

Występowanie zakażeń *Chlamydia trachomatis* u kobiet z niepłodnością w Polsce

Occurrence of *Chlamydia trachomatis* infections in infertile women in Poland

Izabela Chudzicka-Strugała¹, Tomasz M. Karpiński¹, Agnieszka Zeidler¹,
Andrzej Szkaradkiewicz¹, Leszek Pawelczyk², Beata Banaszewska²

¹ Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, Polska

² Klinika Niepłodności i Endokrynologii Rozrodu, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, Polska

Streszczenie

Wstęp: *Chlamydia trachomatis* jest czynnikiem przyczynowym zakażeń przenoszonych drogą płciową (STD), których przebieg kliniczny jest często bezobjawowy. Rezultatem przewlekłych i nawracających zakażeń *Chlamydia trachomatis* mogą być zaburzenia funkcji jajowodów prowadzące do niepłodności.

Cel: Celem badań było dokonanie oceny współzależności pomiędzy występowaniem bezobjawowych zakażeń *Chlamydia trachomatis* i niepłodnością u kobiet w Polsce.

Materiał i Metody: Badania przeprowadzono w latach 2010-2013 u 543 kobiet w 2 grupach. Grupa 1 obejmowała 190 pacjentek, w wieku 23-39 lat, u których przeprowadzono badania kontrolne przed planowaną ciążą. Grupa 2 obejmowała 353 pacjentki, w wieku 23-39 lat, z niepłodnością (brak ciąży po 12 miesiącach regularnego współżycia). Badanie obejmowało wszystkie zgłaszające się chore z niepłodnością. Z materiału pobranego z ujścia kanału szyjki macicy izolowano DNA *C. trachomatis* i zidentyfikowano przy użyciu metody nested-PCR. W analizie statystycznej zastosowano dokładny test Fishera.

Wyniki: Zakażenie *C. trachomatis* stwierdzono u 18 (9,47%) pacjentek z kontrolnej grupy 1. Z kolei, w grupie 2 zakażenie *C. trachomatis* stwierdzono u 81 (22,95%) pacjentek z niepłodnością co stanowi różnicę istotną statystycznie ($p < 0.0001$) względem grupy 1.

Wnioski:

1. Przeprowadzone badania wskazują, że przewlekłe zakażenia *Chlamydia trachomatis* mogą być istotnym czynnikiem sprzyjającym niepłodności u kobiet.
2. U każdej pary ze zdiagnozowaną niepłodnością należy wykonać badania w kierunku zakażenia *Chlamydia trachomatis* oraz zawsze przed planowanym zabiegiem *in vitro*.

Słowa kluczowe: *Chlamydia trachomatis* / zakażenia przenoszone drogą płciową (STD) / bezpłodność / nested-PCRs /

Adres do korespondencji:

Andrzej Szkaradkiewicz
Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu,
ul. Wieniawskiego 3, 61-712 Poznań, Polska
tel.: 61-8546138, fax: 61-8546140
e-mail: szkaradkiewicza@poczta.onet.pl

Otrzymano: 22.01.2014
Zaakceptowano do druku: 14.05.2014

Izabela Chudzicka-Strugała et al. Występowanie zakażeń *Chlamydia trachomatis* u kobiet z niepłodnością w Polsce.

Astract

Introduction: *Chlamydia trachomatis* represents a causal factor of sexually transmitted infections (STI), the course of which is frequently asymptomatic. Chronic and relapsing infections with *Chlamydia trachomatis* may result in a disturbed function of oviducts, resulting in infertility.

Objectives: The aim of the study was to evaluate the relationship between manifestations of asymptomatic infections with *Chlamydia trachomatis* and infertility among Polish women.

Material and Methods: The study was conducted between 2010-2013 on 543 women in two groups. Group 1 included 190 patients (aged 23-39 years), in whom control tests were performed before planned pregnancy. Group 2 included 353 patients (aged 23-39 years), suffering from infertility (no pregnancy after 12 months of regular sexual intercourse). The study included all women presenting with infertility. A smear was taken from the cervical canal and DNA of *C. trachomatis* was isolated and identified using nested-PCR. In the statistical analysis the Fisher's exact test was applied.

Results: Infection with *C. trachomatis* was detected in 18 (9.47%) controls (group 1) but as many as 81 (22.95%) patients with infertility (group 2). The obtained results were significantly different ($p < 0.0001$) between the investigated groups.

Conclusions:

1. The study indicates that chronic infection with *C. trachomatis* may represent a significant factor resulting in infertility of women.
2. A test for *Chlamydia trachomatis* infection should be routinely performed in every couple with diagnosed infertility and always before a scheduled in vitro procedure.

Key words: *Chlamydia trachomatis* / sexually transmitted infection (STI) / infertility / nested-PCR /

Wstęp

Chlamydia trachomatis jest Gram-ujemnym drobnoustrojem posiadającym cechy zarówno bakterii, jak i wirusów. Cechami bakteryjnymi są: obecność ściany komórkowej podobnej do występującej u bakterii Gram-ujemnych, prokariotyczne organelle komórkowe, występowanie obu typów kwasów nukleinowych (DNA i RNA) oraz antybiotykowrażliwość [1]. Cechami wirusowymi są: bezwzględne pasożytnictwo komórkowe, małe rozmiary oraz tworzenie ciałek wtrętowych w cytoplazmie zakażonych komórek. Oryginalną cechą *Chlamydia trachomatis* jest unikatowy cykl rozwojowy, trwający 48-72 godzin, z trzema postaciami morfologicznymi: ciałkiem elementarnym (EB – postać zakaźna), ciałkiem siateczkowatym (RB – postać niezakaźna) i ciałkiem pośrednim (IB). Spośród trzech biotypów *Chlamydia trachomatis* szczepy biotypu płciowego wywołują zakażenia pierwotnie związane z błoną śluzową dróg moczowo-płciowych. Wtórnie, zakażenie może prowadzić do infekcji ocznych [1, 2].

Chlamydia trachomatis jest głównym czynnikiem przyczynowym bakteryjnych zakażeń przenoszonych drogą płciową. Zakażenia *Chlamydia trachomatis* dotyczą od kilku do 40% osób, w zależności od populacji. W Polsce częstość zakażeń w różnych grupach badanych wynosi od 20% do 40% [3]. Według danych CDC, w USA zapadalność u kobiet w wieku 16-19 lat wynosi 2619/100.000, zaś u kobiet w wieku 20-24 lata – 2570/100.000 [4]. Jednocześnie ocenia się, że ryzyko zakażenia u kobiet jest 3,5 razy wyższe niż u mężczyzn [5]. Większość zakażeń *Chlamydia trachomatis* u kobiet przebiega bezobjawowo (do 80%). W zakażeniach objawowych występują upławy, objawy dysuryczne (świąd i ból), częstomocz, krwawienia międzymiesiączkowe oraz bóle w obrębie podbrzusza. Zakażenie *Chlamydia trachomatis*

może prowadzić do zapalenia: gruczołów Bartholiniego, szyjki macicy, macicy, torebki wątroby, jajowodu lub zapalenia cewki moczowej [6]. U kobiet w okresie rozrodczym może prowadzić również do zaburzeń płodności na drodze różnych mechanizmów. Przewlekły stan zapalny może prowadzić do nieodwracalnego uszkodzenia jajowodów poprzez zniszczenie rzęsek, zarośnięcie ujść brzusznych, ścieńczenie mięśniówki, spłaszczenie błony śluzowej i wygładzenie fałdów. Przewlekłe zapalenie błony śluzowej macicy może natomiast utrudniać lub uniemożliwiać implantację zarodka [7]. U 35-60% kobiet z bezpłodnością stwierdza się wysokie poziomy przeciwciał przeciwchlamydialnych [8, 9]. Obecnie zakażenie *Chlamydia trachomatis* uznawane jest za główny czynnik etiologiczny niepłodności mechanicznej [9, 10].

W diagnostyce *Chlamydia trachomatis* można wykonać bezpośrednie badanie mikroskopowe wykrywania ciałek wtrętowych, wykrywanie antygenu testem immunofluorescencji bezpośredniej lub metodą immunoenzymatyczną (ELISA), hodowlę na komórkach McCoy lub HeLa 229, badania serologiczne i badania molekularne. W diagnostyce serologicznej wykrywa się swoiste przeciwciała w surowicy chorego przy użyciu metod takich jak: immunofluorescencja bezpośrednia i pośrednia oraz metoda immunoenzymatyczna (ELISA) [2]. Swoistość metody ELISA jest wysoka (95-100%), natomiast czułość jest mniejsza (70-90%). Praktyczne zastosowanie w diagnostyce przewlekłych zakażeń *Chlamydia trachomatis* układu moczowo-płciowego znalazła jedynie metoda immunoenzymatyczna ELISA, opierająca się na wykrywaniu swoistych przeciwciał klasy IgG w surowicy chorego [11]. Aktualnie uważa się, że jednorazowe oznaczanie surowiczych przeciwciał anty-*C. trachomatis* posiada ograniczoną wartość diagnostyczną i nie może być zalecane

w rozpoznawaniu chlamydiozy [12, 13]. Najwyższą swoistością i czułością (blisko 100%) cechują się metody molekularne, pozwalające na wykrywanie kwasów nukleinowych bezpośrednio w próbkach klinicznych techniką PCR lub LCR. Obecnie uważa się, że najbardziej swoistymi i czułymi metodami diagnostycznymi w wykrywaniu *Chlamydia trachomatis* są metoda immunoenzymatyczna (ELISA) i molekularna (PCR, LCR) [14, 15].

Cel pracy

Celem badań było dokonanie oceny współzależności pomiędzy występowaniem bezobjawowych zakażeń *Chlamydia trachomatis* i niepłodnością u kobiet w Polsce.

Materiał i metody

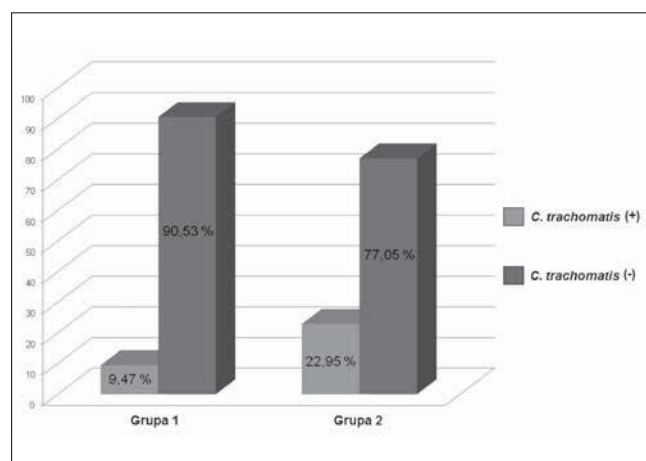
Badania przeprowadzono w latach 2010-2013 u 543 kobiet w 2 grupach. Grupa 1 obejmowała 190 pacjentek, w wieku 23-39 lat, u których przeprowadzono badania kontrolne przed planowaną ciążą. Grupa 2 obejmowała 353 pacjentki, w wieku 23-39 z niepłodnością (brak ciąży po 12 miesiącach regularnego współżycia). Badanie obejmowało wszystkie zgłaszające się chore z niepłodnością bez podziału na zaburzenia hormonalne, czynniki anatomiczne i męski. Z materiału pobrane z ujścia kanału szyjki macicy izolowano DNA *C. trachomatis*, przy użyciu zestawu Swab (A&A Biotechnology). Oczyszczone DNA przechowywano w lodówce do czasu dalszych analiz. Wyizolowany DNA poddawano amplifikacji i detekcji za pomocą zestawu diagnostycznego PCR-*Chlamydia trachomatis* (DNA Gdańsk – Blirt), który opiera się na amplifikacji fragmentu genu *crp* (*cystein rich protein*) *C. trachomatis* w układzie nested-PCR. Nested-PCR polega na przeprowadzeniu dwóch reakcji PCR z dwoma różnymi parami primerów. Pierwsza to PCR OUT, w której powstaje produkt 318 par zasad, który jest matrycą do drugiej reakcji – PCR IN. Końcowy produkt o wielkości 199 par zasad poddawano elektroforezie w 2% żelu agarozowym i uwidaczniano po barwieniu bromkiem etydy. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu dokładnego testu Fishera.

Wyniki

W przeprowadzonych badaniach, zakażenie *Chlamydia trachomatis* stwierdzono u 18 (9,47%) pacjentek z kontrolnej grupy 1. Z kolei, w grupie 2 zakażenie *C. trachomatis* stwierdzono u 81 (22,95%) pacjentek z niepłodnością co stanowi różnicę istotną statystycznie ($p < 0,0001$) względem grupy 1. Zestawienie wyników występowania zakażenia *Chlamydia trachomatis* u pacjentek w grupie kontrolnej (grupa 1) oraz u pacjentek z bezpłodnością (grupa 2) przedstawiono na rycinie 1.

Dyskusja

Nieleczone zakażenia *Chlamydia trachomatis* stanowią poważny problem epidemiologiczny ze względu na ryzyko przeniesienia zakażenia na partnera seksualnego lub noworodka. Najczęstszym powikłaniem zakażenia u kobiet jest zapalenie narządów miednicy mniejszej, co może prowadzić do niepłodności mechanicznej. W przeprowadzonych w tej pracy badaniach wykazano, że zakażenie *C. trachomatis* występuje u 9,47% pacjentek, u których przeprowadzono badania kontrolne przed planowaną ciążą. Wyniki te odpowiadają innym przedstawionym w publikacjach, w których bezobjawowe zakażenia zostały stwierdzone u 6,6% do 9% kobiet [16-19].



Rycina 1. Występowanie zakażenia *Chlamydia trachomatis* (%) u pacjentek w grupie kontrolnej (grupa 1) oraz u pacjentek z bezpłodnością (grupa 2)..

U pacjentek z niepłodnością zakażenie *C. trachomatis* stwierdziliśmy u 22,95%. Wyniki te są zgodne z innymi publikacjami, w których zakażenie to wykazano u 12,4% do 25,3% kobiet z niepłodnością [6, 20-23]. Częstość występowania zakażenia *C. trachomatis* może różnić się w różnych grupach kobiet z niepłodnością. Istnieją doniesienia, że zakażenia *C. trachomatis* są częstsze w niepłodności jajowodowej, niż w innych rodzajach bezpłodności [24].

Z aktualnych badań wynika, że szczególne znaczenie w rozwoju niepłodności jajowodowej związanej z *Chlamydia trachomatis* ma odpowiedź cytokinowa gospodarza. Zakażenie *C. trachomatis* indukuje wydzielanie TNF- α w limfocytach ludzkich [25] a także w hodowlach narządowych jajowodów [26]. TNF- α jest cytokiną prozapalną i może promować produkcję innych cytokin związanych z odpowiedzią immunologiczną oraz prowadzić do uszkodzeń jajowodu [26]. Wykazano, że w modelu in vitro, we wczesnej fazie zakażenia *Chlamydia trachomatis* następuje wydzielanie IL-1 przez aktywowane makrofagi, co również inicjuje uszkodzenia jajowodu. Ponadto, IL-1 może indukować migrację komórek i rozwój stanu zapalnego w miejscu infekcji in vivo [27]. Z tych danych wynika, że zmiany ekspresji cytokin wpływają na osobnicze zróżnicowanie objawów chorobowych oraz rozwój niepłodności u zakażonych *Chlamydia trachomatis*.

Obecnie najbardziej czułą metodą stosowaną do wykrywania *Chlamydia trachomatis* z wymazów z szyjki macicy jest reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR). Dane wskazują, że metoda PCR w wykrywaniu *C. trachomatis* posiada czułość 97% do 100% oraz swoistość >98%. Porównawczo, hodowla komórkowa, uważana za „złoty standard” charakteryzuje się czułością 85% oraz swoistością 100% [28, 29]. Pierwszeństwo metody PCR w wykrywaniu *C. trachomatis* potwierdza meta-analiza przeprowadzona przez Watson i wsp. [14], którzy wykazali, że w wykrywaniu bezobjawowych infekcji chlamydiami techniki amplifikacji kwasu nukleinowego są najczulsze. Autorzy podkreślają, że pomimo, iż najczęściej stosowaną metodą w diagnostyce chlamydii jest ELISA, jej wykorzystanie w programach przesiewowych może skutkować niewykryciem zakażenia aż u 30% badanych [14]. W naszych badaniach zastosowaliśmy metodę nested-PCR, która cechuje się prawie 100% czułością i swoistością.

Izabela Chudzicka-Strugała et al. Występowanie zakażeń *Chlamydia trachomatis* u kobiet z niepłodnością w Polsce.

Technika nested-PCR jest w szczególności polecana jako test z wyboru w przypadkach trudności interpretacji wyników badań wykonywanych innymi metodami, a także do weryfikacji wyników wątpliwych. Dlatego też, stosowane w wykrywaniu DNA *Chlamydia trachomatis* techniki molekularne są często określane jako „rozszerzony złoty standard” [2].

Wnioski

1. Przeprowadzone badania wskazują, że zakażenia *C. trachomatis* mogą być istotnym czynnikiem sprzyjającym niepłodności u kobiet.
2. U każdej pary ze zdiagnozowaną niepłodnością należy wykonać badania w kierunku chlamydii oraz zawsze przed planowanym zabiegiem in vitro.

Oświadczenie autorów:

1. Izabela Chudzicka-Strugała – opracowanie koncepcji i założeń badań, zebranie materiału, współautor tekstu pracy.
2. Tomasz M. Karpiński – wykonanie badań laboratoryjnych, analiza statystyczna wyników, przygotowanie manuskryptu i piśmiennictwa, korekta manuskryptu.
3. Agnieszka Zeidler – wykonanie badań laboratoryjnych.
4. Andrzej Szkaradkiewicz – opracowanie koncepcji i założeń badań, przygotowanie manuskryptu i piśmiennictwa, korekta i akceptacja ostatecznego kształtu manuskryptu - autor zgłaszający i odpowiedzialny za manuskrypt.
5. Leszek Pawelczyk – opracowanie koncepcji, weryfikacja pacjentów.
6. Beata Banaszewska – zebranie materiału, analiza wyników, współautor tekstu pracy.

Źródło finansowania:

Środki badawcze Katedry i Zakładu Mikrobiologii Lekarskiej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu – nr 504-01-02206316-7/109-02658.

Konflikt interesów:

Autorzy nie zgłaszają konfliktu interesów oraz nie otrzymali żadnego wynagrodzenia związanego z powstawaniem pracy.

Piśmiennictwo

1. Kuch A, Szkaradkiewicz A. Chlamydia – diagnostyka i leczenie. *Przew Lek.* 2002, 5 (11/12), 88-92.
2. Szkaradkiewicz A. Mikrobiologia lekarska. Repetytorium z bakteriologii. Poznań: *Wyd. Nauk. Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.* 2011.
3. Friedek D, Ekiel A, Martirosian G. Chlamydia trachomatis: etiopatogeneza i diagnostyka zakażeń. *Przeł Epidemiol.* 2005, 59, 723-730.
4. CDC. Sexually transmitted disease surveillance 2002. Department of Health and Human Services, Atlanta, Georgia, 2003. <http://www.cdc.gov/std/stats02/default.htm>
5. Miller WC, Ford CA, Morris M, [et al.]. Prevalence of chlamydial and gonococcal infections among young adults in the United States. *JAMA.* 2004, 291, 2229-2236.
6. Mylonas I. Female genital Chlamydia trachomatis infection: where are we heading? *Arch Gynecol Obstet.* 2012, 285 (5), 1271-1285.
7. Manavi K. A review on infection with Chlamydia trachomatis. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2006, 20 (6), 941-951.

8. Jones RB, Arderly BR, Hui SL, Cleary RE. Correlation between serum antichlamydial antibodies and tubal factor as a cause of infertility. *Fertil Steril.* 1982, 38 (5), 553-558.
9. Surana A, Rastogi V, Nirwan PS. Association of the serum anti-chlamydial antibodies with tubal infertility. *J Clin Diagn Res.* 2012, 6 (10), 1692-1694.
10. Chudzicka-Strugała I, Karpiński TM, Zeidler A, [et al.]. Infection with Chlamydia trachomatis in infertile women in Poland. 24th ECCMID, Barcelona, Spain. 10-13 May 2014, eP578.
11. Mardh PA. Chlamydia screening - yes, but of whom, when, by whom and with what? *Ann New York Acad Sci.* 2000, 900, 286-292.
12. Rabenau HF, Köhler, Peters M, [et al.]. Low correlation of serology with detection of Chlamydia trachomatis by ligase chain reaction and antigen EIA. *Infection.* 2000, 2, 97-102.
13. Markowska J, Fischer N, Warchoń JB, Fischer Z. Detection of Chlamydia trachomatis infection in women with CIN and invasive carcinoma. Controversial results of different methods. *Eur J Gynaecol Oncol.* 2001, 22 (23), 134-135.
14. Watson EJ, Templeton A, Russell I, [et al.]. The accuracy and efficacy of screening tests for Chlamydia trachomatis: a systematic review. *J Med Microbiol.* 2002, 51 (12), 1021-1031.
15. Gallenga PE, Del Boccio M, Rapinese M, [et al.]. Molecular approach by PCR is the best method to detect the presence of Chlamydia trachomatis and to define the true agent of ocular bacterial inflammation. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2011, 24 (2), 285-296.
16. Sattenwhite CL, Gray AM, Berman S, [et al.]. Chlamydia trachomatis infections among women attending prenatal clinics: United States, 2004-2009. *Sex Transm Dis.* 2012, 39 (6), 416-420.
17. Corbeto EL, Gonzalez V, Lugo R, [et al.]. Discordant prevalence of Chlamydia trachomatis in asymptomatic couples screened by two screening approaches. *Int J STD AIDS.* 2014.
18. Chernesky M, Jang D, Gilchrist J, [et al.]. Head-to-head comparison of second-generation nucleic acid amplification tests for detection of Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae on urine samples from female subjects and self-collected vaginal swabs. *J Clin Microbiol.* 2014, 52 (7), 2305-2310.
19. Batajewicz-Nowak M, Pityński K, Migdał M. Antioxidative system in pregnant women infected by Chlamydia trachomatis, Mycoplasma hominis, Ureaplasma urealyticum. *Ginekol Pol.* 2011, 82 (10), 732-737.
20. Mania-Pramanik J, Kerkar S, Sonawane S, [et al.]. Current Chlamydia trachomatis Infection, A Major Cause of Infertility. *J Reprod Infertil.* 2012, 13 (4), 204-210.
21. Rashidi BH, Chamani-Tabriz L, Haghollahi F, [et al.]. Effects of Chlamydia trachomatis infection on fertility; A case-control study. *J Reprod Infertil.* 2013, 14 (2), 67-72.
22. Miron ND, Socolov D, Mareş M, [et al.]. Bacteriological agents which play a role in the development of infertility. *Acta Microbiol Immunol Hung.* 2013, 60 (1), 41-53.
23. Michou IV, Constantoulakis P, Makarounis K, [et al.]. Molecular investigation of menstrual tissue for the presence of Chlamydia trachomatis, Ureaplasma urealyticum and Mycoplasma hominis collected by women with a history of infertility. *J Obstet Gynaecol Res.* 2014, 40 (1), 237-242.
24. Sharma M, Sethi S, Daftari S, Malhotra S. Evidence of chlamydial infection in infertile women with fallopian tube obstruction. *Indian J Pathol Microbiol.* 2003, 46 (4), 680-683.
25. Ohman H, Tiitinen A, Halttunen M, [et al.]. IL-10 polymorphism and cell-mediated immune response to Chlamydia trachomatis. *Genes Immun.* 2006, 7 (3), 243-249.
26. Ault KA, Tawfik OW, Smith-King MM, [et al.]. Tumor necrosis factor-alpha response to infection with Chlamydia trachomatis in human fallopian tube organ culture. *Am J Obstet Gynecol.* 1996, 175 (5), 1242-1245.
27. Hvid M, Baczyńska A, Deleuran B, [et al.]. Interleukin-1 is the initiator of Fallopian tube destruction during Chlamydia trachomatis infection. *Cell Microbiol.* 2007, 9 (12), 2795-2803.
28. Olafsson JH, Davidsson S, Karlsson SM, [et al.]. Diagnosis of Chlamydia trachomatis infection in high-risk females with PCR on first void urine. *Acta Derm Venereol.* 1996, 76 (3), 226-227.
29. Wilcox MH, Reynolds MT, Hoy CM, Brayson J. Combined cervical swab and urine specimens for PCR diagnosis of genital Chlamydia trachomatis infection. *Sex Transm Infect.* 2000, 76 (3), 177-178.