

Współwystępowanie szczepów bakterii wytwarzających indol w pochwie kobiet zakażonych *Chlamydia trachomatis*

Co-occurrence of indol-producing bacterial strains in the vagina of women infected with *Chlamydia trachomatis*

Romanik Małgorzata¹, Martirosian Gayane¹, Wojciechowska-Wieja Anna², Cieślak Katarzyna³, Kaźmierczak Wojciech³

¹ Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej Śląskiej Akademii Medycznej w Katowicach

² Klinika Położnictwa i Ginekologii Śląskiej Akademii Medycznej w Katowicach

³ Klinika Perinatologii i Ginekologii Śląskiej Akademii Medycznej w Zabrze

Streszczenie

Cel pracy: Zbadanie mikroflory pochwy u kobiet zakażonych i niezakażonych *Chlamydia trachomatis* (*C. trachomatis*) w celu określenia, czy zapalenie szyjki macicy o wyżej wymienionej etiologii wpływa na częstość występowania wybranych szczepów bakterii tlenowych i beztlenowych związanych z etiologią aerobic vaginitis (AV) i bacterial vaginosis (BV). Szczególną uwagę zwrócono na szczepy wytwarzające indol z powodu możliwości udziału tych bakterii w powstawaniu przewlekłego zakażenia szyjki macicy powodowanego przez *C. trachomatis*.

Materiał i metody: Wymazy z pochwy i kanału szyjki macicy pobrano od 122 kobiet (18-40 lat). Obecność antygenu *C. trachomatis* określono metodą immunofluorescencji bezpośredniej, BV rozpoznano zgodnie z kryteriami Amsela i Nugenta, natomiast AV na podstawie kryteriów Dondersa. Identyfikację wyhodowanych z pochwy szczepów bakterii przeprowadzono zgodnie z zasadami klasycznej diagnostyki mikrobiologicznej.

Wyniki: Zaburzenia mikroflory pochwy (4-10 punktów w skali Nugenta) stwierdzono u 11,5% badanych kobiet. U 4,5 % zakażonych *C. trachomatis* rozpoznano AV, natomiast BV u 10,9%, i u 5,45%, odpowiednio na podstawie kryteriów Amsela i Nugenta.

Wnioski: Szczepy bakteryjne wytwarzające indol związane z patogenezą BV i AV (*Peptostreptococcus anaerobius*, *Propionibacterium acnes* oraz *Escherichia coli*) wyhodowano znamiennie częściej z pochwy kobiet zakażonych *C. trachomatis* ($p=0,0405$, $\chi^2=4,20$) co potwierdza współdział tych bakterii w zakażeniu szyjki macicy powodowanym przez *C. trachomatis*.

Słowa kluczowe: *chlamydia trachomatis* – izolowanie i oczyszczanie /
/ *chlamydia trachomatis* – chorobotwórczość /
/ zakażenie Chlamydia – diagnostyka / narządy płciowe żeńskie –
mikrobiologia / zakażenie pochwy bakteryjne – mikrobiologia /
/ pochwa – mikrobiologia /

Adres do korespondencji:

Małgorzata Romanik
Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej
ul. Medyków 18, 40-752 Katowice
e-mail mikrobiologia@slam.katowice.pl

Otrzymano: 23.05.2007

Zaakceptowano do druku: 18.07.2007

Abstract

Objectives: The aim of this study was to determine if cervicitis, caused by *Chlamydia trachomatis* (*C. trachomatis*), has an influence on the frequency of occurrence of selected aerobic and anaerobic bacterial strains, connected with etiology of aerobic vaginitis (AV) and bacterial vaginosis (BV). Indole-producing bacteria have received particular attention due to their possibly inductive role in chronic cervicitis caused by *C. trachomatis*.

Material and methods: The swabs from vagina and cervical canal have been obtained from 122 women (aged 18-40).

The presence of *C. trachomatis* antigen had been detected and diagnosed with the help of direct immunofluorescence, BV with Amesl and Nugent criteria, whereas the AV with Donders criteria. The identification of the bacterial strains isolated from vagina has been performed according to classical microbiological diagnostics.

Results: Disruption of vaginal microflora (4-10 in Nugent score) was determined in 11,5% of observed women. AV was diagnosed in 4,5% women with chlamydial cervicitis, BV was diagnosed in 10,9% and 5,45% of these women, on the basis of Amsel and Nugent criteria respectively.

Conclusions: Indole-producing bacterial strains connected with BV and AV (*Peptostreptococcus anaerobius*, *Propionibacterium acnes*, *Escherichia coli*) have been isolated significantly more often from vagina of women infected with *C. trachomatis* ($p=0,0405$, $\chi^2=4,20$) and these findings confirm co-importance of indole-producing bacterial strains in cervicitis caused by *C. trachomatis*.

Key words: *chlamydia trachomatis* – metabolism / *chlamydia trachomatis* – physiology /
/ *chlamydia-infections* – enzymology / *chlamydia-infections* – immunology /
/ *vaginosis bacterial* – microbiology / *vaginosis bacterial* – pathology /
/ *vagina* – microbiology /

Wstęp

Chlamydia trachomatis (*C. trachomatis*) jest bakterią o unikalnym cyklu rozwojowym, w którym wyróżnia się dwie postacie morfologiczne: ciało elementarne (*elementary body* – EB) oraz ciało siateczkowate (*reticulate body* – RB) EB jest formą zewnątrzkomórkową, zakaźną, natomiast RB – to wewnątrzkomórkowa, metabolicznie aktywna postać bakterii [1, 2, 3, 4].

W eliminacji *C. trachomatis* istotną rolę odgrywa interferon γ (IFN- γ), który w komórkach nabłonkowych indukuje powstanie enzymu – 2,3 dioksygenazy indoloaminowej, który rozkłada tryptofan (aminokwas niezbędny do przemiany RB w EB) [1, 2, 4].

C. trachomatis może jednak przetrwać wewnątrz komórek nabłonka. Dzieje się tak, dlatego, że bakterie te (typy serologiczne D-K, które posiadają funkcjonalną syntetazę tryptofanu) mogą przyswajać egzogenne indol jako źródło tryptofanu [2, 3]. Badania Caldwell i wsp. [2] wykazały, że nawet niskie stężenie indolu (0,1-1,0 μ M) umożliwia powstanie EB w obecności IFN- γ w środowisku. Sugerowana jest, więc ścisła zależność pomiędzy drobnoustrojami kolonizującymi drogi rodne, które wytwarzają indol a powstawaniem przewlekłych zakażeń *C. trachomatis* [2, 3].

Bakterie beztlenowe (*Bacteroides* spp., *Peptostreptococcus* spp.) i tlenowe (*Escherichia coli* – *E. coli*, *Proteus* sp.) produkujące indol, które kolonizują pochwę stwierdza się w warunkach prawidłowych oraz w znacznych ilościach odpowiednio w przypadku *bacterial vaginosis* (BV) oraz zapalenia pochwy powodowanego przez bakterie tlenowe (*aerobic vaginitis* – AV) [3, 5, 6, 7]. Zarówno w BV, jak i AV wskutek zmniejszania się liczby bakterii z rodzaju *Lactobacillus* dochodzi do ekspansji mieszanej odpowiednio beztlenowej i tlenowej flory bakteryjnej [5, 7, 8].

Zmiany ilościowe i jakościowe mikroflory pochwy w BV i AV skutkują wzrostem wartości pH pochwy $>4,5$ i powstawaniem upławów oraz zaburzeniami układu odpornościowego w drogach płciowych i w ten sposób mogą sprzyjać powstawaniu przewlekłych zakażeń *C. trachomatis* [3, 6, 7, 9, 10].

Cel pracy

Celem badania jest prześledzenie częstości występowania zaburzeń mikroflory pochwy towarzyszących BV i AV zwłaszcza bakterii wytwarzających indol u kobiet zakażonych *C. trachomatis*.

Materiał i metody

Badania wykonano w fazie lutealnej cyklu miesięczkowego (15-28 dzień cyklu) u 122 kobiet w wieku 18-40 lat (średnia wieku 28 ± 5 lat), które rozpoczęły życie płciowe, z rozpoznaniem na podstawie badania klinicznego i cytologicznego stanem zapalnym szyjki macicy (obecność śluzowo-ropnej wydzieliny i/lub krwawienie kontaktowe, stwierdzenie w wymazie z kanału szyjki macicy barwionym metodą Grama leukocytów wielojądrzastych w ilości >5 w polu widzenia przy powiększeniu 1000x). Kryteria wyłączenia z badania obejmowały: brak zgody pacjentki na udział w badaniu, otrzymywanie antybiotyków i chemioterapeutyków doustnie lub dopochwowo w okresie do dwóch tygodni poprzedzających badanie, stosunki płciowe w okresie do trzech dni poprzedzających badanie, stosowanie irygacji pochwy lub środków do higieny intymnej w okresie do trzech dni poprzedzających badanie, ciąży i połóg, przyjmowanie preparatów hormonalnych (w tym hormonów płciowych, gonadotropin, hormonów kory nadnerczy, tarczycy), rozpoznane choroby towarzyszące (w tym nowotwory, przewlekłe procesy zapalne, cukrzyca typu 1 lub 2), pierwotny lub wtórny brak miesiączki.

Na podstawie wyników badania mikrobiologicznego w kierunku obecności antygeny *C. trachomatis* pacjentki zostały podzielone na dwie grupy:

- Grupa badana – 55 kobiet ze stwierdzonym zakażeniem *C. trachomatis*.
- Grupa kontrolna – 67 kobiet bez stwierdzonego zakażenia *C. trachomatis*.

Na przeprowadzenie badań klinicznych otrzymano zgodę Komisji Biotycznej ŚAM (NN-013-204/I/03).

U każdej z badanych kobiet wykonano oznaczenie pH pochwy za pomocą papierków wskaźnikowych z odpowiednio dobranym zakresem pH (4,0-7,0). Dokonano również makroskopowej oceny wydzieliny pochwowej uwzględniając jej konsystencję (jednorodna, zbita, ropna, krwista), kolor (biała, szara, żółta, przezroczysta), ilość (skąpa, umiarkowana, obfita).

Materiałem do badań były wymazy pobrane w ustalonej kolejności z następujących miejsc:

1. tylnego sklepienia pochwy (w celu wykonania preparatu bezpośredniego – barwionego metodą Grama, testu aminowego oraz przeprowadzenia badania mikrobiologicznego w kierunku bakterii tlenowych i beztlenowych),
2. tarczy części pochwowej i kanału szyjki macicy (po usunięciu jałowym wacikiem nadmiaru wydzieliny śluzowej) – w kierunku antygeny *C. trachomatis* (przenoszono bezpośrednio po pobraniu na szkiełko testowe, a po wysuszeniu preparat utrwalano acetonem).

Obecność antygeny *C. trachomatis* określono metodą immunofluorescencji bezpośredniej (zgodnie z zaleceniami producenta testu Chlamydia Direct IF bioMérieux Francja) w mikroskopie fluorescencyjnym Nikon Model HB – 10101AF przy powiększeniu 400x.

AV diagnozowano zgodnie z kryteriami zaproponowanymi przez Dondersa (stwierdzenie wartości pH pochwy >4,5 i ropnych upławów, stanu zapalnego błony śluzowej pochwy w badaniu fizykalnym oraz obecności licznych morfotypów bakterii kulistych lub cylindrycznych przy braku form *Lactobacillus spp.* w preparatach mikroskopowych z wymazów pochwy, licznych leukocytów wielojądrzastych w tym z ziarnistościami toksycznymi oraz wyhodowanie bakterii: *Streptococcus* grupy B – GBS, *E. coli*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* i innych tlenowych) [6]. BV rozpoznawano w oparciu o kryteria kliniczne Amsela oraz mikrobiologiczne Nugenta [5, 8]. Stwierdzenie trzech z czterech kryteriów według Amsela oraz uzyskanie 7-10 punktów według systemu Nugenta pozwalało na rozpoznanie BV.

Identyfikację wyhodowanych szczepów bakterii przeprowadzono zgodnie z zasadami rutynowej diagnostyki mikrobiologicznej, a zdolność do wytwarzania indolu odczytano z pasków testowych stosowanych do identyfikacji biochemicznej bakterii beztlenowo (Rapid 32A bioMérieux Francja) i tlenowo rosnących (API 32E bioMérieux Francja).

Analizy statystycznej dokonano przy użyciu programu statystycznego Statistica for Windows v. 6.1. Zależności między cechami jakościowymi oceniono za pomocą testu Chi-kwadrat (χ^2). Za znamienne statystycznie przyjmowano hipotezy o 95% prawdopodobieństwie, co odpowiada współczynnikowi $p \leq 0,05$.

Wyniki

W obu grupach badanej i kontrolnej najliczniejszy przedział wiekowy stanowiły kobiety w wieku 26-30 lat – odpowiednio 38,8% wśród zakażonych *C. trachomatis* i 35,8% niezakażonych *C. trachomatis*.

Zaburzenia mikroflory pochwy (4-10 punktów według Nugenta) stwierdzono u 11,5% (14 z 122) kobiet badanych. AV rozpoznano u 4,5 % kobiet jedynie w grupie badanej. Przeprowadzona ocena kliniczna (wg kryteriów Amsela) wykazała wyższą częstość (8,19%) BV w badanej populacji (122 kobiety) w porównaniu z oceną wg kryteriów Nugenta – 4%.

W grupie kobiet zakażonych *C. trachomatis*, stwierdzenie trzech lub czterech kryteriów klinicznych według Amsela pozwoliło na rozpoznanie BV u 10,9%, a w grupie kobiet niezakażonych – u 5,9%. (Tabela I).

Ryzyko względne rozpoznania BV w badanej populacji było jednakowe niezależnie od przyjętych kryteriów diagnostycznych (RR=1,83), jednak iloraz szans rozpoznania BV wg kryteriów Amsela był wyższy. (Tabela I).

Tabela I. Częstość występowania *bacterial vaginosis* rozpoznawanej według kryteriów Amsela i Nugenta w badanych grupach.

Grupa	Rozpoznanie <i>bacterial vaginosis</i> zgodnie z kryteriami	
	Amsela (3 lub 4 kryteria) N (%)	Nugenta (7-10 punktów) N (%)
badana (N=55)	6 (10,9)	3 (5,45)
kontrolna (N=67)	4 (5,97)	2 (2,98)
razem (N=122)	10 (8,19)	5 (4,09)
RR	1,83	1,83
OR	1,93	1,88
χ^2	0,98	0,47
p	0,3224	0,4936

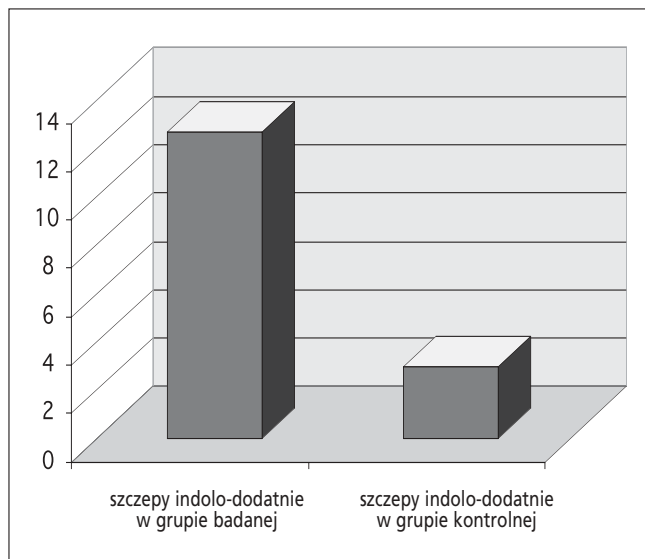
Nie wykazano wpływu zakażenia *C. trachomatis* na częstość rozpoznawania BV ($\chi^2=0,42$, $p=0,51$), jednak w badanej grupie kobiet stwierdzono korelację (współczynnik korelacji Yule'a Q=0,84) pomiędzy podanym przez pacjentkę w wywiadzie zakażeniem przenoszonym drogą płciową (*Sexually Transmitted Infection* – STI) a zdiagnozowaną podczas badania mikrobiologicznego BV.

Z uwagi na istniejącą hipotezę o udziale drobnoustrojów wytwarzających indol w patogenie przewlekłych zakażeń *C. trachomatis* prześledzono częstość występowania indolo-dodatnich szczepów bakterii wyhodowanych z pochwy w obydwu grupach. (Rycina 1).

Bakterie indolo-dodatnie związane z patogenizacją BV i AV (*Peptostreptococcus anaerobius*, *Propionibacterium acnes* oraz *E. coli*) wyhodowano znamienne częściej z pochwy kobiet zakażonych *C. trachomatis* ($p=0,0405$, $\chi^2=4,20$).

Nie stwierdzono natomiast znamiennej statystycznie zależności we współwystępowaniu: GBS, pałeczek Gram-ujemnych z rodziny *Enterobacteriaceae*, *Streptococcus spp.*,

Corynebacterium spp., *Gardnerella vaginalis*, *Bacteroides fragilis*, *Prevotella bivia*, *Peptostreptococcus spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *Propionibacterium propionicum*, *Propionibacterium acnes*, *Gemella morbillorum* w pochwie kobiet z grupy badanej i kontrolnej.



Rycina 1. Częstość wyhodowania bakterii wytwarzających indol z pochwy kobiet zakażonych i niezakażonych *Chlamydia trachomatis*.

Dyskusja

Wyniki badania wykazały, że zakażenie *C. trachomatis* nie zwiększa ryzyka kolonizacji dróg rodnych bakteriami beztlenowo rosnącymi związanymi z patogenezą BV (*Gardnerella vaginalis*, *Bacteroides spp.*, *Prevotella spp.*) i tlenowymi bakteriami izolowanymi w przypadku AV (pałeczkami Gram-ujemnymi z rodziny *Enterobacteriaceae*, *GBS*). Znamienna różnica w częstości występowania szczepów bakteryjnych zdolnych do wytwarzania indolu stwierdzona w grupie badanej w porównaniu z kontrolną przemawia jednak za współudziałem tych bakterii w procesie zapalnym szyjki macicy.

U kobiet zakażonych *C. trachomatis* Elias i wsp. [11] stwierdzili w niskim odsetku szczepy *GBS* 4%, pałeczki Gram-ujemne z rodziny *Enterobacteriaceae* – 2,4% oraz bakterie beztlenowe 8%. Nie zaobserwowali także różnic w częstości występowania wyżej wymienionych drobnoustrojów u kobiet zakażonych *C. trachomatis* i niezakażonych. Cherpes i wsp. [12] w swoich badaniach u młodych kobiet stwierdzili *E. coli* u 27% a *GBS* w zaskakująco wysokim procencie aż u 33%.

Wyniki badania wykazały również, że zakażenie *C. trachomatis* może współistnieć z prawidłową biocenozą pochwy. U 47 kobiet z grupy badanej w wymazach z pochwy stwierdzono głównie Gram-dodatnie pałeczki *Lactobacillus spp.* (0-3 punktów w skali Nugenta). Podobne spostrzeżenia opisali inni autorzy w przypadku zakażeń powodowanych zarówno przez *C. trachomatis*, jak również przez inne STI [9, 13].

Nie wykazano również w badaniu własnym, aby zapalenie szyjki macicy o etiologii *C. trachomatis* mogło wpływać na częstość rozpoznawania BV, mimo, że stwierdzana częstość BV była różna w zależności od przyjętych kryteriów (10,9% i 5,45%, stosując odpowiednio kryteria Amsela i Nugenta).

Wieloośrodkowe badania wykazały wysoką czułość i swoistość kryteriów Nugenta w rozpoznawaniu BV u pacjentek zgłaszających się do poradni wenerologicznych oraz ginekologicznych [14, 15]. Czułość kryteriów Nugenta w tych badaniach w porównaniu do Amsela była wyższa i wyniosła 89-91% [14, 15].

Czułość i swoistość poszczególnych kryteriów klinicznych (Amsela) w celu rozpoznawania BV może także różnić się u pacjentek ze współistniejącymi zakażeniami przenoszonymi drogą płciową [16, 17]. W tych przypadkach wyższą wartość diagnostyczną w rozpoznaniu BV może odgrywać zastosowanie kryteriów Nugenta, czyli wykonanie i ocena preparatu bezpośredniego z wymazu z pochwy barwionego metodą Grama [14, 18].

Zaletą zaproponowanej przez Nugenta metody jest możliwość uzyskania powtarzalnych wyników oceny BV zarówno w badaniach przeprowadzanych przez różnych klinicystów, jak i przez tę samą osobę w odstępie czasowym [7, 19].

Wnioski

1. Stwierdzona znamienna różnica w częstości występowania szczepów bakteryjnych zdolnych do wytwarzania indolu przemawia za współwystępowaniem tych bakterii w zapaleniu szyjki macicy powodowanym przez *C. trachomatis*.
2. Zakażenie *C. trachomatis* nie zwiększa ryzyka kolonizacji dróg rodnych bakteriami związanymi z patogenezą BV i AV.

Piśmiennictwo

1. Akers J, Tan M. Molecular mechanism of tryptophan-dependent transcriptional regulation in *Chlamydia trachomatis*. *J Bacteriol.* 2006, 188, 4236-4243.
2. Caldwell H, Wood H, Crane D, [et al.]. Polymorphisms in *Chlamydia trachomatis* tryptophan synthase genes differentiate between genital and ocular isolates. *J Clin Invest.* 2003, 111, 1757-1769.
3. Fehlner-Gardiner C, Roshick C, Carlson J, [et al.]. Molecular basis defining human *Chlamydia trachomatis* tissue tropism. A possible role for tryptophan synthase. *J Biol Chem.* 2002, 277, 26893-26903.
4. Roshick C, Wood H, Caldwell H, [et al.]. Comparison of gamma interferon-mediated antichlamydial defense mechanisms in human and mouse cells. *Infect Immun.* 2006, 74, 225-238.
5. Amsel R, Totten P, Spiegel C, [et al.]. Nonspecific vaginitis. Diagnostic criteria and microbial and epidemiologic associations. *Am J Med.* 1983, 74, 14-22.
6. Donder G, Vereecken A, Bosmans E, [et al.]. Definition of a type of abnormal vaginal flora that is distinct from bacterial vaginosis: aerobic vaginitis. *B/OG.* 2002, 109, 34-43.
7. Romanik M, Martirosian G. Częstość występowania, kryteria diagnostyczne i następstwa bakteryjnego zakażenia pochwy u kobiet ciężarnych. *Przegl Epidemiol.* 2004, 58, 547-553.
8. Nugent R, Krohn M, Hillier S. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation. *J Clin Microbiol.* 1991, 29, 297-301.
9. Wiesenfeld H, Hillier S, Krohn M, [et al.]. Bacterial vaginosis is a strong predictor of *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* infection. *Clin Infect Dis.* 2003, 36, 663-668.
10. Romanik M, Kluciński P, Friedek D, [et al.]. Ocena liczby leukocytów wielojądrzastych i częstości występowania bacterial vaginosis u kobiet zakażonych *Chlamydia trachomatis*. *Prz Ginek Polozn.* 2007, 7, 55-59.
11. Elias M, Choroszcy-Król I, Ruczkowska J [et al.]. *Chlamydia trachomatis* i flora współistniejąca w wewnętrznych narządach płciowych kobiet bez klinicznych objawów zapalnych. *Ginekol Pol.* 1996, 67, 264-269.

Współwystępowanie szczepów bakterii wytwarzających indol w pochwie...

12. Cherpes T, Melan M, Kant J, [et al.]. Genital tract shedding of herpes simplex virus type 2 in women: effects of hormonal contraception, bacterial vaginosis, and vaginal group B Streptococcus colonization. *Clin Infect Dis*. 2005, 40, 1422-1428.
13. Maciejewski Z, Melnychuk J, Kopaczyk M, [et al.]. Ocena biocenozy pochwy w obecności zakażenia Chlamydia trachomatis u ciężarnych w I trymestrze ciąży. *Ginekol Pol*. 1991, 62, 7-9.
14. Schwebke J, Hillier S, Sobel J[et al.]. Validity of the vaginal gram stain for the diagnosis of bacterial vaginosis. *Obstet Gynecol*. 1996, 88, 573-576.
15. Tam M, Yungbluth M, Myles T. Gram stain method shows better sensitivity than clinical criteria for detection of bacterial vaginosis in surveillance of pregnant, low-income women in a clinical setting. *Infect Dis Obstet Gynecol*. 1998, 6, 204-208.
16. Myziuk L, Romanowski B, Johnson S. BVBlue test for diagnosis of bacterial vaginosis. *J Clin Microbiol*. 2003, 41, 1925-1928.
17. Hanna N, Taylor-Robinson D, Kalodiki-Karamanoli M, [et al.]. The relation between vaginal pH and the microbiological status in vaginitis. *Br J Obstet Gynaecol*. 1985, 92, 1267-1271.
18. Romanik M, Ekiel A, Friedek D, [et al.]. Can chlamydial cervicitis influence diagnosis of bacterial vaginosis? *J Clin Microbiol*. 2005, 43, 4914-4915.
19. Culhane J, Desanto D, Goldenberg R, [et al.]. Variation in Nugent score and leukocyte count in fluid collected from different vaginal sites. *Obstet Gynecol*. 2005, 105, 120-123.