococci; streptococci; MLS resistance phenotypes; inducible clindamycin resistance

## INTRODUCTION

Inpatient *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, and *Streptococcus pneumoniae* infections was the biggest problem in the pre-antibiotic era [1]. Today, when large number of antibiotics are available, we are once again faced with the problem of treating infections caused by penicillin-resistant pneumococci, methicillin- and vancomycin-resistant strains of *S. aureus* and coagulase-negative staphylococci (CNS) [1].

*S. aureus* cause a variety of infections, ranging from mild skin infections to fatal bacteremia: osteomyelitis, pneumonia, arthritis,

staphylococcal scalded skin syndrome, endocarditis, myocarditis, pericarditis, and bacteremia [2, 3]. The most common CNS infections are nosocomial bacteremia related to central venous catheter, endocarditis in patients with artificial heart valves, infections from an intravenous catheter insertion site, and postoperative infections in ophthalmic surgery [2]. *S. pneumoniae* bacteria can cause serious invasive infections, such as meningitis, bacteremia, and pneumonia, as well as non-invasive infections such as sinusitis and acute middle ear infections [4]. *S. agalactiae* causes serious infections in newborns and pregnant women, acute and chronic respiratory infections, endocarditis,

Received • Примљено:

April 7, 2017

Revised • Ревизија:

November 5, 2017

Accepted • Прихваћено:

November 7, 2017

Online first: November 17, 2017

Correspondence to:

Dejan BASKIĆ  
Kragujevac Public Health Institute  
Nikole Pašića 1  
34000 Kragujevac, Serbia  
[dejan.baskic@gmail.com](mailto:dejan.baskic@gmail.com)



sepsis, meningitis, and pyelonephritis [5, 6]. *S. pyogenes* causes uncomplicated upper respiratory tract and skin infections, but also severe life-threatening infections, which are very common in developing countries [7].

Macrolide and lincosamide antibiotics are often used for the treatment of staphylococci and streptococci infections. Therapeutic use of macrolide-lincosamide-streptogramin group B (MLSb) antibiotics can cause inducible macrolide-lincosamide-streptogramin group B (iMLSb) resistance and subsequent clinical failure of therapy, especially in staphylococcal infections. The iMLSb resistance phenotype leads to clindamycin treatment failure due to rapid *in vitro* conversion of inducible to constitutive macrolide-lincosamide-streptogramin group B (cMLSb) resistance phenotype.

A simple way to detect iMLSb-resistant strains is the double-disk diffusion method (D-test). Without the D-test, all clinical isolates with iMLSb resistance would be erroneously interpreted as clindamycin-susceptible causing inappropriate antibiotic therapy.

The aim of this study was to determine and compare the prevalence of MLS resistance in staphylococcal and streptococcal isolates from inpatient and outpatient clinical samples in southeast Serbia. To determine observed MLS resistance phenotypes, D-test was used.

## METHODS

We analyzed 2,121 clinical isolates of staphylococci and streptococci, collected during a one-year period (October 2012 to October 2013) at the Center for Microbiology of the Public Health Institute in Vranje, Serbia, including 865 isolates from nasal and throat swabs, 810 from purulent discharge, 442 from genital secretions, and four isolates from the urine. Multiple specimens from the same patient were avoided. The following clinical species were considered: *S. aureus*, CNS, *S. pneumoniae*, *S. agalactiae*, and *S. pyogenes*. The local ethics committee approved the study according to the Declaration of Helsinki (No. 01-5072/2013). The authors declare that informed consent was not required.

### Bacterial identification

*S. aureus* was identified using Gram stain, catalase test (positive), the mannitol salt agar (Chapman medium), and the tube coagulase test. The staphylococcal strains, which turn the color of the medium from red to yellow and produce free coagulase were identified as *S. aureus*, else were identified as CNS [2]. *S. pneumoniae* was identified using Gram stain, catalase (negative), and optochin test (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA). The slide agglutination test was used as confirmatory identification of *S. pneumoniae* (Slidex pneumo-kit; bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France) [8]. *S. agalactiae* was identified using Gram stain, catalase test (negative), CAMP test, and rapid latex agglutination test (Streptex-Slidex® Strepto Plus, bioMérieux) [8]. The identification of *S. pyogenes* was performed us-

ing Gram stain, catalase test (negative), the susceptibility test to bacitracin (0.04 UI, Taxo A, BBL, BD Microbiology Systems, Cockeysville, MD, USA), and rapid latex agglutination test (Streptex-Slidex® Strepto Plus, bioMérieux) [8].

### Antibiotic susceptibility testing

The antibiotic susceptibility test was performed by the standard disk diffusion method using Mueller–Hinton agar according to the Clinical & Laboratory Standards Institute guidelines [9]. The following antibiotic discs were used: erythromycin 15 µg, clindamycin 2 µg, gentamicin 10 µg, ciprofloxacin 5 µg, penicillin G 10 µg, ceftriaxone 30 µg, cefoxitin 30 µg, vancomycin 30 µg, linezolid 30 µg (Bioanalyse®, Ankara, Turkey). Methicillin resistance in staphylococci was determined by the cefoxitin disk diffusion method (30 µg) [9]. Penicillin-susceptible *Staphylococcus* isolates were further tested for beta-lactamase production using a nitrocefin disk test (Bioanalyse®) [2]. Reference strains *S. pneumoniae* ATCC 49619 and *S. agalactiae* ATCC 12403 were used for quality control (QC). QC of erythromycin and clindamycin disks was performed by reference *S. aureus* ATCC 25923 strain according to a standard disk diffusion QC procedure [9]. In addition, QC was also performed with laboratory's own strains of *S. aureus* and *S. pyogenes* which show results of both positive and negative D-test.

### Determination of resistance phenotypes

MLSb resistance phenotypes were determined by the D-test. Erythromycin (15 µg) and clindamycin (2 µg) disks were placed at an edge-to-edge distance of 12 mm on inoculated Mueller–Hinton agar. The following MLS resistance phenotypes were detected: erythromycin-sensitive and clindamycin-sensitive (Er/Cli S), cMLSb which were resistant to erythromycin and clindamycin, iMLSb which were determined by placing erythromycin and clindamycin disks in adjacent positions resulting in a D-shaped zone around the clindamycin disk, susceptible to clindamycin (without blunting zone) and resistant to erythromycin (M/MSb), and resistant to clindamycin and sensitive to erythromycin (LSa/b).

## RESULTS

The overall antimicrobial resistance of the tested isolates is presented in Table 1, except for vancomycin, linezolid, and ceftriaxone, since resistance to vancomycin and linezolid among staphylococci and streptococci, and resistance to ceftriaxone among streptococci were not detected.

Staphylococci showed the highest resistance rate to penicillin, while the lowest showed *S. pyogenes* and *S. agalactiae* isolates (Table 1). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) (86.2%, 112/130 community- and 87.5%, 28/32 hospital-acquired) and methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci (MRCNS) (87.8%, 43/49 community- and 100%, 22/22 hospital-acquired) isolates

showed the highest resistance rate to erythromycin, while *S. agalactiae* showed the lowest resistance. The highest resistance rates to clindamycin were among community-associated strains of *S. pneumoniae* (38.2%, 21/55) and MRSA (29.2%, 38/130), while the lowest were among community-associated strains of methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA) and methicillin-susceptible coagulase-negative *Staphylococcus* (MSCNS). *S. agalactiae* (72.7%, 101/139 community- and 72.7%, 8/11 hospital-associated) and MRSA (65.6%, 21/32 hospital-acquired) isolates showed the highest resistance rate to gentamicin, while MSSA and MSCNS isolates showed the lowest resistance. MRSA (40.8%, 53/130 community- and 53.1%, 17/32 hospital-acquired) and MRCNS (34.7%, 17/49 community- and 40.9%, 9/22 hospital-acquired) isolates showed the highest resistance rate to ciprofloxacin, while *S. pneumoniae* and MSSA isolates showed the lowest resistance rate (Table 1).

A comparison between hospital- and community-associated isolates showed significantly ( $p < 0.05$ ) higher resistance rate to gentamicin in hospital-associated *S. aureus*, MSSA, and MRSA isolates than in community-associated ones (Table 1). MRSA compared to MSSA hospital- and community-acquired isolates showed significantly ( $p < 0.05$ ) higher resistance rate to all observed antibiotics. CNS isolates showed significantly ( $p < 0.05$ ) higher resistance rate to ceftazidime and erythromycin in hospital- than in community-associated isolates. MRCNS compared to MSCNS community-acquired isolates showed significantly ( $p < 0.05$ ) higher resistance rate to penicillin and gentamicin. MRCNS compared to MSCNS community- and hospital-acquired isolates showed significantly ( $p < 0.05$ ) higher resistance to ceftazidime, erythromycin, and ciprofloxacin. A comparison between *S. pneumoniae* isolates showed significantly ( $p < 0.05$ ) higher resistance rate to ceftazidime in hospital- than in community-associated iso-

lates. Significant differences ( $p < 0.05$ ) were found between *S. pneumoniae* and *S. agalactiae* to penicillin, clindamycin, gentamicin, and ciprofloxacin (in community-acquired isolates), and to erythromycin (in community- and hospital-acquired isolates); between *S. pneumoniae* and *S. pyogenes* to penicillin, erythromycin, and clindamycin (in community-acquired isolates); between *S. agalactiae* and *S. pyogenes* to penicillin, gentamicin, and ciprofloxacin (in community-acquired isolates) (Table 1).

The iMLSb was the most prevalent phenotype among methicillin-resistant and methicillin-susceptible staphylococci except among hospital-acquired MSCNS strains, where M/MSb resistance phenotype was dominant (Table 2). The cMLSb phenotype was the most prevalent in MRSA strains (27.7%, 36/130 from outpatient and 21.9%, 7/32 inpatient specimens). LSa/b phenotype was the rarest among all of MLS resistance phenotypes and most common in MRSA strains from inpatient samples and in MSCNS and MSSA strains from outpatient samples.

A comparison between inpatient and outpatient isolates showed a significant ( $p < 0.05$ ) difference in MRSA and MSCNS isolates with M/MSb phenotype (Table 2). A comparison between MRSA and MSSA isolates showed a significant ( $p < 0.05$ ) difference among community-acquired isolates in the frequency of Er/Cli S, cMLSb, and iMLSb phenotypes, and among hospital-acquired isolates in the frequency of Er/Cli S and cMLSb phenotypes. A comparison between MRCNS and MSCNS isolates showed a significant ( $p < 0.05$ ) difference among community-acquired isolates in the prevalence of Er/Cli S, and among hospital-acquired isolates in the prevalence of Er/Cli S and iMLSb phenotypes (Table 2).

The cMLSb was the most prevalent phenotype among *S. pneumoniae* from outpatient isolates, among *S. agalactiae* from inpatient and outpatient isolates, and among *S. pyogenes* from inpatient isolates (Table 3). The M/MSb

**Table 1.** Antimicrobial resistance rates among community- and hospital-acquired staphylococci and streptococci isolates

Bacteria	Ceftazidime		Penicillin		Erythromycin		Clindamycin		Gentamicin		Ciprofloxacin	
	Comm. n/N (%)	Hosp. n/N (%)	Comm. n/N (%)	Hosp. n/N (%)	Comm. n/N (%)	Hosp. n/N (%)	Comm. n/N (%)	Hosp. n/N (%)	Comm. n/N (%)	Hosp. n/N (%)	Comm. n/N (%)	Hosp. n/N (%)
<i>S. aureus</i>	130/784 (16.6)	32/160 (20)	723/784 (92.2)	142/160 (88.8)	464/784 (59.2)	94/160 (58.8)	68/784 (8.7)	10/160 (6.3)	159/784 (20.3)	56/160 (35)	96/784 (12.2)	23/160 (14.4)
MRSA	130/130 (100)	32/32 (100)	130/130 (100)	32/32 (100)	112/130 (86.2)	28/32 (87.5)	38/130 (29.2)	8/32 (25)	58/130 (44.6)	21/32 (65.6)	53/130 (40.8)	17/32 (53.1)
MSSA	0/654 (0)	0/128 (0)	593/654 (90.7)	110/128 (85.9)	352/654 (53.8)	66/128 (51.6)	30/654 (4.6)	2/128 (1.6)	100/654 (15.3)	37/128 (28.9)	40/654 (6.1)	5/128 (3.9)
CNS	49/583 (8.4)	22/116 (19)	527/583 (90.4)	110/116 (94.8)	343/583 (58.8)	83/116 (71.6)	74/583 (12.7)	11/116 (9.5)	112/583 (19.2)	29/116 (25)	58/583 (9.9)	19/116 (16.4)
MRCNS	49/49 (100)	22/22 (100)	49/49 (100)	22/22 (100)	43/49 (87.8)	22/22 (100)	10/49 (20.4)	1/22 (4.5)	28/49 (57.1)	9/22 (40.9)	17/49 (34.7)	9/22 (40.9)
MSCNS	0/534 (0)	0/94 (0)	478/534 (89.5)	88/94 (93.6)	300/534 (56.2)	61/94 (64.9)	64/534 (12)	10/94 (10.6)	82/534 (15.4)	20/94 (21.3)	41/534 (7.7)	11/94 (11.7)
<i>S. pneumoniae</i>	14/55 (25.5)	7/9 (77.8)	5/55 (9.1)	1/9 (11.1)	35/55 (63.6)	7/9 (77.8)	21/55 (38.2)	2/9 (22.2)	24/55 (43.6)	3/9 (33.3)	0/55 (0)	0/9 (0)
<i>S. agalactiae</i>	-	-	0/139 (0)	0/11 (0)	45/139 (32.4)	2/11 (18.2)	30/139 (21.6)	1/11 (9.1)	101/139 (72.7)	8/11 (72.7)	45/139 (32.4)	4/11 (36.4)
<i>S. pyogenes</i>	-	-	0/238 (0)	0/26 (0)	104/238 (43.7)	12/26 (46.2)	40/238 (16.8)	7/26 (26.9)	79/238 (33.2)	10/26 (38.5)	51/238 (21.4)	6/26 (23.1)

MRSA – methicillin-resistant *S. aureus*; MSSA – methicillin-susceptible *S. aureus*; CNS – coagulase-negative staphylococci; MRCNS – methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci; MSCNS – methicillin-susceptible coagulase-negative staphylococci

**Table 2.** The frequency of macrolide-lincosamide-streptogramin resistance phenotypes among community- and hospital-acquired staphylococci isolates

Phenotypes	MRSA			MSSA			MRCNS			MSCNS		
	Comm. n (%)	Hosp. n (%)	p	Comm. n (%)	Hosp. n (%)	p	Comm. n (%)	Hosp. n (%)	p	Comm. n (%)	Hosp. n (%)	p
Er/Cli S	16 (12.3)	3 (9.4)	0.768	299 (45.7)	62 (48.4)	0.628	6 (12.2)	0 (0)	0.167	225 (42.1)	32 (34)	0.172
cMLSb	36 (27.7)	7 (21.9)	0.656	27 (4.1)	2 (1.6)	0.205	10 (20.4)	1 (4.5)	0.154	55 (10.3)	9 (9.6)	1.00
M/MSb	16 (12.3)	10 (31.3)	0.014	91 (13.9)	24 (18.8)	0.172	13 (26.5)	10 (45.5)	0.169	98 (18.4)	27 (28.7)	0.024
iMLSb	60 (46.2)	11 (34.4)	0.242	234 (35.8)	40 (31.3)	0.362	20 (40.8)	11 (50)	0.605	147 (27.5)	25 (26.6)	0.900
LSa/b	2 (1.5)	1 (3.1)	0.485	3 (0.5)	0 (0)	1.00	0 (0)	0 (0)	1.00	9 (1.7)	1 (1.1)	1.00
Total	130 (100)	32 (100)		654 (100)	128 (100)		49 (100)	22 (100)		534 (100)	94 (100)	

MRSA – methicillin-resistant *S. aureus*; MSSA – methicillin-susceptible *S. aureus*; MRCNS – methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci; MSCNS – methicillin-susceptible coagulase-negative staphylococci; Er/Cli S – susceptibility to erythromycin and clindamycin; cMLSb – constitutive resistance to macrolide-lincosamide-streptogramin B; M/MSb – resistance to macrolide/macrolide-streptogramin B; iMLSb – inducible resistance to macrolide-lincosamide-streptogramin B; LSa/b – resistance to lincosamide-streptogramin A / streptogramin B

**Table 3.** The frequency of macrolide-lincosamide-streptogramin resistance phenotypes among community- and hospital-acquired streptococci isolates

Phenotypes	<i>S. pneumoniae</i>			<i>S. agalactiae</i>			<i>S. pyogenes</i>		
	Comm. n (%)	Hosp. n (%)	p	Comm. n (%)	Hosp. n (%)	p	Comm. n (%)	Hosp. n (%)	p
Er/Cli S	20 (36.4)	2 (22.2)	0.706	85 (61.2)	9 (81.8)	0.211	134 (56.3)	14 (53.8)	0.837
cMLSb	21 (38.2)	2 (22.2)	0.469	21 (15.1)	1 (9.1)	1.00	40 (16.8)	7 (26.9)	0.276
M/MSb	9 (16.4)	3 (33.3)	0.351	18 (12.9)	1 (9.1)	1.00	45 (18.9)	5 (19.2)	1.00
iMLSb	5 (9.1)	2 (22.2)	0.253	6 (4.3)	0 (0)	1.00	19 (8)	0 (0)	0.232
LSa/b	0 (0)	0 (0)	1.00	9 (6.5)	0 (0)	1.00	0 (0)	0 (0)	1.00
Total	55 (100)	9 (100)		139 (100)	11 (100)		238 (100)	26 (100)	

Er/Cli S – susceptibility to erythromycin and clindamycin; cMLSb – constitutive resistance to macrolide-lincosamide-streptogramin B; M/MSb – resistance to macrolide/macrolide-streptogramin B; iMLSb – inducible resistance to macrolide-lincosamide-streptogramin B; LSa/b – resistance to lincosamide-streptogramin A / streptogramin B

was the most prevalent phenotype among *S. pneumoniae* from inpatient isolates, and among *S. pyogenes* from outpatient isolates.

There was no significant ( $p > 0.05$ ) difference between community- and hospital-acquired streptococci isolates in the frequency of MLS resistance phenotypes (Table 3). A comparison between *S. pneumoniae* and *S. agalactiae* showed a significant ( $p < 0.05$ ) difference among community-acquired isolates in the frequency of Er/Cli S and cMLSb phenotypes, and among hospital-acquired isolates in the frequency of Er/Cli S. A comparison between *S. pneumoniae* and *S. pyogenes* showed a significant ( $p < 0.05$ ) difference among community-acquired isolates in the frequency of Er/Cli S and cMLSb phenotypes (Table 3).

## DISCUSSION

Development of antimicrobial resistance in staphylococci and streptococci includes the emergence of multidrug-resistant bacteria. Initially, MRSA strains mainly caused hospital infections [10]. However, since about a decade ago, the number of community-acquired MRSA strains has significantly increased in a number of countries [10].

All of our staphylococcal and streptococcal isolates were susceptible to vancomycin and linezolid, and all of beta-hemolytic streptococcal isolates were susceptible to penicillin and ceftriaxone, similar to other researchers [11, 12, 13].

In our study, 20% (32/160) of hospital-associated and 16.6% (130/784) of community-associated *S. aureus* isolates were resistant to methicillin, with no significant

difference in prevalence between hospital and community MRSA strains. The prevalence of hospital-associated MRSA strains in Belgium, Bulgaria, and France based on 2015 surveillance data were similar to ours, whereas those in Romania, Malta, Portugal, Cyprus, and Greece were much higher (over 30%) [3]. Regarding coagulase-negative staphylococci, we found 8.4% (49/583) of community-acquired and 19% (22/116) of hospital-acquired MRCNS isolates, whereas other authors found higher percentage (62.2%) of MRCNS isolates among hospital strains [14].

In our study, all of MRSA and MRCNS isolates were resistant to penicillin, which was in accordance with a global report of antimicrobial susceptibility testing [10]. More than half of *Staphylococcus* isolates in our study were resistant to erythromycin, similar to global macrolide resistance rate in staphylococci [15]. We found that more than 85% of MRSA and MRCNS isolates showed significantly higher resistance to erythromycin than the MSSA and MSCNS isolates (about 55%). Similar data have been reported in other regions of Serbia and Greece [14, 16]. We found high prevalence of resistance to clindamycin, gentamicin, and ciprofloxacin among community- and hospital-associated MRSA and MRCNS isolates, and low among MSSA and MSCNS isolates, similar to other studies [11, 17]. We did not find a significant difference between community- and hospital-acquired *S. aureus* isolates in resistance to all antimicrobial agents, except to gentamicin (for both MRSA and MSSA isolates). In addition, among our CNS isolates, there were significantly more inpatient isolates resistant to cefoxitin and erythromycin than outpatient isolates. Both hospital- and community-acquired MRSA showed

higher resistance rates to all tested antimicrobial agents than MSSA isolates, and MRCNS showed higher resistance rates to all antibiotics than MSCNS isolates (except inpatient isolates to clindamycin), similar to a study conducted by Kim et al. [17]. However, Považan et al. [14] found extremely higher resistance rates to clindamycin, gentamicin, and ciprofloxacin among their hospital-acquired MRCNS strains (more than 70%) in relation to ours.

Generally, the iMLSb was the most frequent phenotype among methicillin-resistant (about 40%) and methicillin-susceptible staphylococci (about 30%) except outpatient MSCNS isolates, where the M/MSb phenotype was dominant (28.7%), similar to studies from different geographic locations [11, 18]. In Europe, there was a high prevalence (more than 80%) of the cMLSb phenotype in MRSA, whereas the iMLSb was dominant in MSSA isolates [15, 16]. In our study, there were no significant differences of prevalence of MLS phenotypes between inpatient and outpatient staphylococci isolates, except for M/MSb phenotype, which was significantly more prevalent in inpatient than in outpatient MRSA, and MSCNS isolates. Among all of MLS phenotypes, the rarest LSa/b was found in MRSA, MSSA, and MSCNS isolates, as well as in France and the Czech Republic [19, 20]. One of MSSA isolates was different from other LSa/b phenotypes by channel of sensitivity between clindamycin and erythromycin disc, and it looked like a “keyhole.” In South Korea, similar novel phenotype has been described in 46 of *S. agalactiae* isolates [5].

There were no significant differences between our community- and hospital-associated *S. pneumoniae* isolates in their resistance to antibiotics. Only a small percentage of our *S. pneumoniae* isolates showed resistance to penicillin (9.1%, 5/5 community- and 11.1%, 1/9 hospital-acquired), while Mladenović-Antić et al. [21] discovered higher resistance to penicillin (27%) in hospital-acquired pneumococci isolates in the first decade of this century in the Nišava region, Serbia. In our region, we discovered a very high resistance rate to erythromycin in *S. pneumoniae* (63.6%, 35/55 community- and 77.8%, 7/9 hospital-acquired isolates), which was in accordance with findings by Dinić et al. [22] (78.4% and 65.6%, respectively). However, Hadnađev et al. [23] and Mijač et al. [4] found lower rate of resistance to erythromycin in *S. pneumoniae* (36% and 45%, respectively) in their studies in Serbia. Some parts of Malta and Romania had similar prevalence rate of macrolide resistance among *S. pneumoniae* in 2012 and 2015 to our findings. Wide inter-country variations in the emergence of macrolide-resistant *S. pneumoniae* were recorded across Europe, with prevalence ranging from 0% to 74% in a period from 2012 to 2015 [3]. Also, a very high resistance rate to clindamycin among our community-associated strains of *S. pneumoniae* (38.2%, 21/55) was detected, while neither one of our *S. pneumoniae* isolates showed resistance to ciprofloxacin, which was similar to other researches from Serbia [22, 24].

In our region, cMLSb phenotype was the most prevalent (38.2%) of all *S. pneumoniae* isolates from outpatient samples, whereas the M/MSb (33.3%) was dominant among hospital-acquired isolates. Different from our findings, authors from the Nišava district and central and

northern parts of Serbia found that the dominant MLS resistance phenotype was cMLSb among hospital isolates of *S. pneumoniae*, but authors from Italy yielded results similar to our findings [22, 23, 25, 26].

There have been no *S. agalactiae* isolates resistant to penicillin and ceftriaxone in Italy either [13]. Our *S. agalactiae* isolates showed relatively high resistance rates to erythromycin (32.4%, 45/139 community- and 18.2%, 2/11 hospital-acquired) and clindamycin (21.6%, 30/139 community- and 9.1%, 1/11 hospital-acquired). In Italy, the same resistance to erythromycin (19%) was observed among *S. agalactiae* isolates as was the case in Spain, but the resistance to clindamycin was significantly higher (53%) [6, 13]. There was a similarity between our region and regions of the United States regarding resistance rate to erythromycin among *S. agalactiae* isolates (ranged from 38% to 41.9%) [27]. In our area, very high resistance rates to gentamicin (about 70%) and ciprofloxacin (about 30%) among both community- and hospital-associated *S. agalactiae* isolates were found.

The cMLSb resistance phenotype was dominant among *S. agalactiae* community-acquired strains, whereas the same proportions of cMLSb and M/MSb were found as the commonest resistance phenotype among hospital-acquired *S. agalactiae* isolates, consistent with other studies [13, 27]. We detected a small percentage of rare LSa/b resistance phenotype (6.5%, 9/139) among community-acquired *S. agalactiae* isolates, similar to another study [13]. Resistance rate to macrolides and lincosamides in *S. agalactiae* has been steadily increasing, although it varies greatly between regions [13].

We did not find a strain resistant to penicillin among *S. pyogenes* isolates, so it remains the first-line antibiotic in the treatment of *S. pyogenes* infections [28]. Very high resistance rates to erythromycin among our *S. pyogenes* (43.7%, 104/238 community- and 46.2%, 12/26 hospital-acquired) isolates were found, while the reported resistance rate to erythromycin among community-acquired *S. pyogenes* isolates in Serbia from 2004 to 2009 was only 19% [4]. Resistance rates to erythromycin, clindamycin, gentamicin, and ciprofloxacin among our *S. pyogenes* isolates were higher than in other parts of Serbia and some European countries [7, 29]. The very high resistance to erythromycin among our *S. pyogenes* isolates can be explained by uncontrolled and excessive consumption of total macrolides and long-acting macrolides (i.e. azithromycin) and other antibiotics in Southeast Serbia.

Dominance of the M/MSb phenotype among community-acquired *S. pyogenes* isolates observed in our study corresponds well with the results of many other studies [25, 28, 29]. In addition, cMLSb was the most common resistance phenotype among our hospital-associated *S. pyogenes* isolates. However, MLS phenotype is increasingly reported in Europe [7].

In general, the resistance rates to macrolides and lincosamides showed wide variations in bacterial species and geographical region. These variations were mostly developed because of differences in antimicrobial use, infection prevention, and infection control practices in different



regions. Monitoring the frequency of staphylococcal and streptococcal resistance to macrolides and lincosamides and various mechanisms of resistance at the local level is essential for determining empirical therapy. Physicians should consider local and regional resistance patterns when they choose an appropriate medication for the treatment of both inpatient and outpatient staphylococcal and streptococcal infections.

## CONCLUSION

This study is the first extensive report on macrolide and lincosamide resistance of common hospital- and community-associated staphylococcal and streptococcal isolates in Southeast Serbia. Our results indicated that there was a significant prevalence of the iMLSb resistance phenotype in all inpatient and outpatient staphylococcal isolates, and phenotypic triaging of all staphylococci is necessary in order to distinguish inducible resistance and truly clindamycin-susceptible isolates. The methicillin-resistant inpatient and outpatient staphylococci isolates were significantly

more resistant to penicillin, erythromycin, clindamycin, gentamicin, and ciprofloxacin than methicillin-sensitive ones. Our findings also indicate a very high resistance to macrolides in both inpatient and outpatient *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, and *S. agalactiae* isolates, which reached 77.8%, 46.2%, and 32.4%, respectively, so these antibiotics should not be recommended for empirical therapy of infection caused by these bacteria. Penicillins remain the drugs of choice for treatment of streptococcal infections in our local area. Because of constant changes of resistance rates to antibiotics, survey of the antibiotic usage and development of resistance is recommended.

## ACKNOWLEDGMENT

This study was supported by the Ministry of Science and Technology of the Republic of Serbia under grant No. III41010.

The findings in this study will also be a part of the doctoral thesis approved by the Senate of the University of Kragujevac.

## REFERENCES

- Lieberman JM. Appropriate antibiotic use and why it is important: the challenges of bacterial resistance. *Pediatr Infect Dis J*. 2003; 22(12):1143–51.
- Forbes BA, Sahm DF, Alice WS. *Staphylococcus, Micrococcus, and similar organisms in Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*. 11th Ed. St. Louis: Mosby; 2002; 285–92.
- European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2015. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Stockholm: ECDC; 2017.
- Mijac V, Opavski N, Markovic M, Gajic I, Vasiljevic Z, Sipetic T, et al. Trends in macrolide resistance of respiratory tract pathogens in the paediatric population in Serbia from 2004 to 2009. *Epidemiol Infect*. 2015; 143(3):648–52.
- Srinivasan U, Miller B, Debusscher J, Marrs CF, Zhang L, Seo YS, et al. Identification of a novel keyhole phenotype in double-disk diffusion assays of clindamycin-resistant erythromycin-sensitive strains of *Streptococcus agalactiae*. *Microb Drug Resist*. 2011; 17(1):121–4.
- Betriu C, Culebras E, Gómez M, Rodríguez-Avial I, Sánchez BA, Agreda MC, et al. Erythromycin and clindamycin resistance and telithromycin susceptibility in *Streptococcus agalactiae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003; 47(3):1112–4.
- Richter SS, Heilmann KP, Dohrn CL, Beekmann SE, Riahi F, Garcia-de-Lomas J, et al. Increasing telithromycin resistance among *Streptococcus pyogenes* in Europe. *J Antimicrob Chemother*. 2008; 61(3):603–11.
- Ruoff KL, Whitley RA, Beighton D. *Streptococcus*. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, editors. *Manual of clinical microbiology*. 7th ed. Washington: American Society for Microbiology; 1999. p. 283–696.
- Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. M100-S22, M2-7 and M-7. Wayne: Guidelines for *Streptococcus* spp,  $\beta$ -hemolytic group; 2012.
- WHO. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2014.
- Aleksandra AD, Misić MS, Mira ZV, Violeta NM, Dragana IT, Zoran BM, et al. Prevalence of inducible clindamycin resistance among community-associated staphylococcal isolates in central Serbia. *Indian J Med Microbiol*. 2014; 32(1):49–52.
- Gajic I, Mijac V, Ranin L, Anđelković D, Radičević M, Opavski N. Invasive isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Serbia: antimicrobial susceptibility and serotypes. *Srp Arh Celok Lek*. 2013; 141(1-2):48–53.
- Piccinelli G, Fernandes P, Bonfanti C, Caccuri F, Caruso A, De Francesco MA. In vitro activity of solithromycin against erythromycin-resistant *Streptococcus agalactiae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014; 58(3):1693–8.
- Považan A, Vukelić A, Karucin T, Hadnađev M, Milošević V, Gusman V. Non-susceptibility trends among methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci isolated from blood cultures. *Arch Biol Sci*. 2014; 66:79–86.
- Diekema DJ, Pfaller MA, Schmitz FJ, Smayevsky J, Bell J, Jones RN, et al. Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific Region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. *Clin Infect Dis*. 2001; 32:5114–32.
- Fokas S, Fokas S, Tsironi M, Kalkani M, Dionysopoulou M. Prevalence of inducible clindamycin resistance in macrolide-resistant *Staphylococcus* spp. *Clin Microbiol Infect*. 2005; 11(4):337–40.
- Kim HB, Jang HC, Nam HJ, Lee YS, Kim BS, Park WB, et al. In vitro activities of 28 antimicrobial agents against *Staphylococcus aureus* isolates from tertiary-care hospitals in Korea: a nationwide survey. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004; 48(4):1124–7.
- Hamilton-Miller JM, Shah S. Patterns of phenotypic resistance to the macrolide-lincosamide-ketolide-streptogramin group of antibiotics in staphylococci. *J Antimicrob Chemother*. 2000; 46(6):941–9.
- Tessé S, Trueba F, Berthet N, Hot C, Chesneau O. Resistance genes underlying the LSA phenotype of staphylococcal isolates from France. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013; 57(9):4543–6.
- Novotna G, Adamkova V, Janata J, Melter O, Spizek J. Prevalence of resistance mechanisms against macrolides and lincosamides in methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci in the Czech Republic and occurrence of an undefined mechanism of resistance to lincosamides. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; 49(8):3586–9.
- Mladenovic-Antic S, Kocic B, Stojanovic P, Ivic S, Mladenovic V. P743 antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* strains to penicillin and ceftriaxone, isolated in the Niš district, Romania during 1999-2006. *Int J Antimicrob Agents*. 2007; 29:S183.
- Dinic M, Mladenovic-Antic S, Kocic B, Stankovic-Djordjevic D, Vrbic M, Bogdanovic M. Susceptibility of respiratory isolates of *Streptococcus pneumoniae* isolated from children hospitalized in the Clinical center Nis. *Med Pregl*. 2016; 69(3-4):110–4.

23. Hadnađev M, Gajić I, Mijač V, Kurucin T, Považan A, Vulin A, et al. Phenotypes and genotypes of macrolide-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Serbia. Arch Biol Sci. 2014; 66:99–105.
24. Gajić I, Opavski N, Mijač V, Ranin L. Macrolide-resistant phenotypes of invasive *Streptococcus pneumoniae* isolates in Serbia. Arch Biol Sci. 2012; 64:1377–82.
25. Gajić I, Mijač V, Opavski N, Stanojević M, Lazarević I, Šmitran A, et al. Distribution of macrolide-resistant genes among isolates of macrolide resistant *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus pneumoniae* in Serbia. Arch Biol Sci. 2014; 66:93–8.
26. Monaco M, Camilli R, D'Ambrosio F, Del Grosso M, Pantosti A. Evolution of erythromycin resistance in *Streptococcus pneumoniae* in Italy. J Antimicrob Chemother. 2005; 55(2):256–9.
27. Borchardt SM, DeBusscher JH, Tallman PA, Manning SD, Marrs CF, Kurzynski TA, et al. Frequency of antimicrobial resistance among invasive and colonizing Group B streptococcal isolates. BMC Infect Dis. 2006; 6:57.
28. Pavlovic L, Grego E, Sipetic-Grujicic S. Prevalence of Macrolide Resistance in *Streptococcus pyogenes* Collected in Serbia. Jpn J Infect Dis. 2010; 63(4):275–6.
29. Opavski N, Gajic I, Borek AL, Obszańska K, Stanojevic M, Lazarevic I, et al. Molecular characterization of macrolide resistant *Streptococcus pyogenes* isolates from pharyngitis patients in Serbia. Infect Genet Evol. 2015; 33:246–52.

## Учесталост резистенције на макролиде и линкозамиде код амбулантних и болничких изолата стафилокока и стрептокока у југоисточној Србији

Милена Мишић<sup>1</sup>, Александра Арсовић<sup>2</sup>, Јелена Чукић<sup>3</sup>, Миленко И. Росић<sup>4</sup>, Јелена Тошић-Пајић<sup>5</sup>, Невена Манојловић<sup>5</sup>, Иван Чекеревац<sup>6,7</sup>, Дејан Видановић<sup>8</sup>, Миланко Шеклер<sup>8</sup>, Дејан Баскић<sup>3,9</sup>

<sup>1</sup>Завод за јавно здравље Врање, Одељење микробиологије, Врање, Србија;

<sup>2</sup>Универзитетска клиника за кардиоваскуларну хирургију Сремска Каменица, Институт за медицинску микробиологију и имунологију, Косовска Митровица, Србија;

<sup>3</sup>Институт за јавно здравље, Одсек за микробиологију, Лабораторија за вирусологију и имунологију, Крагујевац, Србија;

<sup>4</sup>Универзитетска клиника за кардиоваскуларну хирургију Сремска Каменица, Институт за кардиоваскуларне болести Војводине, Нови Сад, Србија;

<sup>5</sup>Универзитет у Крагујевцу, Факултет медицинских наука, докторске академске студије, Крагујевац, Србија;

<sup>6</sup>Универзитет у Крагујевцу, Факултет медицинских наука, Одељење интерне медицине, Крагујевац, Србија;

<sup>7</sup>Клинички центар Крагујевац, Клиника за пулмологију, Крагујевац, Србија;

<sup>8</sup>Специјализовани ветеринарски институт Краљево, Одељење за лабораторијску дијагностику, Национална референтна лабораторија за птичји грип и Њукасл болест живине Републике Србије, Краљево, Србија;

<sup>9</sup>Универзитет у Крагујевцу, Центар за молекуларну медицину и испитивање стем ћелија, Факултет медицинских наука, Одељење за микробиологију и имунологију, Крагујевац, Србија

### САЖЕТАК

**Увод/Циљ** Растућа резистенција на макролиде и линкозамиде код стафилокока и стрептокока је постала глобални проблем.

Циљ ове студије је био да истражи учесталост макролид-линкозамид-стрептограмин (МЛС) фенотипова резистенције код изолата стафилокока и стрептокока у југоисточној Србији.

**Метод** МЛС фенотипови били су утврђени дифузионом методом дуплог диска на 2.121 болничком и амбулантном изолату стафилокока и стрептокока прикупљеном током једногодишњег периода у Центру за микробиологију.

**Резултати** Изолати стафилокока резистентних на метицилин били су резистентнији на пеницилин, еритромицин, клиндамицин, гентамицин и ципрофлоксацин (100%, 100%, 29,2%, 65,6% и 53,1%, редом) него осетљиви на метицилин (93,6%,

64,9%, 12%, 28,9% и 11,7%, редом). Индуцибилни фенотип резистентан на клиндамицин је био доминантан код изолата *S. aureus* и стафилокока негативних на коагулазу. Изолати *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* и *S. agalactiae* показали су веома високу резистенцију на еритромицин (77,8%, 46,2% и 32,4%, редом). Сви изолати стафилокока и стрептокока били су осетљиви на ванкомицин и линезолид, а сви изолати бета-хемолитичких стрептокока на пеницилин и цефтриаксон.

**Закључак** Фенотипска тријажа стафилокока је неопходна да би се одвојили индуцибилно резистентни од изолата стварно осетљивих на клиндамицин. Макролиди се не препоручују за емпиријску терапију стрептококних инфекција. Пеницилин остаје лек избора за третман стафилококних инфекција у нашем округу.

**Кључне речи:** стафилококе; стрептококе; МЛС фенотипови резистенције; индуцибилна резистенција на клиндамицин