



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Јелена Тошић Пајић

ДИЈАГНОСТИЧКЕ ПЕРФОРМАНСЕ И
ЕКОНОМСКИ АСПЕКТИ ТЕСТОВА ЗА ДЕТЕКЦИЈУ

Chlamydia-e trachomatis

Крагујевац, 2018.



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА



Јелена Тошић Пајић

ДИЈАГНОСТИЧКЕ ПЕРФОРМАНСЕ И
ЕКОНОМСКИ АСПЕКТИ ТЕСТОВА ЗА ДЕТЕКЦИЈУ

Chlamydia-e trachomatis

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

Ментор: доц. др. Марија Шорак

Крагујевац, 2018.

САДРЖАЈ

САДРЖАЈ	1
ЛИСТА СКРАЋЕНИЦА	7
1. УВОД.....	9
1.1. Основне карактеристике <i>C. trachomatis</i>	9
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
1.2. Патогенеза хламидијалне инфекције	15
1.2.1. Целуларни модел патогенезе.....	16
1.2.2. Имунолошки модел патогенезе.....	17
1.3. Епидемиолошки трендови хламидијалне инфекције.....	20
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
1.4. Клиничке манифестације и компликације хламидијалне инфекције.....	23
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
1.5. Тестови за дијагнозу хламидијалне инфекције	25
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 тест (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
1.6. Препоруке CDC и ECDC за дијагнозу акутне хламидијалне инфекције	34
2. ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ СТУДИЈЕ	35

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	37
3.1. Популација која се истражује	37
3.2. Узорковање	37
3.3. Скрининг тестови.....	39
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
3.4. Дијагностички тест RT-PCR	44
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
3.5. Економска анализа.....	48
3.6. Статистичка обрада података.....	49
4. РЕЗУЛТАТИ.....	52
4.1. Слагање резултата RT-PCR теста за детекцију <i>C. trachomatis</i> са резултатима добијеним употребом других дијагностичких тестова (DIF, VT, ELISA).....	52
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 теста	60
4.1.3.2. Слагање резултата RT-PCR теста за детекцију <i>C. trachomatis</i> са резултатима добијеним комбинацијом тестова – позитиван било који тест	64
4.2. Дијагностичка ефикасност тестова	68
4.2.1. Дијагностичка ефикасност појединачних тестова (DIF, VT, 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
4.3. ROC анализа серумског нивоа IgA и IgG антитела на хламидијални МOMP антиген.....	75
4.4. Економска анализа.....	82
5. ДИСКУСИЈА.....	87
6. ЗАКЉУЧЦИ	100
7. ЛИТЕРАТУРА.....	102

СПИСАК СЛИКА

Слика 1. 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
Слика 2. 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
Слика 3. 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
Слика 4. 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
Слика 5. 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
Слика 6 Тест директне имунофлуоресценције за квалитативно одређивање хламидијалних антигена – позитиван налаз.....	40
Слика 7 Брзи имунохорматографски тест за квалитативно одређивање хламидијалних антигена: А – позитиван налаз; Б – негативан налаз	41
Слика 8. Одређивање серумског нивоа антитела на хламидијални МOMP антиген (ELISA): Колона IgA, ред А - негативна контрола, ред В – позитивна контрола, ред С – Cut-off, 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
Слика 9. RT-PCR тест – квалитативно откривање ДНК <i>C. trachomatis</i> позитиван налаз – Ct вредност присутна на FAM каналу.....	47

СПИСАК ГРАФИКОНА

Графикон 1. Упоредни резултати тестова за детекцију <i>C. trachomatis</i>	52
Графикон 2. Слагање резултата RT-PCR теста за детекцију <i>C. trachomatis</i> са резултатима добијеним тестом директне имунофлуоресценције.....	54
Графикон 3. Слагање резултата RT-PCR теста за детекцију <i>C. trachomatis</i> са резултатима добијеним брзим тестом	55
Графикон 4. 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 МOMP антиген.....	57

Графикон 5. 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 МOMP антиген.....	58
Графикон 6. Слагање резултата RT-PCR теста за детекцију <i>C. trachomatis</i> са резултатима добијеним комбинацијом „позитивна два или више теста“.....	61
Графикон 7. Слагање резултата RT-PCR теста за детекцију <i>C. trachomatis</i> са резултатима добијеним комбинацијом „позитивна два или више теста“.....	63
Графикон 8. Слагање резултата RT-PCR теста за детекцију <i>C. trachomatis</i> са резултатима добијеним комбинацијом „позитиван било који тест“.....	65
Графикон 9. Слагање резултата RT-PCR теста за детекцију <i>C. trachomatis</i> са резултатима добијеним комбинацијом „позитиван било који тест“.....	67
Графикон 10. ROC крива серумског нивоа IgA антитела на хламидијални МOMP антиген	76
Графикон 11. ROC крива серумског нивоа IgG антитела на хламидијални МOMP антиген	78

СПИСАК ШЕМА

Шема 1. Сценарио дијагностике и лечења хламидијалне инфекције генитуроурнарног тракта у условима рутинске клиничке праксе у примарној здравственој заштити	48
---	----

СПИСАК ТАБЕЛА

Табела 1. Формуле за израчунавање параметара дијагностичке ефикасности.....	50
Табела 2. Слагање резултата RT-PCR теста за детекцију <i>C. trachomatis</i> са резултатима добијеним тестом директне имунофлуоресценције.....	55
Табела 3. Слагање резултата RT-PCR теста за детекцију <i>C. trachomatis</i> са резултатима добијеним брзим тестом	56
Табела 4. 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 МOMP антиген	58
Табела 5. 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 МOMP антиген	59
Табела 6. Слагање резултата RT-PCR теста за детекцију <i>C. trachomatis</i> са резултатима добијеним комбинацијом „позитивна два или више теста“.....	62
Табела 7. Слагање резултата RT-PCR теста за детекцију <i>C. trachomatis</i> са резултатима добијеним комбинацијом „позитивна два или више теста“.....	64

Табела 8. Слагање резултата RT-PCR теста за детекцију <i>C. trachomatis</i> са резултатима добијеним комбинацијом „позитивн било који тест“	66
Табела 9. Слагање резултата RT-PCR теста за детекцију <i>C. trachomatis</i> са резултатима добијеним комбинацијом „позитивн било који тест“	68
Табела 10. Дијагностичка ефикасност појединачних тестова (DIF, BT, ELISA) за детекцију <i>C. trachomatis</i>	69
Табела 11. Дијагностичка ефикасност комбинације тестова „позитивна два или више теста” за детекцију <i>C. trachomatis</i>	71
Табела 12. Дијагностичка ефикасност комбинације тестова "позитиван било кој тест" за детекцију <i>C. trachomatis</i>	73
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	75
Табела 14. Дијагностичка ефикасност IgA антитела на хламидијални МОМР антиген на основу Cut- off вредности препоручених од стране произвођача теста	77
Табела 15. Дијагностичка ефикасност IgA антитела на хламидијални МОМР антиген на основу Cut- off вредности дефинисаних ROC анализом.....	77
Табела 16. Дијагностичка ефикасност IgG антитела на хламидијални МОМР антиген на основу Cut- off вредности препоручених од стране произвођача теста.....	79
Табела 17. Дијагностичка ефикасност IgG антитела на хламидијални МОМР антиген на основу Cut- off вредности дефинисаних ROC анализом	79
Табела 18. Дијагностичка ефикасност IgA+IgG (позитивна оба теста) антитела на хламидијални МОМР антиген на основу Cut-off вредности препоручених од стране произвођача теста.....	80
Табела 19. Дијагностичка ефикасност IgA+IgG (позитивна оба теста) антитела на хламидијални МОМР антиген на основу Cut-off вредности дефинисаних ROC анализом .	80
Табела 20. Дијагностичка ефикасност IgA/IgG (позитиван било који тест) антитела на хламидијални МОМР антиген на основу Cut-off вредности препоручених од стране произвођача теста.....	81
Табела 21. Дијагностичка ефикасност IgA/IgG (позитиван било који тест) антитела на хламидијални МОМР антиген на основу Cut-off вредности дефинисаних ROC анализом .	81
Табела 22. Економска анализа.....	83
Табела 23. Анализа здравствених трошкова за иницијалну микробиолошку дијагностику и фармакотерапију циљне популације оболелих од генитоуринарне хламидијалне инфекције у Србији	86

ЛИСТА СКРАЋЕНИЦА

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

PorB	Порински протеин Б
PPV	Позитивна предиктивна вредост
RC1	Chlamydia cell реагенс
RMF	Течност за фиксирање
ROC	(Receiver Operating Characteristic Curve)
RT	Ретикуларно тело (<i>ог енī. Reticulate Body</i>)
RT PCR	Ланчана реакција полимеризације у реалном времену (<i>ог енī. Real Time Polimerase Chain Reaction</i>)
SDA	Изотермална амплификација заменом ланаца (<i>ог енī. strand displacement amplification</i>)
TARP	Транслосирајући актин регрутујући фосфопротеин (<i>ог енī. Translocated Aaactin-recruiting Phosphoprotein</i>)
TFI	Тубарни фактор инфертилитета
TMA	Транскрипцијом посредована амплификација (<i>ог енī. transcription-mediated amplification</i>)
TMB	Тетраметилбензидин
TTSS	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 μ m- 0,8 μ 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 (*og 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 (*og 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 (*og 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).

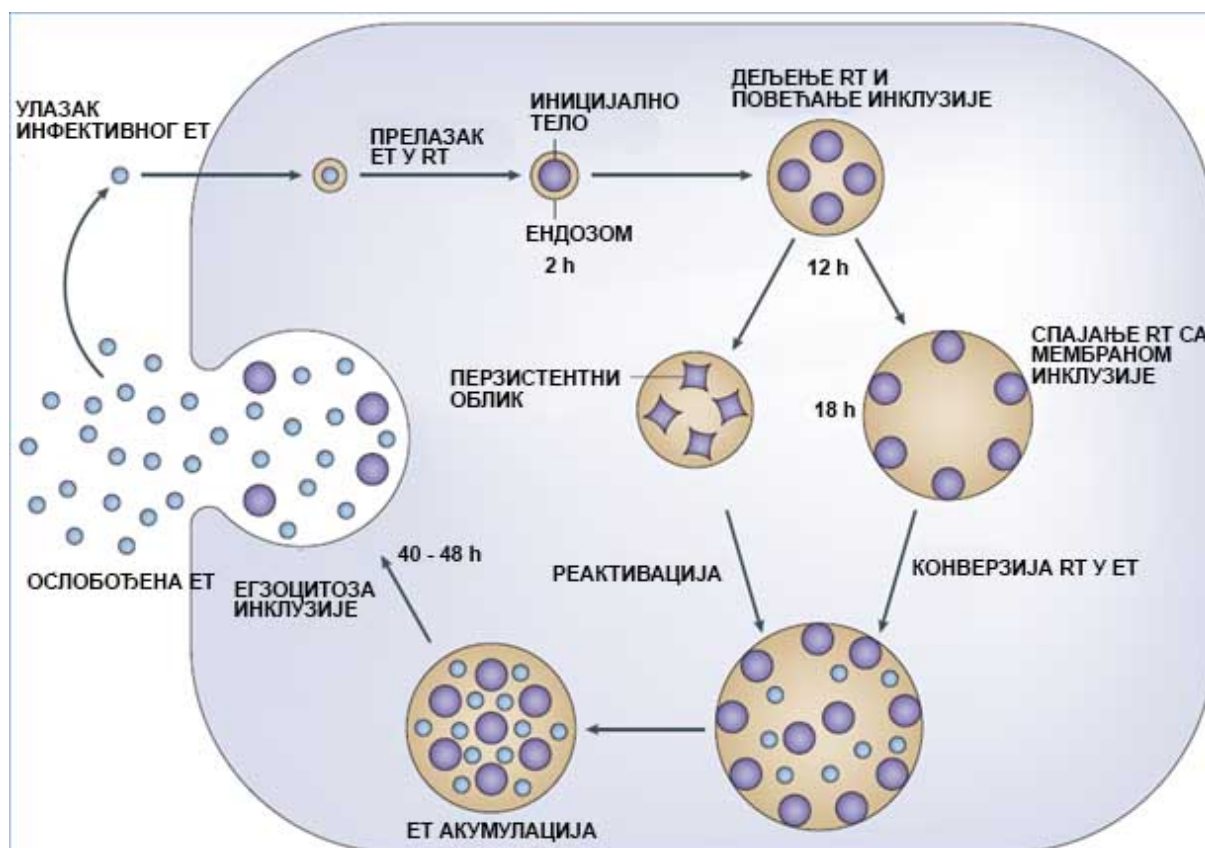
1.1.2. Класификација *C. Trachomatis* на биотипове и серотипове

На основу биолошких карактеристика, *C. Trachomatis* се дели на два биотипа и то на: трахомни и лимфогранулома венерум (LGV) (21). На основу антигенске разноврсности МОМР-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 МОМР (26), глукозаминогликан (*ог енl. Glicosaminoglycan – GAG*) (27), полиморфни мембрански протеин Д (*ог енl. 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. РТ се дели бинарном деобом на свака 2-3h, при чему долази до експанзије инклузија које могу садржати и до 1000 РТ (37). РТ 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- γ , излагање пеницилину или недостатак есенцијалних аминокиселина (40). Инхибиција интрацелуларног раста путем INF- γ постиже се исцрпљивањем триптофана, које настаје индукцијом триптофан-деградирајућег ензима, индол аминокиселине диоксигеназе. Услед недостатка триптофана долази или 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- γ . Као последица смањене продукције INF- γ 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).

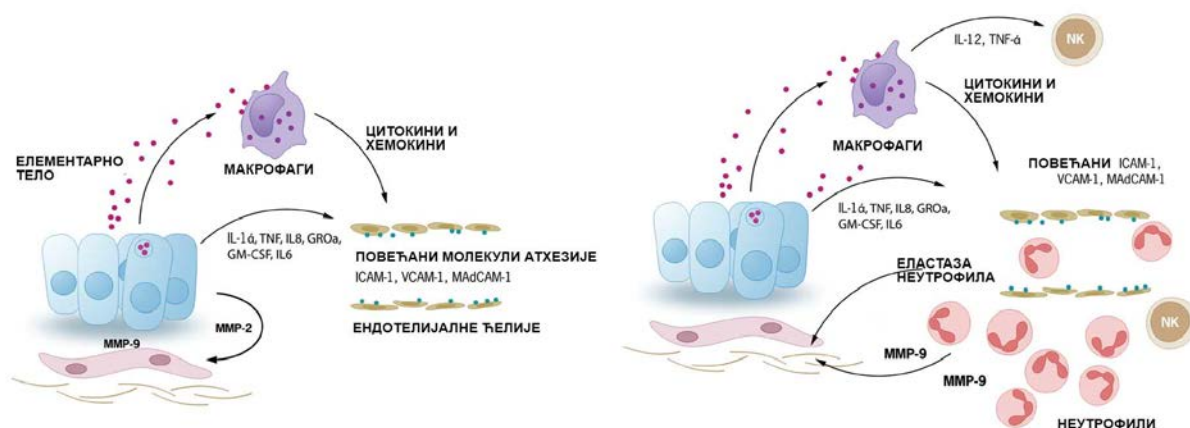
1.2. Патогенеза хламидијалне инфекције

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.

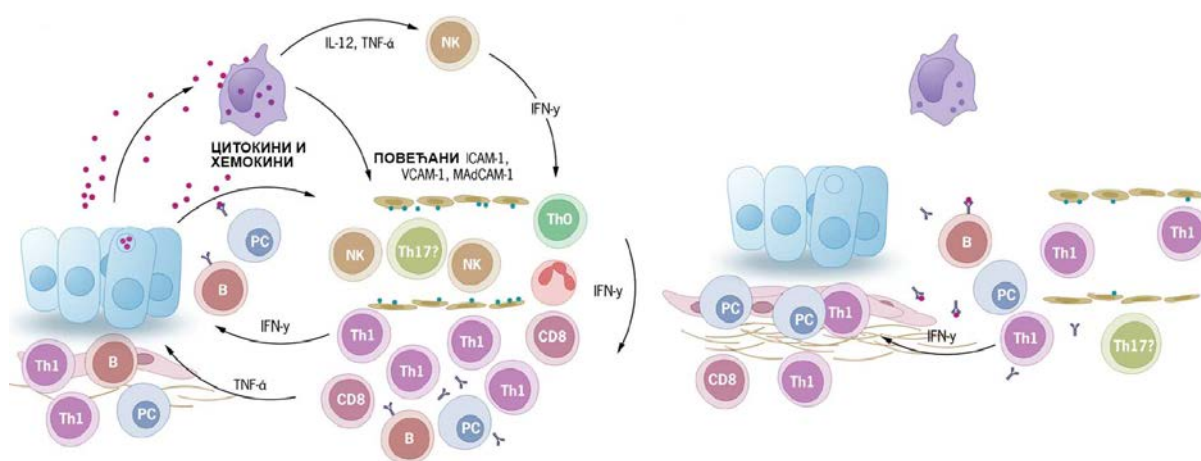


Слика 2. Целуларни модел патогенезе (Извор: Toni Darville, Thomas J. Hiltke. Pathogenesis of Genital Tract Disease Due to *C. trachomatis*. J Infect Dis. 2010;15;201 Suppl 2:S114-25.)

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.)

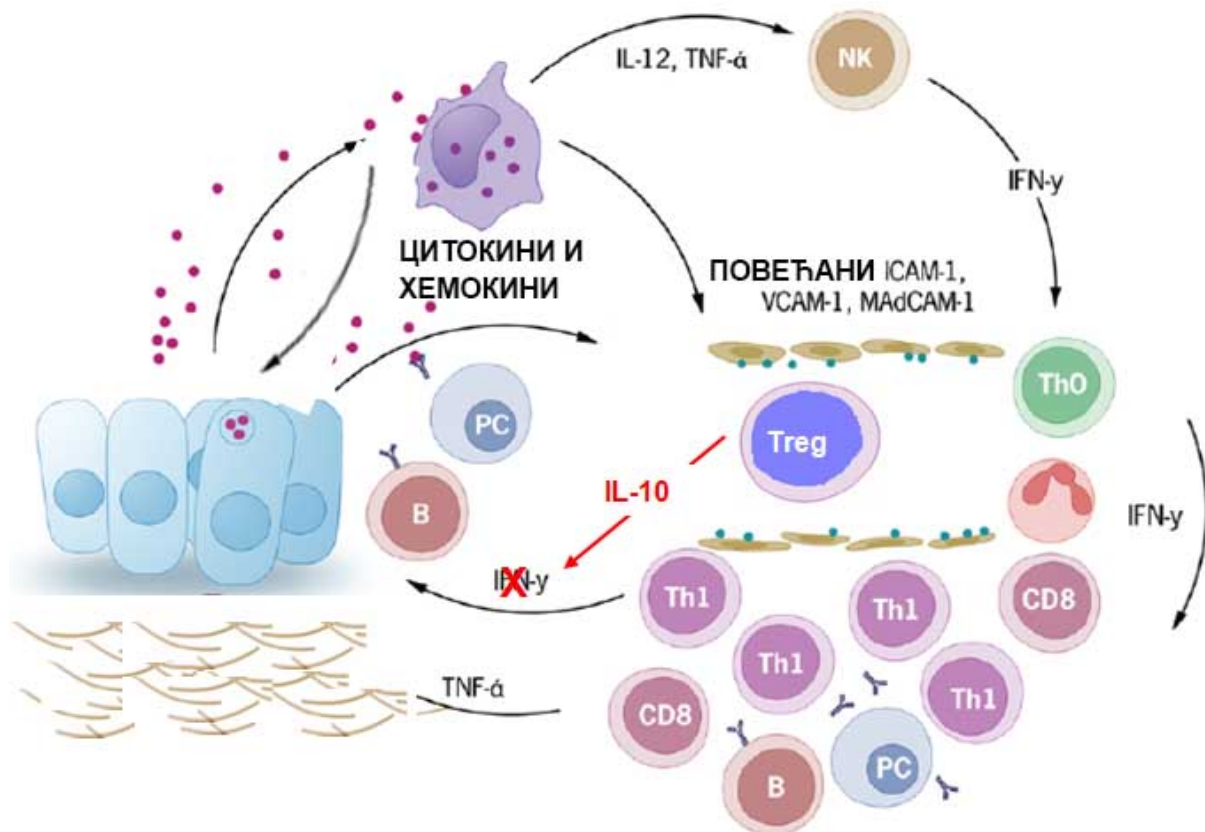
1.2.2. Имунолошки модел патогенезе

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 резулације 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⁺ лимфоцита који продукују INF- γ (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.)



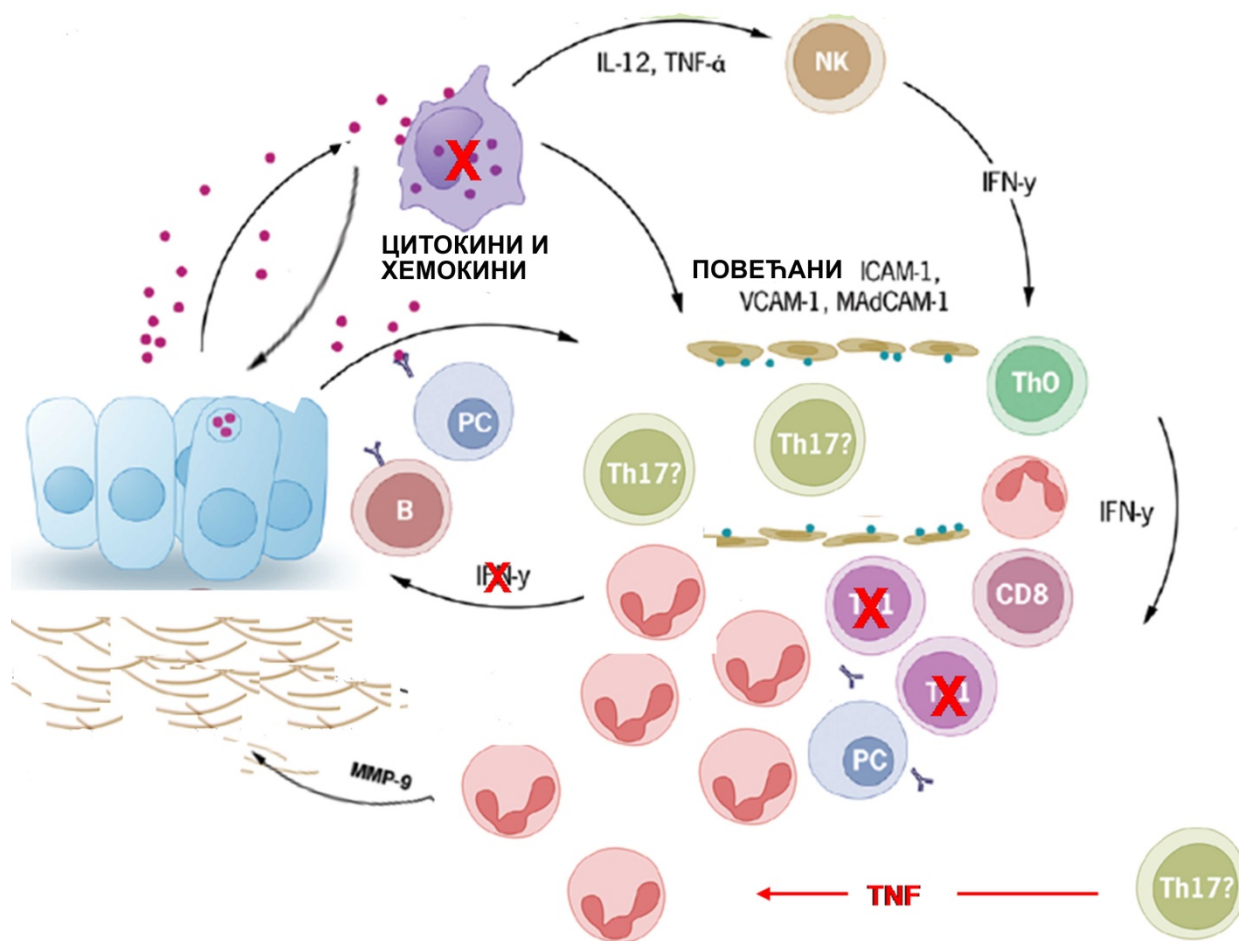
Слика 3. Имунолошки модел патогенезе Th1 (Извор: Toni Darville, Thomas J. Hiltke. Pathogenesis of Genital Tract Disease Due to *C. trachomatis*. J Infect Dis. 2010;15;201 Suppl 2:S114-25.)

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- γ 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 енл. 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 енл. 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 1 598 354 случајева, што значи да је стопа инфекције била 497,3 случајева на 100 000 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 358 489 на 396 128, 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 на 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 су 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

настанска 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 лабораторијских техника које се користе у детекцији инфекције. Услови транспорта и чувања узорка 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 2-3цм у мушку уретру и 1-2 цм у ендоцервикални канал, уз ротацију у циљу узимања довољно цилиндричних или кубоидалних епителних ћелија. Након узимања, узорци за културу би требало 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°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 МОМР (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 поравила вредности специфичности и квалитет флуоресценције, јер се MOMP подједнако распоређује по спољашњој мембрани *C. trachomatis*. Материјал за узорак се добија брисом или ендocerвикалном 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 ендocerвикалних 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. Детекција 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 плаزمида, 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 ендocerвикалним брисевима код жена, уретралним брисевима код мушкараца, и узорцим 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 имунофлуоресценција 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 теста (EIA) за квалитативно откривање хламидијалних антигена. Други брис смо замрзавали на -20° 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 испитаница 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° Целзијуса за накнадно одређивање серумских параметара хламидијалне инфекције (ЕЛИСА).

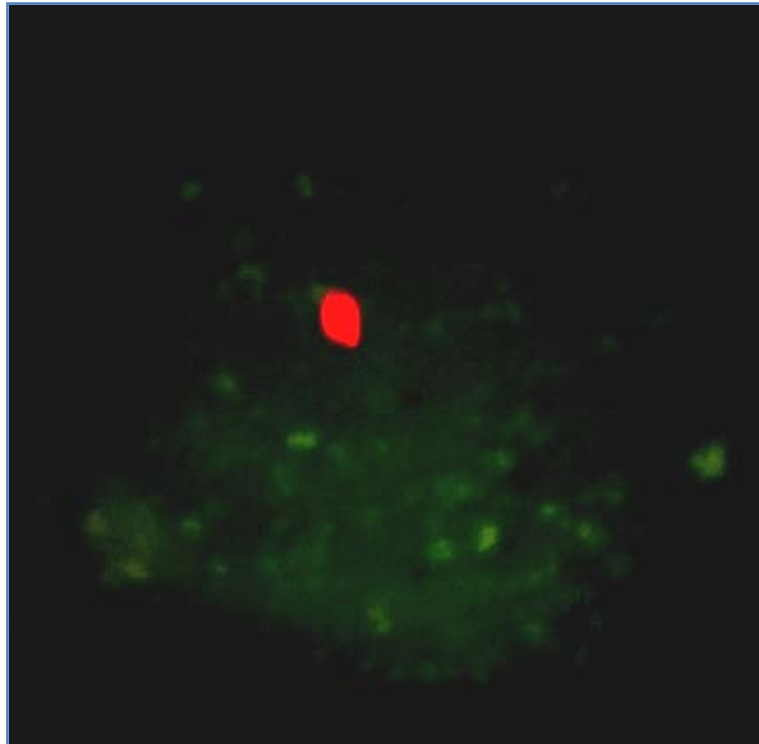
3.3. Скрининг тестови

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 антитела 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 епрувату 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-елуенцију. 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 *Cyclus 2* стадијума (60C), 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

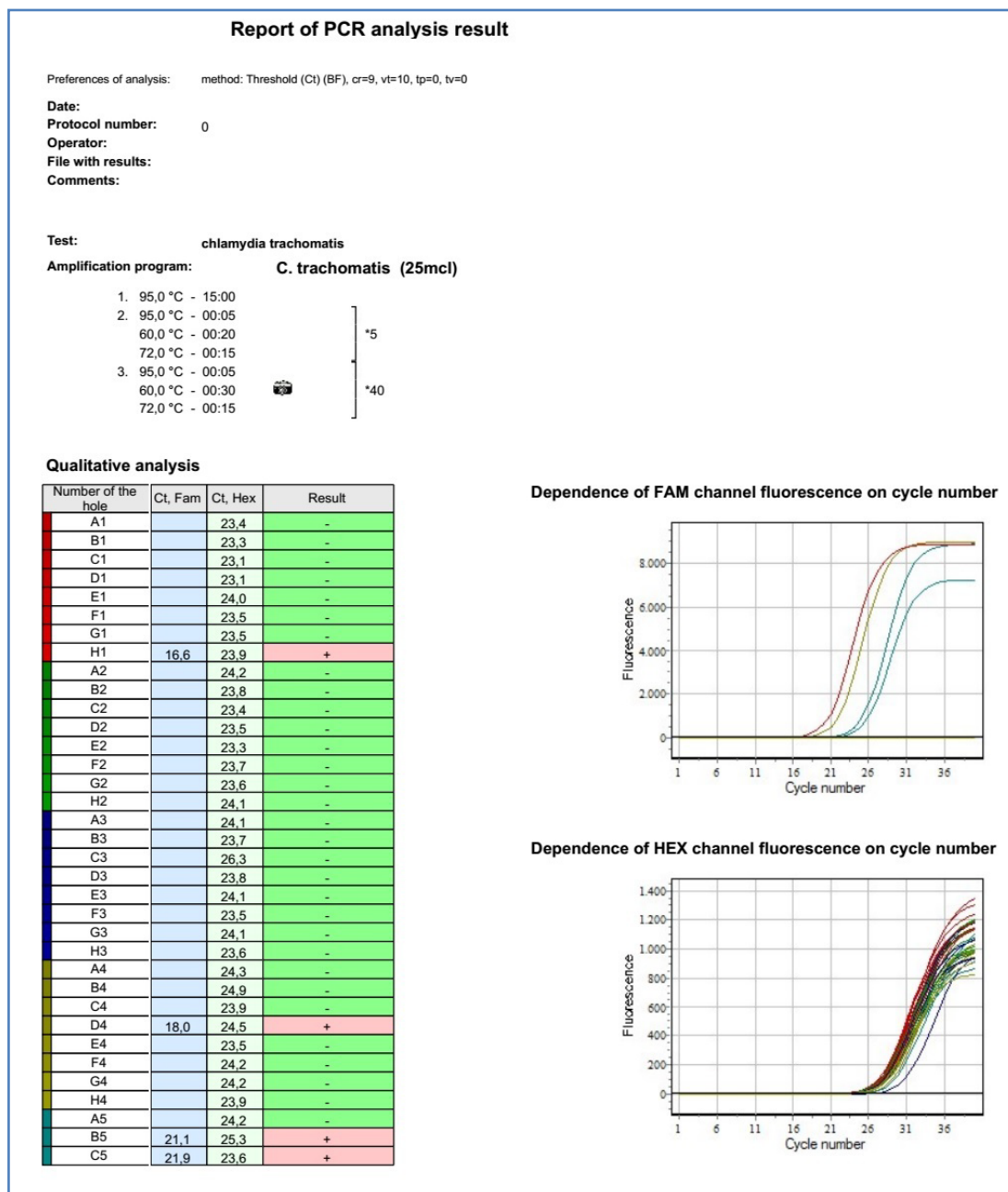
Резултати се интерпретирају помоћу софтвера инструмента путем укрштања или неукрштања криве флуоресценције и линије прага.

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 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.

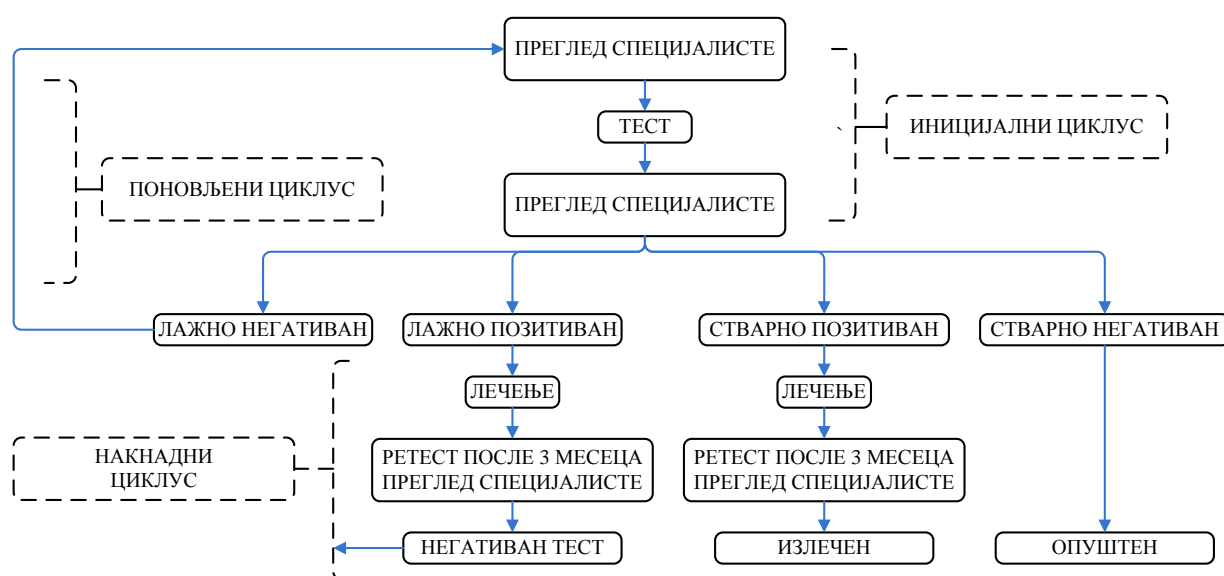
Резултат анализе се сматра поузданим, само ако су резултати позитивне и негативне контроле амплификације, као и негативне контроле екстракције, тачни.



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). 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	$\frac{a + d}{a + b + c + d}$

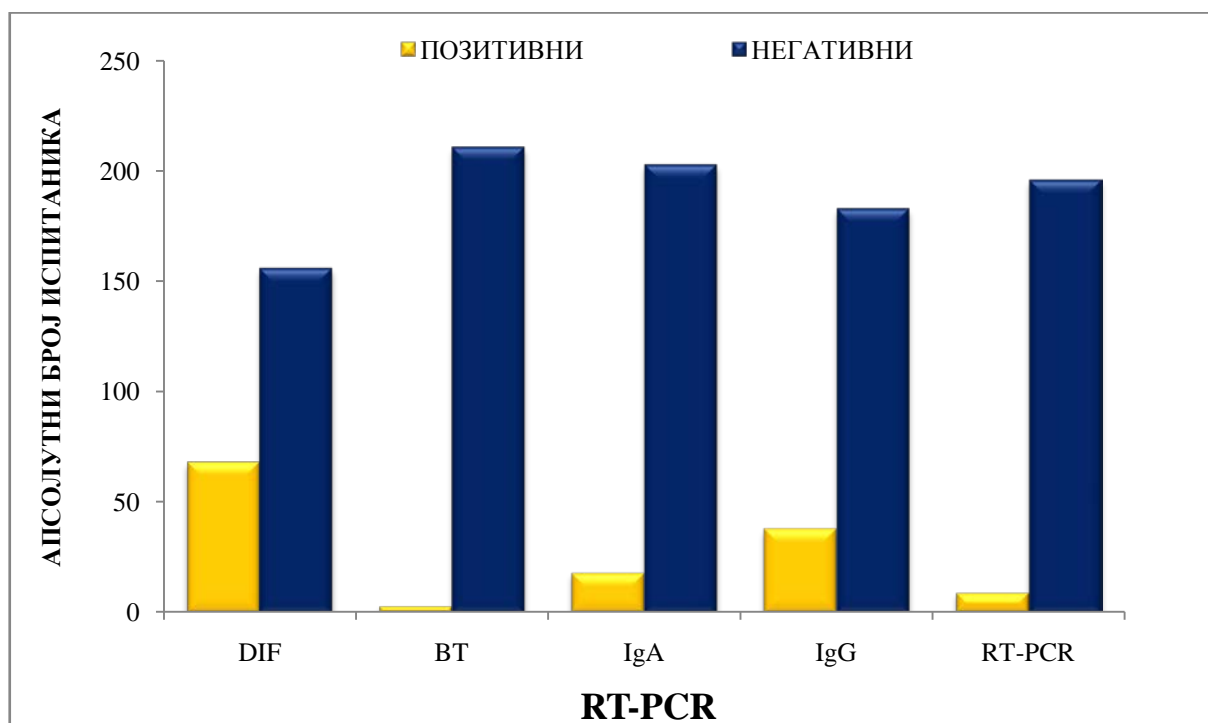
a – стварно позитивни; b – лажно негативни; c – лажно позитивни; d – стварно негативни

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*

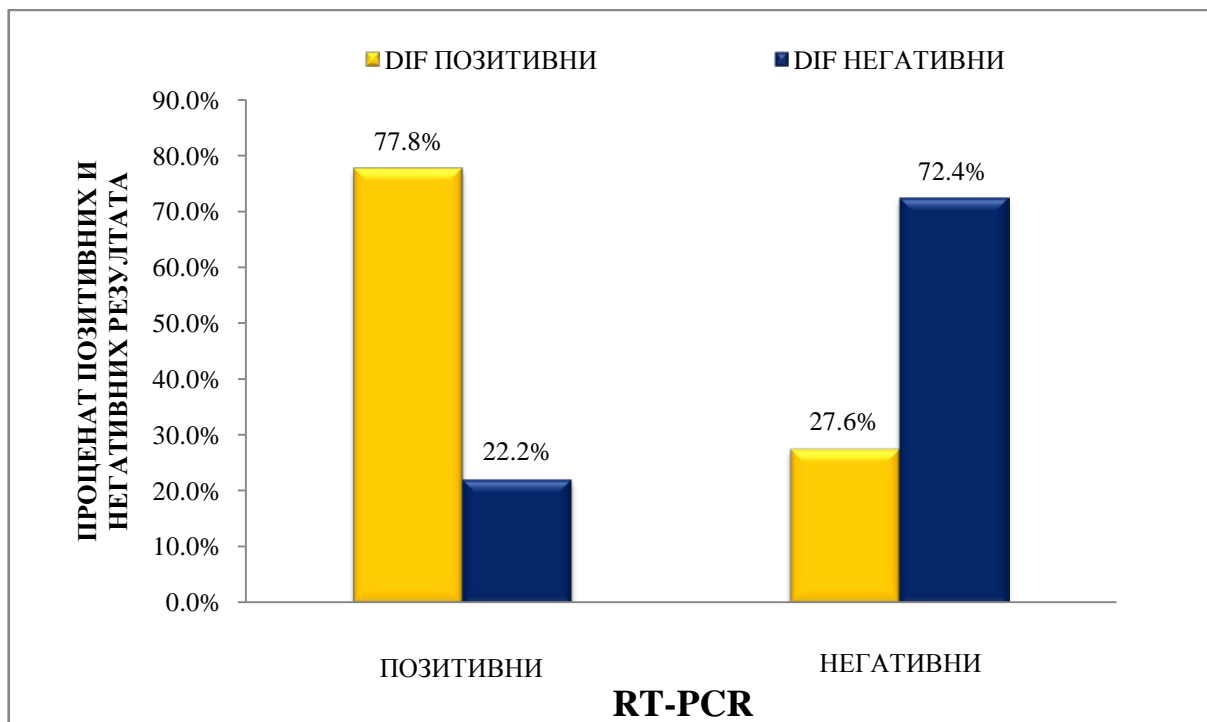
Тестом директне имунофлуоресценције одређивано је присуство антигена *C. trachomatis* у узорку испитаника. Од укупног броја испитаника који су укључени у студију применом ове методе хламидијална инфекција је детектована код 30,4% (68/224) испитаника, док је код 69,6% (156/224) испитаника резултат био 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 компетиране резултате за све дијагностичке тестове (n=201). На Графикону 2. приказани су резултати детекције *C. trachomatis* DIF и RT-PCR (златни стандард) методом. Применом χ^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 ($\chi^2 = 303$; $df = 1$; $p < 0.001$).



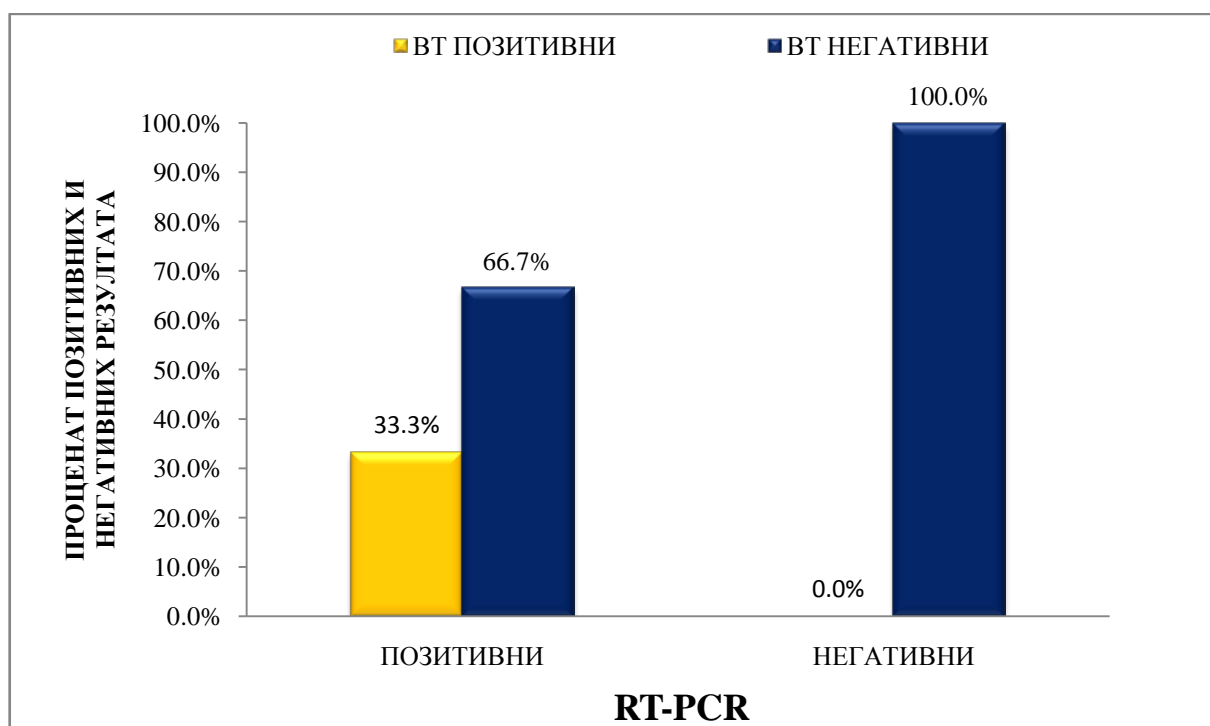
Графикон 2. Слагање резултата RT-PCR теста за детекцију *C. trachomatis* са резултатима добијеним тестом директне имунофлуоресценције

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	
χ^2		303; p < 0.001	

На Графикону 3. и Табели 3. приказани су резултати детекције *C. trachomatis* ВТ и RT-PCR методом. Применом χ^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,

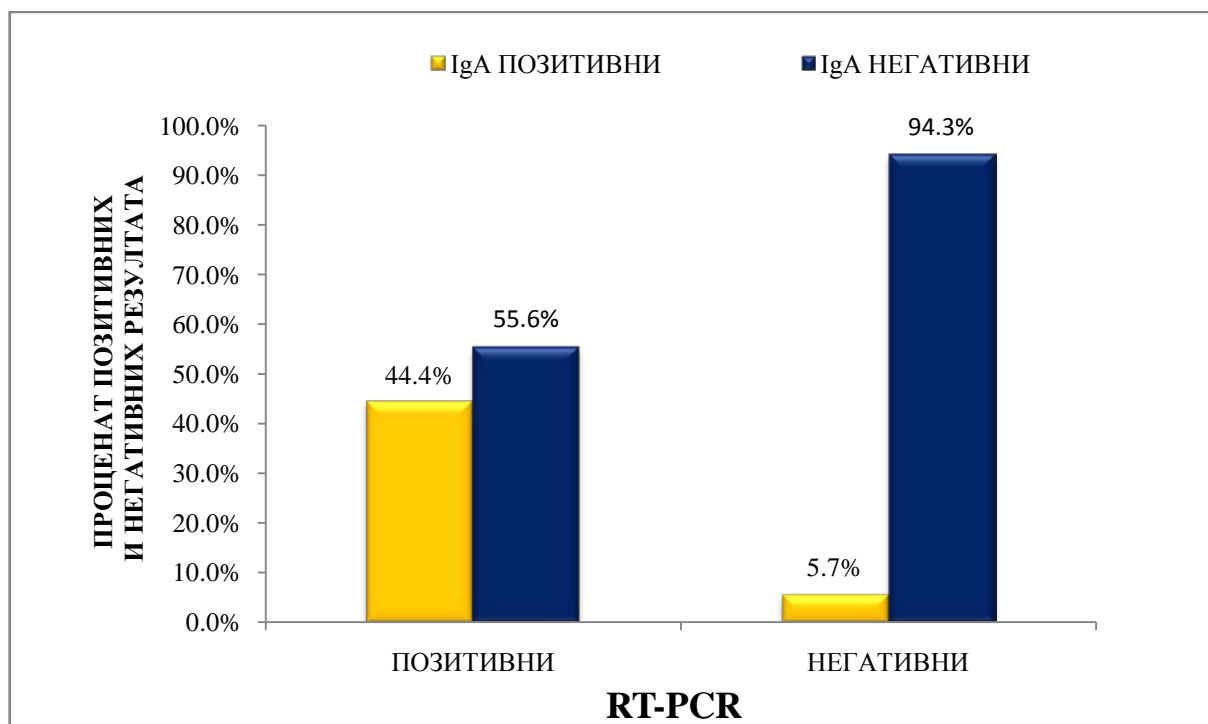
примећујемо да је од 9 узорка који су RT-PCR методом категорисано као позитиван налаз, ВТ методом дијагноза потврђена код свега 3 узорка, док су 6 узорка категорисани као негативан налаз, што даје проценат неслагања од чак 66,7% (лажно негативни резултати). За разлику од позитивних налаза, од 192 узорка 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	
χ^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. Упоредјујући резултате RT-PCR теста са резултатима добијеним употребом ELISA теста (IgA антитела), утврђено је постојање слабог слагања добијених резултата што потврђују и резултати χ^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).



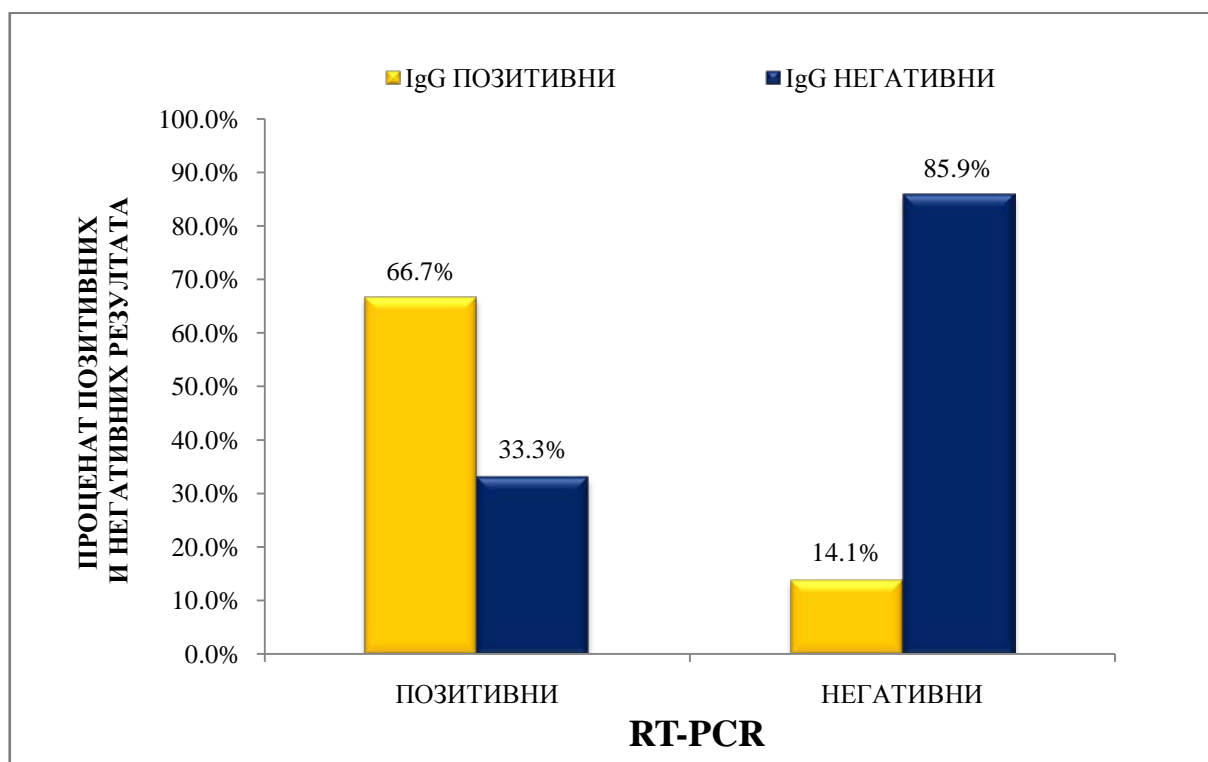
Графикон 4. Слагање резултата RT-PCR теста за детекцију *C. trachomatis* са резултатима добијеним употребом ELISA теста за детекцију серумског нивоа IgA антитела на хламидијални МOMP антиген

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		
χ^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 χ^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 *каппа* 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	
Каппа		0.2317	
χ^2		67; p < 0.001	

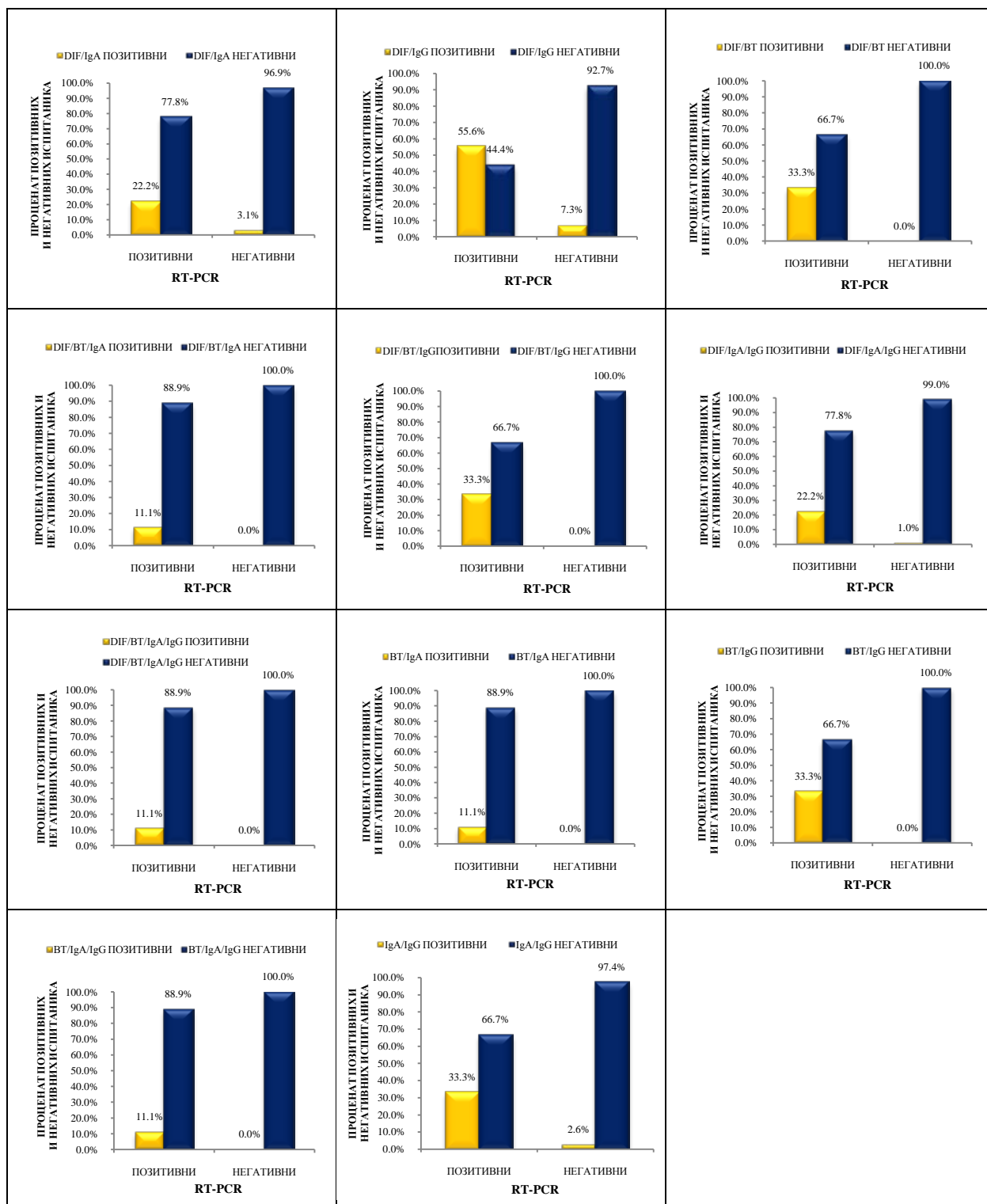
4.1.3. Слагање резултата RT-PCR теста за детекцију *C. trachomatis* са резултатима добијеним комбинацијом тестова – позитивна два или више теста, позитиван било који тест

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.



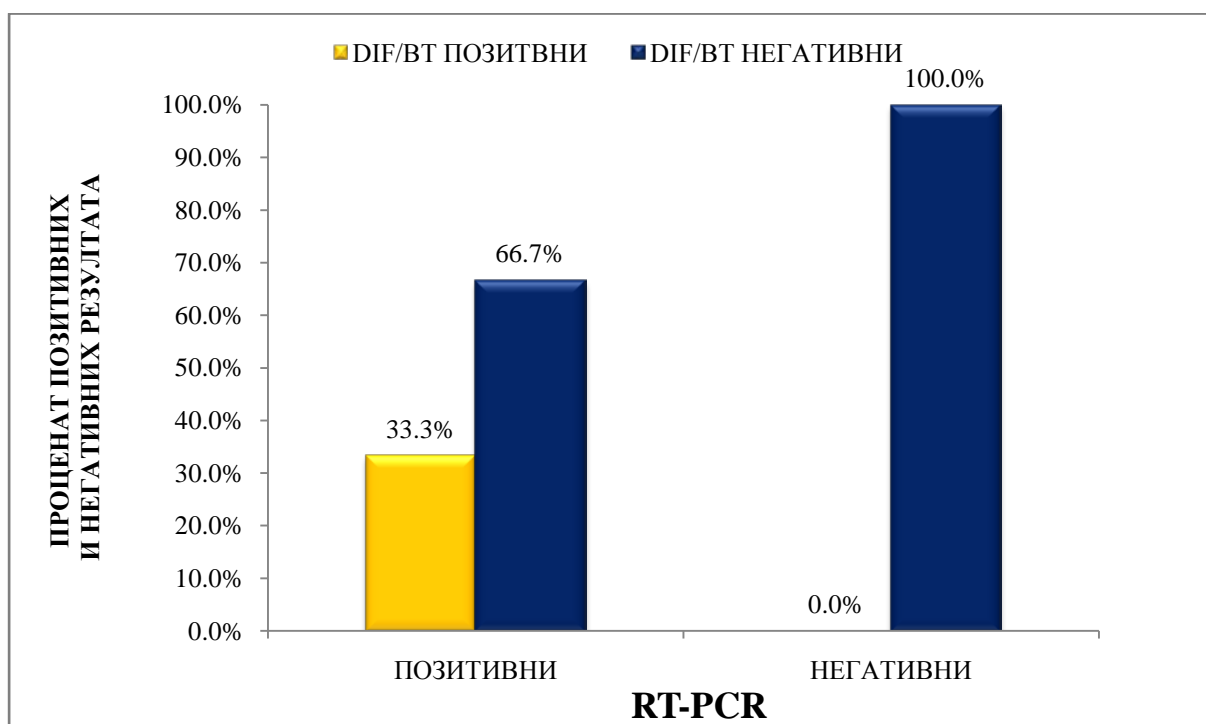
Графикон 6. Слагање резултата RT-PCR теста за детекцију *C. trachomatis* са резултатима добијеним комбинацијом „позитивна два или више теста“

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		DIF+BT+IgG		BT+IgA+IgG		BT+IgG		BT+IgA		BT+IgG		BT+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	3	6	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	1	200	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		0.1928		0.4885		0.4885		0.1928		
χ ²	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		4.19;p=0.41		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 χ^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“

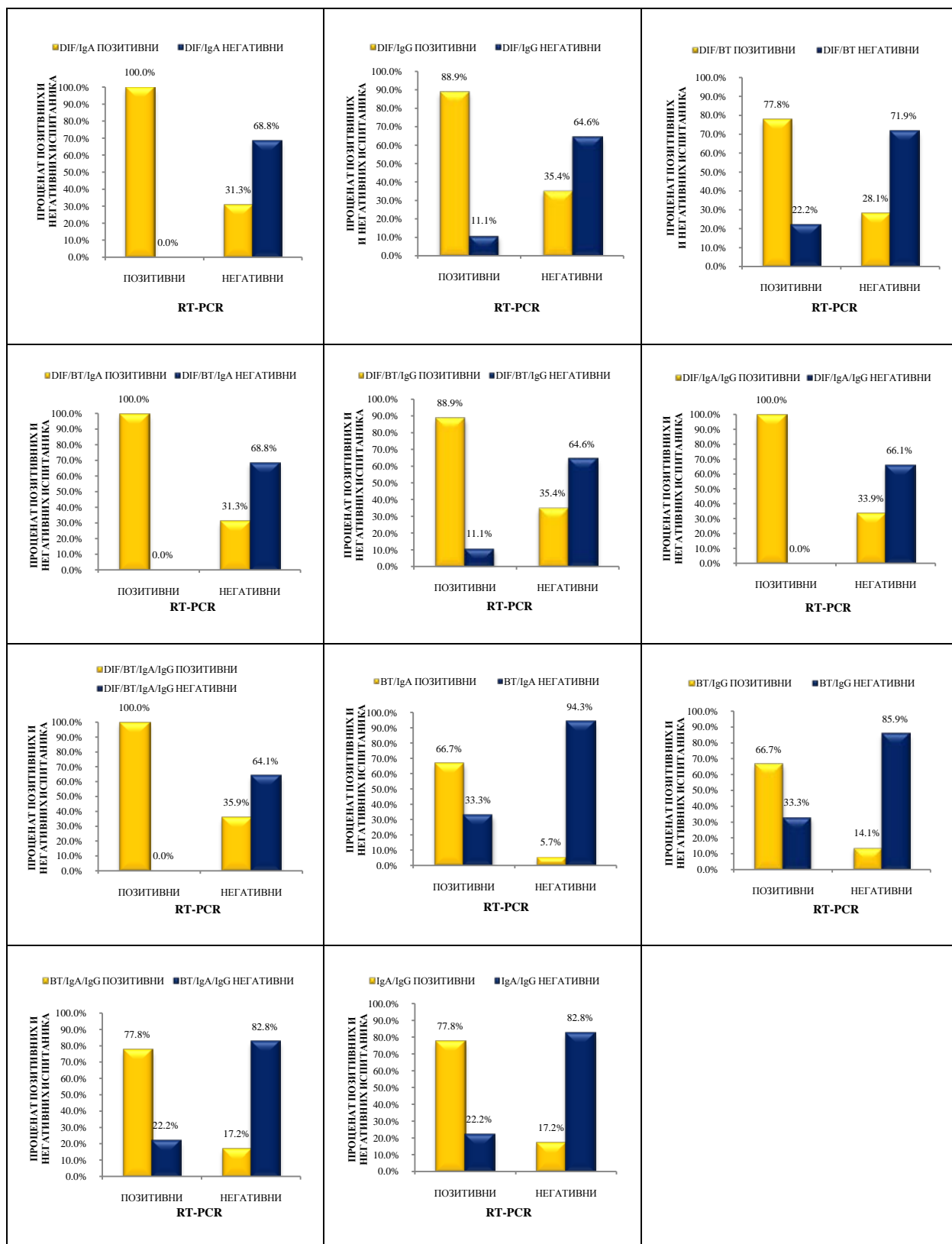
Упоредном анализом резултата добијених употребом DIF+BT и RT-PCR методом, примећујемо да је од 9 узорка који су на основу RT-PCR теста проглашени за позитивне комбинација DIF+BT одобрава дијагнозу код 3 узорка, док су 6 узорка проглашена за негативне што даје проценат неслагања од 66,6% (лажно негативни 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	
χ^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).



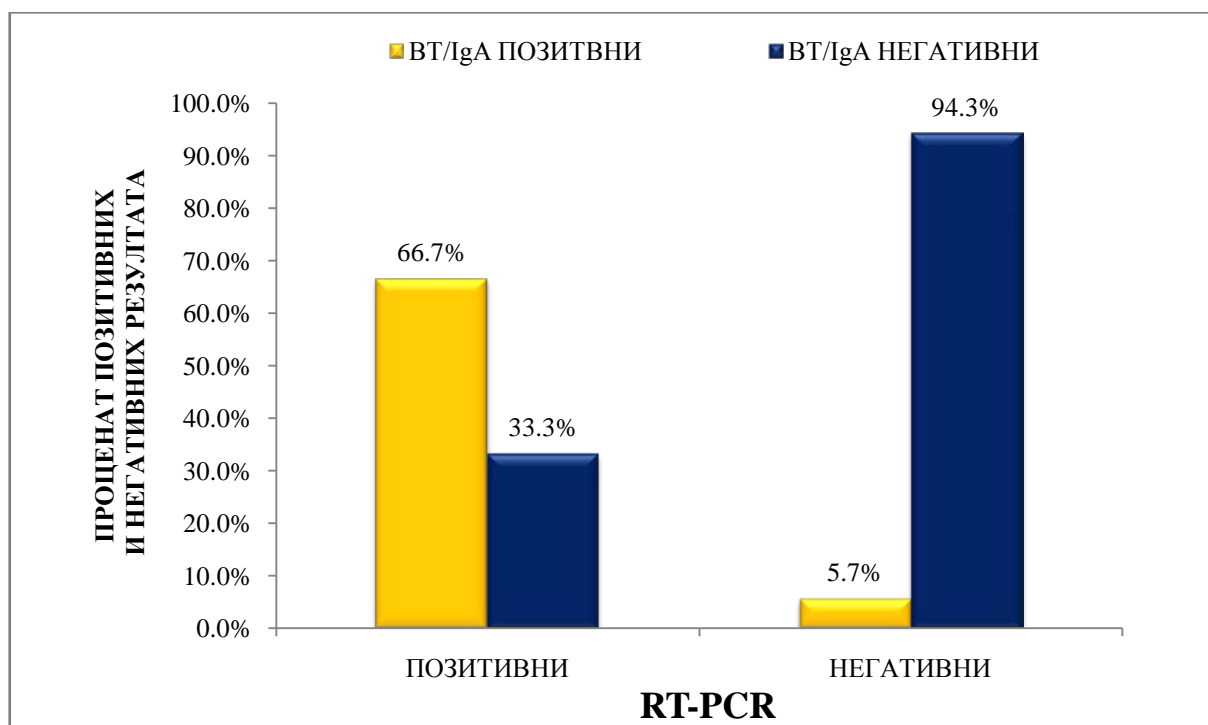
Графикон 8. Слагање резултата RT-PCR теста за детекцију *C. trachomatis* са резултатима добијеним комбинацијом „позитиван било који тест“

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/VT		DIF/VT/IgA		DIF/VT/IgG		DIF/VT/IgA/IgG		DIF/VT/IgG/IgA		DIF/VT/IgG/IgA/IgG		DIF/VT/IgA/IgG/IgG		DIF/VT/IgG/IgA/IgG/IgG																				
	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	8	1	9	9	0	9	9	0	9	9	0	9	6	3	9	6	3	9	7	2	9	7	2	9	7	2	9	7	2	9	7	2	9
Нег.	60	132	192	68	124	192	68	124	192	68	124	192	65	127	192	69	123	192	11	181	192	27	165	192	33	159	192	33	159	192	33	159	192	33	159	192	33	159	192
Σ	69	132	201	76	125	201	76	125	201	74	127	201	74	127	201	78	123	201	17	184	201	33	168	201	40	161	201	40	161	201	40	161	201	40	161	201	40	161	201
ORA	0,701		0,657		0,721		0,701		0,657		0,677		0,657		0,657		0,930		0,851		0,826		0,826		0,826		0,826		0,826		0,826		0,826		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		0,2294		0,2294		0,2294		0,2294		0,2294		0,2294		0,2294		0,2294		
χ ²	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		112;p<0.001		112;p<0.001		112;p<0.001		112;p<0.001		112;p<0.001		112;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 χ^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	
χ^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%	52,6%
Проширени Јуденов индекс	60,4%	130,3%	62,7%	69,0%
Дијагностичка тачност	72,6%	97,0%	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%	48,3%	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%	130,3%	107,0%	130,3%	67,7%	107,1%	107,1%	130,9%	107,1%	65,1%
Дијагностичка тачност	93,5%	91,0%	97,0%	96,0%	97,0%	95,5%	96,0%	96,0%	97,0%	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	68.8%	53.5%	49.7%	68.8%	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%	93.0%	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.

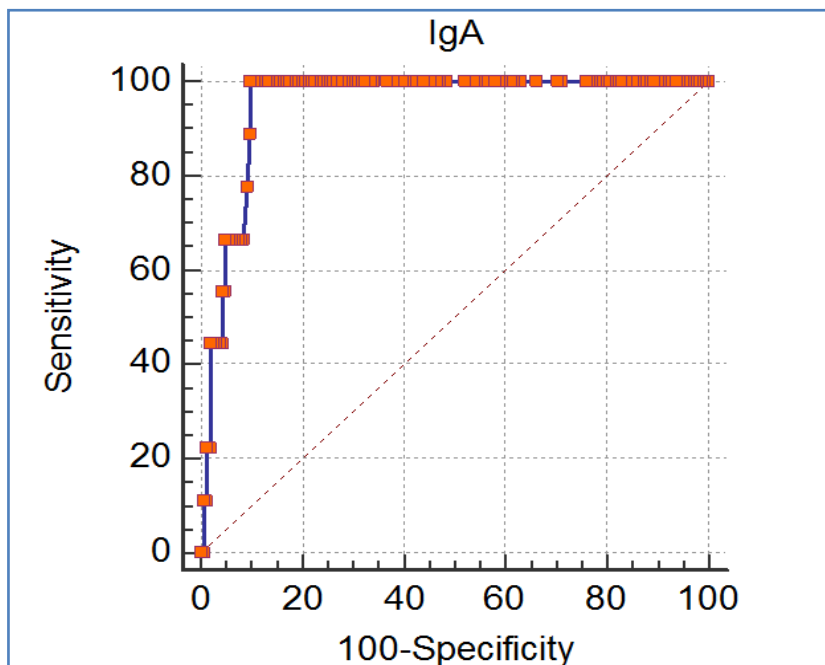
Табела 13. Упоредна анализа резултата тестова слагања и параметара дијагностичке ефикасности појединачних тестова и комбинација тестова „позитивна два или више теста“, позитиван било који тест

Статистика	BT	DIF	IgG	DIF + BT	DIF + IgG	BT + IgG	BT / IgA	DIF / IgA
χ^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.)

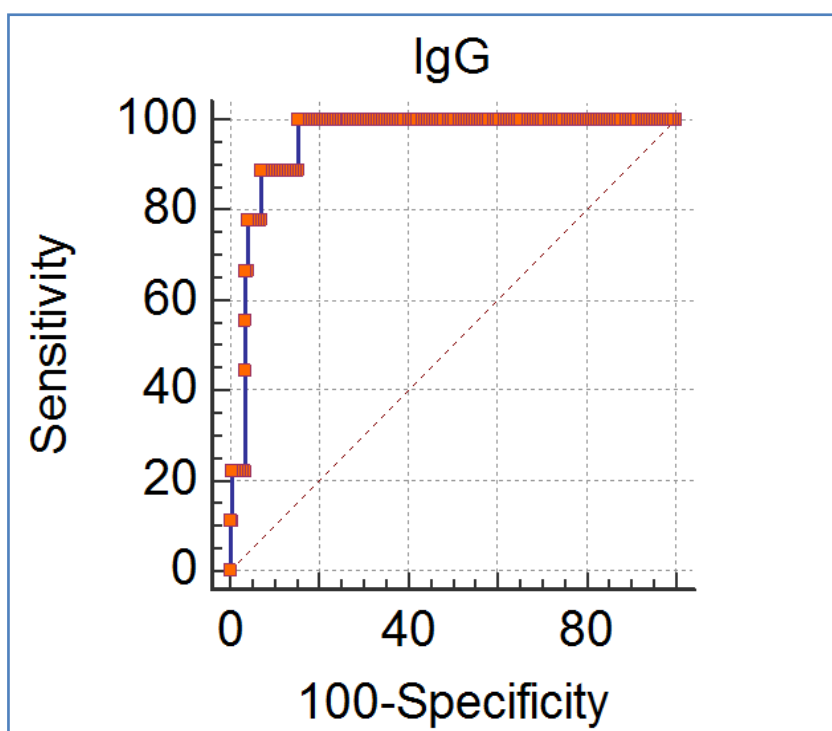
Табела 14. Дијагностичка ефикасност IgA антитела на хламидијални MOMP антиген на основу Cut-off вредности препоручених од стране произвођача теста

IgA cut-off S/Co \geq 1.1			
RT-PCR	Позитивни	Негативни	
Позитивни	4	5	9
Негативни	11	152	163
Укупно	15	157	172
	Позитивни	Негативни	
Позитивни	44.4%	55.6%	9.3%
Негативни	6.7%	93.3%	
χ^2 ORA	$\chi^2 = 4.22$; df = 1; p = 0.040 0.907		
Карра	0.2867		
Статистика	Вредности	95% CI	
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

IgA cut-off S/Co \geq 0.87			
RT-PCR	Позитивни	Негативни	
Позитивни	7	2	9
Негативни	16	147	163
Укупно	23	149	172
	Позитивни	Негативни	
Позитивни	77.8%	22.2%	10.5%
Негативни	9.8%	90.2%	
χ^2 ORA	$\chi^2 = 23.0$; df = 1; p < 0.001 0.895		
Карра	0.3917		
Статистика	Вредности	95% CI	
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 (≥ 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

IgG cut-off \geq 22 RU/ml			
RT-PCR	Позитивни	Негативни	
Позитивни	6	3	9
Негативни	26	137	163
Укупно	32	140	172
	Позитивни	Негативни	
Позитивни	66.7%	33.3%	16.9%
Негативни	16.0%	84.1%	
χ^2 ORA	$\chi^2 = 62$; $df = 1$; $p < 0.001$ 0.831		
Карра	0.2298		
Статистика	Вредности	95% CI	
Сензитивност	66.67%	29.99% до 97.19%	
Специфичност	84.05%	77.51% до 89.31%	
Позитиван однос вероватноће	4.18	2.34 до 7.4.7	
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

IgG cut-off \geq 17.57 RU/ml			
RT-PCR	Позитивни	Негативни	
Позитивни	9	0	9
Негативни	27	136	163
Укупно	36	136	172
	Позитивни	Негативни	
Позитивни	100%	0.0%	15.7%
Негативни	1.66%	83.4%	
χ^2 ORA	$\chi^2 = 85.8.1$; $df = 1$; $p < 0.001$ 0.843		
Карра	0.3452		
Статистика	Вредности	95% CI	
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

IgA+IgG <i>cut-off</i> S/Co \geq 1.1; \geq 22 RU/ml			
RT-PCR	Позитивни	Негативни	
Позитивни	3	6	9
Негативни	8	155	163
Укупно	11	161	172
	Позитивни	Негативни	
Позитивни	33.3%	66.7%	8.1%
Негативни	4.9%	95.1%	
χ^2 ORA	$\chi^2 = 0.469$; $df = 1$; $p = 0.493$		
Карра	0.919		
	0.2572		
Статистика	Вредности	95% CI	
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

IgA+IgG <i>cut-off</i> S/Co \geq 0.87; \geq 17.57 RU/ml			
RT-PCR	Позитивни	Негативни	
Позитивни	7	2	9
Негативни	8	155	163
Укупно	15	157	172
	Позитивни	Негативни	
Позитивни	77.8%	22.2%	5.8%
Негативни	4.9%	95.1%	
χ^2 ORA	$\chi^2 = 4.22$; $df = 1$; $p = 0.04$		
Карра	0.942		
	0.5542		
Статистика	Вредности	95% CI	
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 ≥ 1.1 ; ≥ 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%	
χ^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 ≥ 0.87 ; ≥ 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%	
χ^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
ИНДИЦИЈАЛНИ ЦИКЛУС											
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		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 (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
НАКНАДНИ ЦИКЛУС											
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		977.63	931.85	1,141.07	1,097.28	1,495.70	1,617.35	1,704.92	1,659.14	1,826.57	0.00
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
ПОНОВЉЕНИ ЦИКЛУС											
Сума FN		2.00	6.00	2.00	2.00	6.00	6.00	0.00	3.00	2.00	0.00
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
УКУПНИ ТРОШКОВИ											
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
ИНДИРЕКТНИ ТРОШКОВИ											
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%
ДИРЕКТНИ ТРОШКОВИ											
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.
Трошкови циљне популације						
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 коњуктивитиса 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 слаже 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 ендocerвикалних узорака за анализу (178,182). Сходно томе, лажно негативни и лажно позитивни резултати се могу спречити проценом квалитета ендocerвикалних 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 хламидијске 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 узорка представљају јак доказ присуства хламидијалне инфекције у доњем гениталном тракту, док негативни резултати PCR-а код цервикалних узорка 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 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 сензитивност) 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 јевтинијих, 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 95 000 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 серолошке тестове. 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 1 000 особа, укупни трошкови за тест амплификације нуклеинских киселина (NAATs) су израчунати на 7 070 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 7 180 и 7 170 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 стандар показује 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 метода се 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 ефикасност у 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 ефикасност у 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.
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 31st 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*, 3rd 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-Forero L, Moyano-Ariza L, Gaitán-Duarte H, Ángel-Müller E, Ruiz-Parra A, González P, Rodríguez A, Tolosa JE. 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 3rd, 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 rELISA 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.