

IRENA CHOROSZY-KRÓL<sup>1</sup>, MAGDALENA FREJ-MĄDRZAK<sup>1</sup>, RENATA BEDNORZ<sup>3</sup>,  
DOROTA TERYKS-WOŁYNYEC<sup>2</sup>, ANNA BIJAK<sup>1</sup>

## Application of DIF and Nested-PCR Methods in Diagnostic of *Chlamydia trachomatis* in Urinary Tract in Children

### Zastosowanie metody DIF i *nested*-PCR w diagnostyce *Chlamydia trachomatis* układu moczowego u dzieci

<sup>1</sup> Zakład Nauk Podstawowych AM we Wrocławiu

<sup>2</sup> Katedra i Zakład Mikrobiologii AM we Wrocławiu

<sup>3</sup> Katedra i Klinika Nefrologii Pediatricznej AM we Wrocławiu

#### Streszczenie

**Wprowadzenie.** *Chlamydia trachomatis* (*C. trachomatis*) jest jednym z głównych czynników etiologicznych zakażeń układu moczowo-płciowego u dorosłych. Nie ma wyczerpujących danych na temat zakażeń chlamydiami układu moczowego u dzieci.

**Cel pracy.** Ocena przydatności metody *nested*-PCR do wykrywania DNA *C. trachomatis* w próbkach moczu oraz określenie korelacji częstości wykrywania antygenów chlamydii w wymazach z cewki moczowej metodą DIF.

**Materiał i metody.** Badaniem objęto wybraną grupę 38 spośród 195 pacjentów w wieku 6 miesięcy do 18 lat, w tym 24 dziewczynek i 14 chłopców, z dodatnimi wynikami badań wymazów z cewki moczowej w kierunku *C. trachomatis*. W wybranej grupie dzieci w osadzie moczu oznaczono DNA *C. trachomatis*. Badania bakteriologiczne przeprowadzono techniką immunofluorescencji bezpośredniej testem Pathfinder® *Chlamydia trachomatis* Direct Specimen, firmy BioRad. Badania genetyczne próbek moczu wykonano z użyciem zestawu diagnostycznego PCR-*Chlamydia trachomatis*, firmy DNA Gdańsk, który jest oparty na amplifikacji fragmentu genu *crp* (*cysteine rich protein*) *C. trachomatis* w układzie *nested*-PCR. Końcowy produkt o wielkości 199 par zasad uwidacznia się na żelu agarozowym w obecności bromku etydyny.

**Wyniki.** Dodatnie wyniki badań techniką PCR stwierdzono u 27/38 (71,0%) ogółu badanych, w tym u 10/14 (71,4%) chłopców i u 17/24 (70,8%) dziewczynek. Dodatnie wyniki badań testem DIF stwierdzono u 34/38 (89,4%) ogółu badanych, w tym u 13/14 (92,8%) chłopców i u 21/24 (87,5%) dziewczynek. Zgodność wyników badań w obu testach wynosiła 65,7%.

**Wnioski.** Nie u wszystkich dzieci zakażonych *C. trachomatis* w cewce moczowej stwierdza się DNA chlamydii w próbkach moczu. Z uwagi na pracochłonność i wysoki koszt badania technika *nested*-PCR ma ograniczone zastosowanie w rutynowej diagnostyce chlamydii. Technika PCR powinna być używana jako test z wyboru w przypadkach trudności interpretacji wyników badań innymi metodami, a także do weryfikacji wyników wątpliwych (*Adv Clin Exp Med* 2006, 15, 1, 53–58).

**Słowa kluczowe:** *Chlamydia trachomatis*, DIF, *nested*-PCR, zakażenia.

#### Abstract

**Background.** *Chlamydia trachomatis* (*C. trachomatis*) is one of the primary etiologic factors of urinary tract infections in adults. Data to the point chlamydial urinary tract infection in children are sparse.

**Objectives.** The aim of this study was to evaluate the usefulness of the *nested*-PCR method in the identification of DNA *C. trachomatis* in urine samples and qualification of correlation frequency the identification of chlamydial antigens in the swabs of urethra by DIF.

**Material and Methods.** The object of the study was group 38 from 195 patients, 24 girls and 14 boys aged since 6 month to 18 years, with positive results of research from swabs of urethra in the direction *C. trachomatis*. DNA *C. trachomatis* was detected in sediment of urine samples of research group. Bacteriological tests were taken by direct immunofluorescence method using Pathfinder® *Chlamydia trachomatis* Direct Specimen tests by BioRad.

Genetic research of urine samples was made by using diagnostic kit PCR-*Chlamydia trachomatis* by DNA Gdańsk, based on amplification fragment of gene *crp* (*cystein rich protein*) *C. trachomatis* in nested-PCR system. Final product 199bp was loaded in an agarose gel with ethidium bromide.

**Results.** Positive results research by using PCR was determined by 27/38 (71.0%) in the study group, in 10/14 (71.4%) boys and 17/24 (70.8%) girls. Positive results research by using PCR was determined DIF tests was determined by 34/38 (89.4%) overall, 13/14 (92.8%) boys and 21/24 (87.5%) girls. Conformity results research in both tests was amount to 65,7%.

**Conclusions.** In some cases we did not observed the correlation between positive results DIF from swabs of urethra and PCR from urine samples. Nested-PCR technique is expensive and labor-consuming method so PCR has limited employment in practice chlamydial diagnostics. There should be used nested-PCR in cases of difficulty interpretation results by other methods and verification doubtful tests (*Adv Clin Exp Med* 2006, 15, 1, 53–58).

**Key words:** *Chlamydia trachomatis*, DIF, Nested PCR, infections.

*Chlamydia trachomatis* (*C. trachomatis*) jest jedną z najbardziej rozpowszechnionych bakterii, zaliczanych do grupy przenoszonych drogą płciową (STD – *sexually transmitted disease*). Większość zakażeń *C. trachomatis* przebiega bezobjawowo, np. w Wielkiej Brytanii oszacowano, że w 1997 r. około 50% mężczyzn i 80% kobiet nie odczuwa żadnych dolegliwości z powodu zakażenia tym patogenem [1]. Bezobjawowy przebieg infekcji *C. trachomatis* skutkuje tym, że trudno jest ocenić liczbę zakażonych, a dane statystyczne liczone na podstawie wyników badań diagnostycznych obrazują tylko część zakażonych w danej populacji, która zgłosiła się na badania [2]. W USA odsetek ten jest szacowany na 3–5% kobiet zdrowych (bez objawów zakażenia), 20% pacjentek oddziałów ginekologicznych i 9% kobiet w ciąży. W Polsce niestety nie ma danych statystycznych na temat częstości występowania zakażenia *C. trachomatis* u kobiet i mężczyzn [3].

*C. trachomatis* występuje w 18 serotypach. Serotypy A, B, B<sub>a</sub> i C są czynnikiem etiologicznym jaglicy i nie są przenoszone drogą płciową. Ziarnica weneryczna pachwin, należąca do STD, jest wywoływana przez serotypy L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub>, L<sub>2a</sub> i L<sub>3</sub>. Serotypy D, Da, E, F, G, H, I, Ia J, K *C. trachomatis*, zwane również szczepami okulogenitalnymi, są przyczyną zakażeń dróg moczowo-płciowych oraz spojówek. W przypadku tych serotypów głównym sposobem przenoszenia jest kontakt płciowy. Obraz kliniczny zakażeń serotypami D–K różni się w zależności od płci i wieku pacjenta.

U mężczyzn *C. trachomatis* wywołuje zapalenie cewki moczowej, spojówek i odbytnicy, co może prowadzić do powikłań w postaci zapalenia najądrzy, gruczołu krokowego, reaktywnego zapalenia stawów i zespołu Reitera.

U kobiet zakażenie *C. trachomatis* może być przyczyną: zapalenia szyjki macicy, narządów miednicy małej (PID – *pelvic inflammatory disease*), spojówek i odbytnicy, a w następstwie – zapalenia jajowodów, zapaleń okołowyrostkowych, bezpłodności, poronień, ciąży ektopowej i przedwczesnych porodów.

U noworodków infekcja *C. trachomatis* głównie występuje jako zakażenie okołoporodowe i powoduje zapalenie spojówek, płuc, gardła, błony śluzowej nosa i ucha środkowego [4, 5]. U starszych dzieci, mających dolegliwości pochodzące z układu moczowo-płciowego, również wykrywa się *C. trachomatis* jako czynnik etiologiczny. Zakażenia w tej grupie trudno nazwać okołoporodowym ze względu na wiek chorych, a wywiad z rodziną wyklucza zakażenie drogą kontaktów płciowych, co z kolei sugeruje inny sposób zakażenia [6].

W diagnostyce *C. trachomatis* wykorzystuje się różne metody laboratoryjne, jak np.: cytologiczne testy detekcji wewnątrzkomórkowych wtęretów, hodowle komórkowe, testy immunoenzymatyczne (ELISA – *enzyme-linked immunosorbent assay*), testy immunofluorescencyjne (DIF – *direct immunofluorescent*) oraz metody genetyczne (NAAT – *nucleic acid amplification techniques*), do których zalicza się LCR (*ligase chain reaction*) i PCR (*polymerase chain reaction*) [7].

Ocenia się, że wśród wyżej wymienionych metod PCR charakteryzuje się największą czułością i swoistością [8].

Porównując DIF i PCR jako metody diagnostyczne, należy wziąć pod uwagę ich wady i zalety. Celem pracy była ocena przydatności metody Nested-PCR do wykrywania DNA *C. trachomatis* w próbkach moczu oraz określenie korelacji częstości wykrywania antygenów chlamydii w wymazach z cewki moczowej metodą DIF.

## Material i metody

Materiałem do badań w kierunku *C. trachomatis* były wymazy z cewki moczowej oraz mocz, pochodzące od 38 dzieci (24 dziewczynek i 14 chłopców) w wieku od 6 miesięcy do 18 lat hospitalizowanych na Oddziale Katedry i Kliniki Nefrologii Pediatricznej AM we Wrocławiu z rozpoznaniem: zakażenie dróg moczowych, wady układu moczowego, kamica, erytrocyturia i jałowa leukocyturia. Wymazy z cewki moczowej pobiera-

no przed rozpoczęciem antybiotykoterapii, za pomocą sterylnych cienkich wacików jednorazowego użytku z głębokości 1,5–2 cm przez lekarza pediatrę w sposób umożliwiający pobranie komórek nabłonka. Jednocześnie pobierano próbki moczu do pojemników jałowych (pierwszy strumień) zawierające śluz i komórki nabłonka w objętości 10 ml.

Do diagnostyki zakażeń chlamydialnych zostały użyte następujące techniki badawcze:

1) do badania antygenów *C. trachomatis* w wymazach z cewki moczowej metoda immunofluorescencji bezpośredniej (DIF) test Pathfinder® *Chlamydia trachomatis* Direct Specimen, firmy BioRad [8];

2) do badania DNA *C. trachomatis* w próbkach moczu metoda PCR, z użyciem zestawu do izolacji genomowego DNA Genomic Mini A&A Biotechnology. Wyizolowany DNA poddawano amplifikacji i detekcji za pomocą zestawu diagnostycznego PCR-Chlamydia trachomatis, firmy DNA Gdańsk, który opiera się na amplifikacji fragmentu genu *crp* (*cystein rich protein*) *C. trachomatis* w układzie nested-PCR. Nested-PCR polega na przeprowadzeniu dwóch reakcji PCR z dwoma różnymi parami primerów. Pierwsza to PCR *OUT*, w której powstaje produkt 318 par zasad, który jest matrycą do drugiej reakcji – PCR *IN*. Końcowy produkt ma wielkość 199 par zasad i uwidacznia się go na żelu agarozowym w obecności bromku etydyny.

## Izolacja DNA z moczu

Przed przystąpieniem do izolacji mocz odwirowywano przez 5 min przy 2,5 tys. obr./min. w temperaturze pokojowej. Uzyskany osad zawieszano w 200 µl H<sub>2</sub>O. Próbkę odwirowywano ponownie przez 10 min przy 2,5 tys. obr./min, a po odlaniu supernatantu osad zawieszano w 100 µl TE (10 mM Tris pH = 8,0; 1 mM EDTA) i przenoszono do próbki typu Eppendorf, następnie dodawano 200 µl buforu lizującego LT, znajdującego się w zestawie i 20 µl roztworu proteiny K. Mieszaninę inkubowano w temperaturze 37° C przez 20 min, a następnie próbki umieszczano w temperaturze 72°C na 5 min. Po 20 s worteksowania próbki wirowano przez 3 min przy 10–15 tys. obr./min. Uzyskany supernatant наносono na minikolumnę do oczyszczania genomowego DNA i wirowano przez 1 min przy 10–15 tys. obr./min. Następnie na minikolumnę наносono 500 µl roztworu płuczającego A<sub>1</sub> i całość ponownie wirowano przez minutę przy 10–15 tys. obr./min. Minikolumnę przenoszono do nowej próbki o pojemności 2 ml, dodawano 400 µl roztworu płuczającego

A<sub>1</sub> i wirowano przez 2 min przy 10–15 tys. obr./min. Osuszoną minikolumnę, umieszczono w nowej próbce o pojemności 1,5 ml, a następnie do niej dodawano 200 µl buforu TRIS (10 mM TRIS. HCl; pH 8,5) uprzednio ogrzanego do temperatury 75°C. Po 5 min inkubacji w temperaturze pokojowej minikolumny ostatni raz wirowano przez minutę przy 10–15 tys. obr./min. Oczyszczone DNA wykorzystywano w reakcjach PCR. Mieszanina reakcyjna PCR *OUT* składała się z 42,0 µl master mix PCR *OUT*, 4,0 µl mieszaniny dNTPs, 3,0 µl oczyszczonego DNA i 1,0 µl polimerazy termostabilnej Delta2. W kontroli pozytywnej zamiast wyizolowanego DNA wykorzystywano 3,0 µl DNA kontroli pozytywnej z zestawu. Amplifikację prowadzono w następujących warunkach:

- wstępna denaturacja – 2 min, 94°C,
- denaturacja – 30 s, 94°C, 35 powtórzeń,
- dołączanie primerów – 1 min, 50°C,
- elongacja – 1 min, 72°C,
- wydłużanie końcowe – 5 min, 72°C.

Amplifikację prowadzono w termocyklerze z pokrywą grzejącą. Produkty PCR *OUT* o wielkości 318 par zasad były matrycą do reakcji PCR *IN*. Mieszaninę reakcyjną stanowiło 42,0 ml master mix PCR *IN*, 4,0 µl mieszaniny dNTPs, 3,0 µl produktu PCR *OUT* o wielkości 318 par zasad, 1,0 µl polimerazy termostabilnej Delta2. W kontroli pozytywnej wykorzystywano 3,0 µl DNA produktu PCR *OUT* kontroli pozytywnej z zestawu otrzymanego we wstępnej amplifikacji. Reakcję PCR *IN* prowadzono w takich samych warunkach jak PCR *OUT*. Końcową detekcję produktów amplifikacji przeprowadzono na 2% żelu agarozowym w standardowych warunkach elektroforezy. Próbkę badaną zawierały 10,0 µl mieszaniny reakcyjnej PCR i 3,0 µl barwnika, podobnie jak kontrola pozytywna (10,0 µl mieszaniny reakcyjnej PCR kontroli pozytywnej z zestawu i 3,0 µl barwnika). Do identyfikacji produktów amplifikacji używano 10,0 µl markera DNA M100–500 z dodatkiem 2,0 µl barwnika.

## Wyniki

Za pomocą polimerazowej reakcji łańcuchowej – test PCR i metody immunofluorescencji bezpośredniej – test (DIF) badano 38 wymazów z cewki moczowej i próbek moczu. Wyniki badań przedstawiono w 2 tabelach i na 2 rycinach. W tabeli 1 przedstawiono dodatkowo wyniki badań w kierunku *C. trachomatis* metodą PCR i DIF. Technika PCR dodatkowo wyniki badań stwierdzono u 27/38 (71,0%) ogółu badanych, w tym u 10/14 (71,4%) chłopców i u 17/24 (70,8%) dziewczy-

**Tabela 1.** Dodatkowo wyniki badań w kierunku *C. trachomatis* metodą PCR i testem DIF

**Table 1.** Positive results of PCR and DIF for *C. trachomatis*

Metody (Methods)	Liczba i % wyników dodatnich (Number of positive results (%) among)	
Płeć (Sex)	Dziewczynki (Girls) n = 24	Chłopcy (Boys) n = 14
PCR n %	17 (70,8)	10 (71,4)
DIF n %	21 (87,5)	13 (92,8)

**Tabela 2.** Porównanie wyników badań w kierunku *C. trachomatis* uzyskanych techniką DIF i PCR

**Table 2.** The comparison of DIF and PCR results of testing for *C. trachomatis*

Liczba badanych (Numbers of tested)	Wyniki testu (Results of test)			
	dodatnie (positive)	ujemne (negative)	niezgodne (discrepancy)	
	DIF + PCR +	DIF – PCR –	DIF + PCR –	DIF – PCR +
38 n %	24 (63,1)	1 (2,6)	10 (26,3)	3 (7,8)

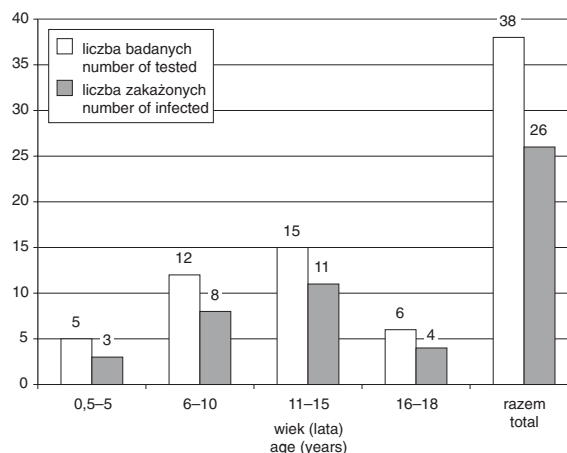
nek. Testem DIF dodatnie wyniki badań stwierdzono u 34/38 (89,4%) ogółu badanych, w tym u 13/14 (92,8%) chłopców i u 21/24 (87,5%) dziewczynek.

Porównanie wyników badań diagnostycznych uzyskanych w testach PCR i DIF u 38 pacjentów ilustruje tabela 2; w obu testach wyniki zgodne uzyskano w 65,7%, w tym zgodnie dodatnie u 63,1% ogółu badanych, a zgodnie ujemne u 2,6%. Wyniki niezgodne stanowiły 34,1%.

Na rycinie 1 przedstawiono częstość zakażeń *C. trachomatis* wśród dzieci w różnym wieku. Obecność *C. trachomatis* stwierdzono u 3 spośród 5 dzieci w wieku 6 miesięcy–5 lat, 8 spośród 12 dzieci w wieku 6–10 lat, 11 spośród 15 dzieci w wieku 11–15 lat i 4 spośród 6 dzieci w wieku 16–18 lat. Najwyższy odsetek zakażonych 73,3% stwierdzono u dzieci w grupie wiekowej 11–15 lat.

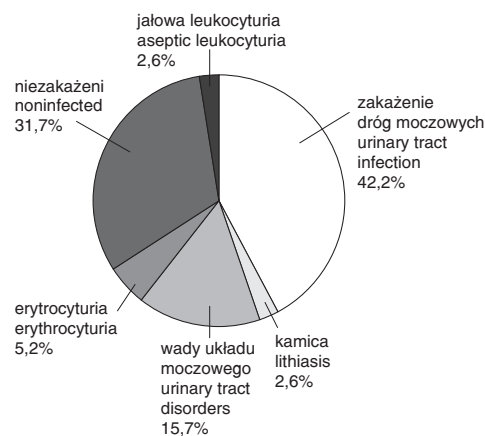
Na rycinie 2 przedstawiono analizę danych klinicznych dzieci z dodatnim wynikiem badań w kierunku *C. trachomatis*. Chlamydie wykryto u 42,2% dzieci z zakażeniem dróg moczowych, u 15,7% z wadami układu moczowego, u 2,6% z kamicą, u 5,2% z erytrocyturią i u 2,6% z jałową leukocyturią.

Wysoki odsetek zakażonych wynika z tego, że badania porównawcze technik PCR i DIF przeprowadzono na wybranej grupie pacjentów (38 spośród 195 badanych) z dodatnim wynikiem



**Ryc. 1.** Częstość zakażeń *C. trachomatis* wśród dzieci w różnym wieku

**Fig. 1.** The prevalence of *C. trachomatis* in children at different age group



**Ryc. 2.** Dane kliniczne dzieci z dodatnim wynikiem badań w kierunku *C. trachomatis* metodą PCR

**Fig. 2.** Clinical data of children with *C. trachomatis* positive PCR results

wymazów z cewki moczowej. W rzeczywistości odnosząc wyniki badań własnych do ogólnej liczby badanych, technika DIF pozwoliła wykryć zakażenia chlamydiami u 19,4% dzieci, a PCR u 13,8%.

## Omówienie

DIF jest metodą użyteczną w badaniach przesiewowych ze względu na szybkość i prostotę procedury [10]. Niezadowalająca jest jednak jej czułość (40–95%) przy swoistości < 95% [1]. Ponadto DIF może dawać reakcje krzyżowe z bakteriami Gram-ujemnymi, co wpływa na wzrost liczby fałszywie dodatnich wyników [7].

PCR jest uznawana za najlepszą metodę ze względu na wysoką czułość > 90%, a także swoistość > 99% [1]. Nie bez znaczenia pozostaje koszt

tej metody i dlatego jest polecana jako badanie weryfikujące wyniki.

Santos et al. [7], porównując metody PCR i DIF, w których wykorzystywano wymazy z szyjki macicy, uzyskali następujące wskaźniki wyników: dodatnie wyniki metodą DIF u 27,1%, a metodą PCR u 20,7%. Jak opisano, rozbieżność wyników badań uzyskanych za pomocą tych dwóch metod diagnostycznych może wynikać z niższej swoistości DIF w porównaniu z PCR.

W badaniach własnych również uzyskano podobny odsetek wyników przy porównywaniu obu technik: metodą DIF *C. trachomatis* stwierdzono u 19,4% badanych dzieci, a techniką PCR u 13,8% ogółu badanych. Chociaż chlamydie częściej stwierdzano metodą DIF, to nie można tu wykluczyć wyników fałszywie dodatnich, spowodowanych reakcjami krzyżowymi z patogenami innych drobnoustrojów albo też, że fluoryzujące artefakty uznano za ciała elementarne chlamydii.

Meglič et al. [4], badając próbki moczu dzieci i młodzieży z niekłębuszkową mikrohematurią, DNA *C. trachomatis* wykryli u 68% (25/37) badanych za pomocą metody PCR, a tylko u 43% (16/37) pacjentów za pomocą DIF.

W badaniach własnych analiza wyników porównawczych przeprowadzonych na wyselekcjonowanym materiale 38 pacjentów wykazała, że techniką PCR DNA *C. trachomatis* stwierdzono u 71,0% dzieci, a metodą DIF u 89,4%.

Lobzin et al., badając wszystkie typy chlamydioz układu moczowo-płciowego u młodych ludzi (18–32 lat), wykorzystywali różne metody: PCR, metody hodowlane, DIF, immunofluorescencję pośrednią, EIA, komplementarne wiązanie dopełniacza i mikroskopię elektronową. Chlamydiozy układu moczowo-płciowego wykryto w 24,6% przypadków, w tym aż 76,4% były powiązane z innymi infekcjami przenoszonymi drogą płciową. Nie podano jednak szczegółowych danych dotyczących pojedynczych metod oraz odsetka wyników dodatnich, porównując poszczególne techniki [11].

Metoda PCR została także wykorzystana w badaniach prowadzonych przez Mikalauskasa

et al. [12] na Litwie. DNA *C. trachomatis* wykryli u 15,9% (416/2616) badanych, nie porównywali jednak wyników dodatnich otrzymanych metodą PCR z metodą DIF. Trudno jest więc odnieść te dane do wyżej wymienionych.

Nocales et al. [13], stosując technikę PCR COBAS Amplicor CT System (Roche Molecular System), zbadali grupę 3136 pacjentów, u 139 stwierdzili DNA *C. trachomatis*, co stanowi 4,4%, a objawy chorobowe ujawniły się u 5,7% spośród 139. Autorzy uważają, że wymazy z odbytu u osób z grupy wysokiego ryzyka, jako materiał diagnostyczny, są lepsze od wymazów z cewki czy szyjki macicy. Nie zastosowano jednak metody DIF jako techniki, która mogłaby zweryfikować otrzymane wyniki.

Technika *nested*-PCR jest polecana jako test z wyboru w przypadkach trudności interpretacji wyników badań wykonywanych innymi metodami, a także do weryfikacji wyników wątpliwych. Szerokie zastosowanie tej metody w rutynowej diagnostyce zakażeń chlamydiami może być ograniczone zarówno z uwagi na wysoki koszt badania, jak i konieczność wyposażenia laboratorium w specjalistyczny sprzęt i aparaturę.

Kontrowersje budzi też obecność *C. trachomatis* u dzieci. Panuje przekonanie, że bakterie te przenoszą się wyłącznie drogą kontaktów seksualnych. Nie można jednak wykluczyć także innych dróg przenoszenia tego drobnoustroju, np. wspólne ręczniki, woda, środki higieny osobistej – podobnie jak w przypadku niektórych chorób przenoszonych drogą płciową. Jeżeli wykluczy się nadużycia seksualne, to bardzo prawdopodobna wydaje się hipoteza, że do zakażenia dzieci doszło w okresie okołoporodowym (u rodziców tych dzieci stwierdzono antygen *C. trachomatis*). Patogen ten mógł przetrwać wiele lat w komórkach nabłonka, nie dając objawów klinicznych, a następnie w wyniku obniżonej odporności lub innych czynników, po latach mógł się uaktywnić i spowodować zmiany zapalne. Poznanie wszystkich złożonych sposobów rozprzestrzeniania się tych drobnoustrojów w środowisku, w populacji osób dorosłych, a szczególnie dzieci wymaga dalszych badań.

## Piśmiennictwo

- [1] Horner PJ, Caul EO: Wytyczne postępowania w zakażeniu dróg moczowo-płciowych przez *Chlamydia trachomatis*. Med Prakt 2003, 151–161.
- [2] Gaydos CA, Theodore M, Dalesio N, Wood BJ, Quinn TC: Comparison of three nucleic acid amplification tests for detection of *Chlamydia trachomatis* in urine specimens. J Clin Microbiol, 2004, 42, 3041–3045.
- [3] Kwiatkowska B, Filipowicz-Sosnowska A: Patogenność gatunków *Chlamydiae* z uwzględnieniem zapalenia stawów. Nowa Medycyna – Reumatologia IV, 12/1999.
- [4] Meglič A, Čavić M, Hren-Vencelj H, Tršinar B, Ravnik M: Chlamydial infection of the urinary tract in children and adolescents with hematuria. Pediatr Nephrol 2000, 15, 132–133.
- [5] Zdrodowska-Stefanow B, Ostaszewska I: *Chlamydia trachomatis* – zakażenia u ludzi. Volumed, Wrocław 2000.

- [6] **Choroszy-Król I, Bednorz R, Teryks-Wołyniec D, Apoznański W, Polak-Jonkisz D, Frej-Mądrzak M:** Zakażenia *Chlamydia trachomatis* u małych dzieci z wadami układu moczowego. *Adv Clin Exp Med.* 2005, 14, 247–250.
- [7] **Santos C, Teixeira F, Vicente A, Astolfi-Filho S:** Detection of *Chlamydia trachomatis* in endocervical smears of sexually active women in Manaus AM, Brazil, by PCR. *Br J Infect Dis* 2003, 7, 91–95.
- [8] **Schachter J:** DFA, EIA, PCR, LCR and other technologies: what tests should be used for diagnosis of chlamydia infections? *Immunol Invest* 1997, 26, 157–161.
- [9] Direct Antigen Detection System for the Identification of *Chlamydia trachomatis* in Direct Specimens. BioRad Pathfinder® *Chlamydia trachomatis* Direct Specimen. 2003.
- [10] **Hallsworth PG, Hefford C, Waddell RG, Gordon DL:** Comparison of antigen detection, polymerase chain reaction and culture for detection of *Chlamydia trachomatis* in genital infection. *Pathology* 1995, 27, 168–171.
- [11] **Lobzin Y, Poznyak A:** Diagnostics of *urogenital chlamydiosis* common forms in young people. *Clin Microbiol Infect* 2005, 11, Suppl. 2, 490.
- [12] **Mikalauskas R, Ambrasiene D:** Use of PCR in the diagnosis of transmitted infections in Lithuania. *Clin Microbiol Infect* 2005, 11, Suppl. 2, 698.
- [13] **Nocales C, Ramirez M, Pueyo I, Claro R, Martin-Mazuelos E:** Diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infection in a sexually transmitted disease clinic using polymerase chain in endocervical, urethral and rectal swab. *Clin Microbiol Infect* 2005, 11, Suppl. 2, 721.

### Adres do korespondencji:

Irena Choroszy-Król  
Zakład Nauk Podstawowych AM  
ul. Chałubińskiego 4  
50-368 Wrocław

Praca wpłynęła do Redakcji: 13.05.2005 r.

Po recenzji: 6.06.2005 r.

Zaakceptowano do druku: 6.06.2005 r.

Received: 13.05.2005

Revised: 6.06.2005

Accepted: 6.06.2005