



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
&
ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΑΘΗΝΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΜΑΙΕΥΤΙΚΗΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΕΡΕΥΝΑ ΣΤΗ ΓΥΝΑΙΚΕΙΑ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ»

**«ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΟΥ *C. trachomatis* ΣΕ ΓΥΝΑΙΚΕΣ ΜΕ
ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ ΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΣΕ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟ
ΠΑΛΘΥΣΜΟ, ΜΕΣΩ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΚΑΙ ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗΣ
ΕΞΕΤΑΣΗΣ ΙΣΤΟΥ ΠΕΡΙΟΔΟΥ»**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΤΣΙΡΙΓΩΤΗ ΑΓΓΕΛΙΚΗ

ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΒΙΟΛΟΓΟΣ

A.M.: 2010587

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

1. Φούκας Περικλής, Επίκουρος Καθηγητής, Β' Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής, Ιατρική Σχολή ΕΚΠΑ, ΠΓΝ Αττικών (Επιβλέπων)
2. Γαζούλη Μαρία, Επίκουρη Καθηγήτρια Μοριακής Βιολογίας, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ
3. Κωνσταντουλάκης Παντελεήμων, PhD, Μοριακός Βιολόγος-Γενετιστής

Αθήνα, 2013

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα της διπλωματικής εργασίας μου, Επίκουρο Καθηγητή κ. Περικλή Φούκα, για τη συνεργασία που είχαμε, την καθοδήγησή του και γενικά την πολύτιμη συμβολή του για την ολοκλήρωση αυτής της διπλωματικής εργασίας. Οφείλω ευχαριστίες στο δεύτερο μέλος της εξεταστικής επιτροπής της διπλωματικής μου εργασίας, Επίκουρη Καθηγήτρια κα Μαρία Γαζούλη για την προσεκτική ανάγνωση της εργασίας μου και τις πολύτιμες υποδείξεις της. Επίσης, είμαι ευγνώμων στον κ. Παντελεήμονα Κωνσταντουλάκη, τρίτο μέλος της εξεταστικής επιτροπής και επιστημονικό υπεύθυνο του εργαστηρίου Μοριακής Παθολογίας & Γενετικής του ιδιωτικού πολυϊατρείου *Locus-Medicus*, για την ευκαιρία που μου έδωσε να εκπονήσω τη διπλωματική μου εργασία στο ιδιωτικό αυτό πολυϊατρείο καθώς και για το αντικείμενο που μου πρότεινε να ασχοληθώ.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στον ιατρό παθολογοανατόμο - ανοσολόγο κ. Βασίλειο Τσιλιβάκο, υπεύθυνο του Τμήματος Διερεύνησης Υπογονιμότητας του πολυϊατρείου *Locus-Medicus* για τα ιατρικά ιστορικά των γυναικών με προβλήματα γονιμότητας που μου παρείχε, καθώς και για τις υποδείξεις του στην συγγραφή της εργασίας μου. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους ιατρούς γυναικολόγους κ. Αστέριο Κοραντζή και Βασίλειο Καπετάνιο για τα ιατρικά ιστορικά των γόνιμων γυναικών που είχαν την καλοσύνη να μου παρέχουν για την εκπόνηση της παρούσας εργασίας.

Επιπροσθέτως, ευχαριστώ πολύ την κ. Βασιλική Μίχου για τις οδηγίες της και για τη δημοσίευσή της στην οποία στηρίχτηκα για να εκπονήσω τη δική μου εργασία. Ευχαριστίες αρμόζουν επίσης στις κ. Χρυσούλα Κυπριανίδου και Ειρήνη Δεγαϊτη που με βοήθησαν στη συλλογή των δειγμάτων και στο κομμάτι της μοριακής μεθόδου και στις κ. Βάντα Γιαννούχου και Γεωργία Αυγέρου για τη βοήθειά τους στο κομμάτι της ιστολογίας και ανοσοϊστοχημείας. Ευχαριστώ, επίσης, την κ. Κατερίνα Μητρούση, μαία του γυναικολόγου κ. Βασίλειου Καπετάνιου για τη συλλογή των ιστορικών των γόνιμων γυναικών.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου για την υλική και ηθική υποστήριξή τους σε όλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	4
SYMMARY.....	6
1 ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	8
1.1 Υπογονιμότητα. Ορισμοί και επιδημιολογία.....	8
1.2 Αιτιολογία υπογονιμότητας.....	9
1.2.1 Ηλικία.....	10
1.2.2 Διαταραχές ωοθυλακιορρηξίας.....	10
1.2.3 Ανδρικός παράγοντας.....	12
1.2.4 Μητρικός παράγοντας.....	12
1.2.5 Τραχηλικός παράγοντας.....	13
1.2.6 Σαλπιγγικός-περιτοναϊκός παράγοντας.....	14
1.2.6.1 Ενδομητρίωση.....	14
1.2.6.2 Φλεγμονώδης νόσος της πυέλου (PID).....	15
1.2.7 Ανεξήγητη υπογονιμότητα.....	16
1.2.8 Ανοσολογικοί και Ιογενείς παράγοντες.....	16
1.2.9 Θρομβοφιλικός παράγοντας.....	17
1.2.10 Χρωμοσωμικός παράγοντας.....	17
1.2.11 Λοιμώδεις, μη ιογενείς παράγοντες.....	18
1.3 Χλαμύδια.....	19
1.3.1 Ταξινόμηση.....	19
1.3.2 Μορφολογικά χαρακτηριστικά.....	20
1.3.3 Κύκλος ζωής.....	21
1.3.4 Επιδημιολογία του <i>C. trachomatis</i>	23
1.3.5 Λοιμώξεις από <i>C. trachomatis</i>	26
1.3.5.1 Οφθαλμικές λοιμώξεις.....	27
1.3.5.2 Αφροδίσιο λεμφοκοκκίωμα (LGV).....	27
1.3.5.3 Λοιμώξεις γεννητικού συστήματος άρρενος.....	28
1.3.5.4 Λοιμώξεις γεννητικού συστήματος θήλεος.....	28
1.3.6 <i>C. trachomatis</i> και προβλήματα γονιμότητας στις γυναίκες.....	30
1.3.7 Ανοσολογική απόκριση στη λοίμωξη από <i>C. trachomatis</i>	31
1.3.8 Εργαστηριακή διάγνωση της λοίμωξης από <i>C. trachomatis</i>	32
1.3.8.1 Κυτταροκαλλιέργεια.....	32

1.3.8.2	Άμεσος ανοσοφθορισμός (Direct Immunofluorescence Assay-DFA).....	33
1.3.8.3	Ανοσοενζυμική μέθοδος (Enzyme Immune Assay-EIA).....	33
1.3.8.4	Ανίχνευση αντισωμάτων - Ορολογικές μέθοδοι.....	33
1.3.8.5	Μοριακές τεχνικές (NAATS).....	34
1.3.8.6	Ανοσοϊστοχημεία.....	37
1.3.9	Ιστός περιόδου ως υλικό εξέτασης για την ανίχνευση του <i>C. trachomatis</i>	39
2	ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	41
2.1	Σκοπός μελέτης.....	41
2.2	Υλικό.....	41
2.2.1	Ασθενείς.....	41
2.2.2	Δειγματοληψία.....	42
2.3	Μεθοδολογία.....	43
2.3.1	Απομόνωση DNA.....	43
2.3.2	Φωτομέτρηση DNA.....	44
2.3.3	Real-time PCR.....	45
2.3.4	Ανοσοϊστοχημεία.....	46
2.3.5	Μικροσκοπική παρατήρηση.....	49
2.4	Στατιστική ανάλυση.....	50
2.5	Αποτελέσματα.....	50
2.5.1	Μοριακή ανίχνευση.....	50
2.5.2	Ανοσοϊστοχημική ανίχνευση.....	54
2.6	Συζήτηση.....	57
3	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	61

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η λοίμωξη του γεννητικού συστήματος από *C. trachomatis* αποτελεί μια από τις πιο κοινές σεξουαλικά μεταδιδόμενες λοιμώξεις παγκοσμίως και έχει σοβαρό αντίκτυπο ιδιαίτερα στις γυναίκες και την αναπαραγωγική τους υγεία, καθώς το *C. trachomatis* συμβάλλει σε προβλήματα γονιμότητας.

Στόχοι της μελέτης ήταν οι εξής: α) Η χρήση του ιστού περιόδου ως υλικό για μοριακή ανίχνευση (real-time PCR) του *C. trachomatis* σε γυναίκες με προβλήματα γονιμότητας και γόνιμες γυναίκες, και β) η ανοσοϊστοχημική ανίχνευση του *C. trachomatis* σε επιλεγμένα δείγματα ιστού περιόδου, όπου ήταν εφικτό να πραγματοποιηθεί λόγω παρουσίας ενδομητρικού ιστού, ως επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων της μοριακής μεθόδου.

Στην παρούσα μελέτη συμπεριλήφθησαν δείγματα ιστού περιόδου Ελληνίδων γυναικών που παραπέμφθηκαν από τον Οκτώβριο του 2009 έως και τον Οκτώβριο του 2012 στο τμήμα Μοριακής Παθολογίας και Γενετικής του πολυϊατρείου Locus-Medicus. Την ομάδα των γυναικών με προβλήματα γονιμότητας αποτελούν 78 γυναίκες μέσης ηλικίας 31.16 ± 2.99 έτη, οι οποίες εξετάστηκαν στο Τμήμα Διερεύνησης Υπογονιμότητας του πολυϊατρείου Locus-Medicus, ενώ την ομάδα των γόνιμων γυναικών αποτελούν 43 γυναίκες μέσης ηλικίας 30.91 ± 2.78 έτη ($p > 0.05$). Η ανοσοϊστοχημική μέθοδος πραγματοποιήθηκε σε 8 από αυτά τα δείγματα ιστού περιόδου και σε 3 βιοψίες ενδομητρίου.

Το ποσοστό ανίχνευσης *C. trachomatis*, με τη μοριακή μέθοδο, στην ομάδα των γυναικών με προβλήματα γονιμότητας ήταν 38.5%, ενώ στην ομάδα των γόνιμων γυναικών ήταν 18.6%. Επιπλέον, *C. trachomatis* ανιχνεύτηκαν σε ποσοστό 38.9% των γυναικών οι οποίες δεν είχαν στο ιστορικό τους καμία σύλληψη. Η διαφορά των ποσοστών αυτών είναι στατιστικά σημαντική ($p < 0.05$). Όσον αφορά την ανοσοϊστοχημική μέθοδο, η παρουσία *C. trachomatis* στις 3 βιοψίες ενδομητρίου και στα 6 από τα 8 δείγματα ιστού περιόδου επαλήθευσαν τα αποτελέσματα της μοριακής μεθόδου.

Τα ποσοστά ανίχνευσης *C. trachomatis* στις γυναίκες με προβλήματα γονιμότητας είναι αρκετά υψηλά σε σχέση με τη βιβλιογραφία όπου το υλικό εξέτασης είναι κυρίως κολπο-τραχηλικά

επιχρίσματα, δείχνοντας τη μικροβιακή παρουσία κυρίως στο ανώτερο γεννητικό σύστημα της γυναίκας. Επιπροσθέτως, η χρήση της μοριακής μεθόδου real-time PCR σε δείγματα ιστού περιόδου θα μπορούσε να επεκταθεί και σε άλλου είδους μικρόβια που προσβάλλουν το γεννητικό σύστημα και πιθανά συμβάλλουν στην υπογονιμότητα.

SUMMARY

C. trachomatis infections are the most common sexually transmitted infections worldwide and have serious impact, particularly in women and their reproductive health, since *C. trachomatis* contributes to fertility problems.

The aims of the study were: a) the use of menstrual tissue as a material for molecular detection (real-time PCR) of *C. trachomatis* in women with fertility problems and fertile women, and b) the immunohistochemical detection of *C. trachomatis* in selective samples of menstrual tissue, in which endometrium was present, as a confirmation of the molecular detection.

In the present study menstrual tissue samples of Greek women were included that were referred from October 2009 till October 2012 in the Molecular Pathology and Genetics department in the polyclinic Locus-Medicus. The group of women with fertility problems consisted of 78 women of mean age 31.16 ± 2.99 years, who visited the Department of Infertility Investigation of Locus-Medicus, whereas, the group of fertile women consisted of 43 women with mean age of 30.91 ± 2.78 years ($p > 0.05$). Immunohistochemistry was performed in 8 menstrual tissue samples and in 3 endometrial biopsies.

The rate of *C. trachomatis* detection, with the molecular method, in the group of women with fertility problems was 38.5%, while in the group of fertile women was 18.6%. Moreover, *C. trachomatis* were detected in 38.9% of women who had no history of conceptions. The difference between those percentages is statistically significant ($p < 0.05$). With regard to the immunohistochemistry, the present of *C. trachomatis* in all 3 endometrial biopsies tested and in 6 out of the 8 menstrual tissue samples verified the results of the molecular method.

The *C. trachomatis* detection rates in women with fertility problems are higher than the ones published in the bibliography where examination materials are mainly vaginal-cervical swabs, suggesting that the microbial presence is located mainly in the upper genital tract. Furthermore, the use of molecular techniques (real-time PCR) on menstrual tissue samples could also be extended to the detections of other

microbes that are associated with infections of the genital tract and probably contribute to infertility.

1 ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 Υπογονιμότητα. Ορισμοί και επιδημιολογία

Η απόκτηση τουλάχιστον ενός παιδιού και κατά συνέπεια η οικογένεια είναι αναμφισβήτητα ένας από τους πιο πολυπόθητους στόχους στην ενήλικη ζωή των περισσότερων ανθρώπων. Ωστόσο, δεν καταφέρνουν όλα τα ζευγάρια να επιτύχουν μια εγκυμοσύνη και ένα ποσοστό αυτών καταφεύγουν σε ιατρική βοήθεια για την επίλυση προβλημάτων γονιμότητας (Boivin *et al.*, 2007).

Ως «υπογονιμότητα» ορίζεται η αδυναμία ενός ζευγαριού να επιτύχει εγκυμοσύνη μετά από χρονικό διάστημα ενός έτους (ή έξι μηνών όταν η γυναίκα είναι άνω των 35 ετών) τακτικών σεξουαλικών επαφών, χωρίς τη χρήση αντισυλληπτικών μέσων (Cooper *et al.*, 2010; Zegers-Hochschild *et al.*, 2009). Δεν πρέπει να συγχέεται με τον όρο «στεριότητα», που είναι η απόλυτη ανικανότητα πραγματοποίησης της σύλληψης και η οποία μπορεί να είναι αναστρέψιμη ή μη. Η υπογονιμότητα έχει αναγνωριστεί ως ζήτημα δημόσιας υγείας παγκοσμίως από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO, 1991).

Υπάρχουν ακόμα δύο όροι στην ξένη βιβλιογραφία: «fecundability» και «fecundity». «Fecundability» είναι η πιθανότητα επιτυχούς εγκυμοσύνης κατά τη διάρκεια ενός έμμηνου κύκλου με σεξουαλικές επαφές χωρίς προφύλαξη. «Fecundity» είναι η πιθανότητα επιτυχούς γέννησης ζώντος τέκνου κατά τη διάρκεια ενός έμμηνου κύκλου με σεξουαλικές επαφές χωρίς προφύλαξη (Habbema *et al.*, 2004).

Σχεδόν το 25% των ζευγαριών που δε χρησιμοποιούν αντισύλληψη θα επιτύχουν εγκυμοσύνη μέσα στον πρώτο μήνα, το 60% μέσα στους 6 μήνες και το 80% μέσα στους πρώτους 12 μήνες σεξουαλικής επαφής (Olsen, 1990). Εντούτοις, το 10-15% των ζευγαριών που βρίσκονται σε αναπαραγωγική ηλικία αντιμετωπίζουν προβλήματα υπογονιμότητας (Evers and Collins, 2003). Αυτό σημαίνει ότι 50-80 εκατομμύρια ζευγάρια παγκοσμίως είναι υπογόνιμα. Στην Ευρώπη το ποσοστό εκτιμάται γύρω στο 14%, ενώ σε ορισμένες δυτικοαφρικανικές κοινότητες στο 50%. Επίσης, διαφορές παρατηρούνται μεταξύ αναπτυγμένων χωρών, όπου το ποσοστό κυμαίνεται από 3.5% μέχρι 16.7% και λιγότερο αναπτυγμένων χωρών όπου τα ποσοστά υπογονιμότητας κυμαίνονται από 6.9% μέχρι 9.3%. Έχει επιπλέον παρατηρηθεί ότι τα αίτια σχετίζονται και με γεωγραφικές διαφορές. Ιδιαίτερα στις Δυτικές χώρες ο πιο κοινός

παράγοντας υπογονιμότητας είναι η ηλικία ενώ στην Αφρική τα σεξουαλικά μεταδιδόμενα νοσήματα (Benagiano *et al.*, 2006; Gnoth *et al.*, 2005; Kelly-Weeder and Cox, 2006; Boivin *et al.*, 2007). Στην Ελλάδα τα υπογόνημα ζευγάρια υπολογίζονται περίπου σε 250.000-300.000 (Λαϊνάς, 2002).

Στα προβλήματα γονιμότητας εντάσσονται και «αυτόματες αποβολές», δηλαδή η διακοπή της κύησης χωρίς ιατρική παρέμβαση πριν την 20^η εβδομάδα. Οι αποβολές μπορεί να είναι σποραδικές ή επαναλαμβανόμενες/ καθ' ἑξίν. Με τον όρο «καθ' ἑξίν αποβολές» ορίζουμε την απώλεια τριών ή περισσότερων συνεχόμενων κυήσεων πριν την ολοκλήρωση της 20^{ης} εβδομάδας στην καθεμία κύηση (Jauniaux *et al.*, 2006). Αποτελούν ένα πολύ σοβαρό αναπαραγωγικό πρόβλημα και συμβαίνει στο 0.5-1% των ζευγαριών (Regan, 1992). Η πιθανότητα μιας κλινικά εμφανούς αποβολής χωρίς εμφανή λόγο είναι 20%, των δύο αποβολών είναι 4% και των τριών είναι 1% (Stirrat, 1990). Μια κατηγορία των αυτόματων αποβολών είναι η παλίνδρομη κύηση, όπου σταματάει η ανάπτυξη του εμβρύου ενώ μπορεί να διατηρηθεί για μικρό χρονικό διάστημα η λειτουργία του πλακούντα. Το ποσοστό των κλινικά αναγνωρισμένων αποβολών, με εμφάνιση μετά την 6^η εβδομάδα κύησης, είναι περίπου 15% (Chard, 1991).

1.2 Αιτιολογία υπογονιμότητας

Η υπογονιμότητα μπορεί να οφείλεται στη γυναίκα, στον άντρα ή και στους δύο μαζί και μπορεί να είναι πρωτοπαθής ή δευτεροπαθής. Στην πρωτοπαθή υπογονιμότητα δεν υπάρχει στο παρελθόν καμία εγκυμοσύνη, ενώ στη δευτεροπαθή υπάρχει δυσκολία σύλληψης μετά από μια παρελθοντική εγκυμοσύνη, η οποία κατέληξε είτε σε γέννηση ζώντος τέκνου είτε σε αποβολή και έχει περάσει διάστημα τουλάχιστον ενός έτους (Eniola *et al.*, 2012). Υπολογίζεται ότι περίπου το 1/3 της υπογονιμότητας αποδίδεται σε γυναικείους παράγοντες, το 1/3 σε αντρικούς και το υπόλοιπο 1/3 σε συνδυασμό και των δύο ή θεωρείται ανεξήγητη (ASRM, 2008;90:S60).

1.2.1 Ηλικία

Ένα σημαντικό αίτιο υπογονιμότητας το οποίο αναγνωρίζεται όλο και περισσότερο τα τελευταία χρόνια είναι η ηλικία της συζύγου. Στις μέρες μας, λόγω των κοινωνικών συνθηκών, οι γυναίκες αναβάλουν την ηλικία τεκνοποίησης με αποτέλεσμα ένα σημαντικό ποσοστό ζευγαριών να παρουσιάζουν υπογονιμότητα λόγω προχωρημένης ηλικίας της γυναίκας. Φυσιολογικά η γονιμότητα των γυναικών ελαττώνεται δραματικά μετά την ηλικία των 35 ετών (Κρεατσάς, 2009). Η ελάττωση αυτή είναι αποτέλεσμα των διεργασιών που συμβαίνουν μέσα στην ωοθήκη συμπεριλαμβανομένης της μείωσης των ωοθυλακίων και της χαμηλής ποιότητας ωαρίων, γεγονός τα οποία συμβαίνουν με την αύξηση της ηλικίας (Klein and Sauer, 2001). Μια φυσιολογική γυναίκα έχει το 12% των αποθεμάτων των ωοθηκών της στην ηλικία των 30 ετών και το 3% στην ηλικία των 40 ετών (Wallace *et al.*, 2010).

1.2.2 Διαταραχές ωοθυλακιορρηξίας

Διαταραχές ωοθυλακιορρηξίας παρατηρούνται στο 15% των υπογόνιμων ζευγαριών και στο 40% των υπογόνιμων γυναικών (Mosher and Pratt, 1991). Το ιστορικό εμμήνου ρύσεως της γυναίκας παρέχει μια ακριβή εκτίμηση της ωορρηξίας. Γυναίκες με φυσιολογικό κύκλο 25-35 ημερών έχουν ωοθυλακιορρηξία στο 95% των περιπτώσεων χωρίς την εφαρμογή άλλης μεθόδου (Rosenfeld and Garcia, 1976). Η ύπαρξη ωοθυλακιορρηκτικών κύκλων βεβαιώνεται και με άλλους τρόπους, όπως με τη μέτρηση της βασικής θερμοκρασίας του σώματος, τη μέτρηση προγεστερόνης του αίματος, τη μέτρηση της αύξησης της LH στα ούρα, τη βιοψία ενδομητρίου και το υπερηχογράφημα.

Η βασική θερμοκρασία του σώματος υποδηλώνει έμμεσα την αύξηση των επιπέδων της προγεστερόνης, ως επακόλουθο της ωορρηξίας, μετρώντας τη θερμογόνο δράση της προγεστερόνης (Greene, 2000). Τα αυξημένα επίπεδα της προγεστερόνης επάγουν μια διαρκή αύξηση της βασικής θερμοκρασίας του σώματος της τάξεως του 0.3 °C-0.6 °C, η οποία συνήθως διαρκεί 11 έως 14 ημέρες μετά την ωορρηξία. Η ωοθυλακιορρηξία συμβαίνει 24 ώρες πριν την έναρξη της αύξησης αυτής, αλλά δεν είναι δυνατόν να προβλέψουμε με ακρίβεια το χρόνο (Carr, 1991; Guermandi *et al.*, 2001).

Η μέτρηση της προγεστερόνης αίματος πρέπει να γίνεται την 21^η μέρα του κύκλου σε έναν κύκλο 28 ημερών. Επίπεδο προγεστερόνης

μεγαλύτερο από 3ng/ml υποδηλώνει ωορρηξία. Ωστόσο, λόγω της παλμικής έκκρισης της προγεστερόνης κατά την ωχρινική φάση, ένας απλός προσδιορισμός της δεν είναι πάντα αξιόπιστος και μπορεί να υπάρχουν ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα (Steele *et al.*, 1985).

Ο μέτρηση της ωχρινοτρόπου ορμόνης LH στα ούρα μπορεί να προσδιορίσει την απότομη αύξηση της LH που προηγείται της ωορρηξίας από μια έως δύο ημέρες. Αυτός ο τρόπος βοηθά να καθοριστεί το χρονικό διάστημα της μέγιστης γονιμότητας της γυναίκας στη διάρκεια του κύκλου της. Ωστόσο, και πάλι μπορεί να έχουμε ψευδώς θετικά και ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα λόγω της ακρίβειας, της αξιοπιστίας και της ευκολίας χρήσης που ποικίλουν μεταξύ των διαφόρων προϊόντων (ASRM, 2008;90:S1-6; McGovern *et al.*, 2004).

Η βιοψία ενδομητρίου και η ιστολογική του εξέταση μπορούν να αποδείξουν την παρουσία εκκριτικού ενδομητρίου, το οποίο είναι αποτέλεσμα της δράσης της προγεστερόνης και υποδηλώνει ωορρηξία. Παρόλα αυτά, η μέθοδος αυτή δεν μπορεί να διαχωρίσει τις γόνιμες από της υπογόνιμες γυναίκες. Γι αυτό το λόγο δε συστήνεται πλέον ως μέθοδος εκτίμησης της ωοθυλακιορρηξίας σε υπογόνιμες γυναίκες, παρά μόνο για εντοπισμό ενδομητρικής παθολογίας (Coutifaris *et al.*, 2004).

Το διακολπικό υπερηχογράφημα μπορεί να αποκαλύψει το μέγεθος και τον αριθμό των αναπτυσσόμενων ωοθυλακίων και να παρέχει την ένδειξη ωοθυλακιορρηξίας μέσω της παρατηρούμενης μείωσης του όγκου του ωοθυλακίου και την εμφάνιση υγρού στο Δουγλάσσειο χώρο (Crespigny *et al.*, 1981).

Αίτια των διαταραχών ωοθυλακιορρηξίας αποτελούν κυρίως ο υποθυρεοειδισμός, η υπερπρολακτιναιμία, το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών, η παχυσαρκία, η έντονη άσκηση και η απότομη αλλαγή βάρους.

Η παρουσία υποθυρεοειδισμού σε γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας κυμαίνεται από 2% έως 4% (Bjoro *et al.*, 2000). Στον πρωτοπαθή υποθυρεοειδισμό τα επίπεδα της θυροξίνης T4 είναι χαμηλά και υπάρχει μειωμένο αρνητικό feedback στον υποθαλαμο-υποφυσιακό άξονα. Σαν αποτέλεσμα, η αυξανόμενη έκκριση της θυρεοεκλυτικής ορμόνης TRH αυξάνει με τη σειρά της τα επίπεδα της θυρεοειδοτρόπου ορμόνης TSH και της προλακτίνης και έτσι έχουμε ωοθηκική δυσλειτουργία.

Κατά την υπερπρολακτιναιμία παρατηρείται αναστολή στην κατά ώσεις έκκριση της γοναδοτρόπου ορμόνης GnRH και κατά συνέπεια της

LH και FSH. Επιπλέον έχουμε αναστολή της μεσοκυκλικής αιχμής της LH με αποτέλεσμα την ανωοθυλακιορρηξία (Wilson, 1992).

Το σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών αποτελεί την πιο συχνή ωοθηκική ανωμαλία και την πιο συνηθισμένη ενδοκρινοπάθεια στις γυναίκες. Για να έχει μια γυναίκα το σύνδρομο, θα πρέπει να πληροί τουλάχιστον δύο από τα εξής κριτήρια: ανωοθυλακιορρηξία/αραιομηνόρροια, κλινική ή βιοχημική υπερανδρογοναιμία και εικόνα πολυκυστικών ωοθηκών στο υπερηχογράφημα. Εξαιρείται ο συνδυασμός ανωοθυλακιορρηξίας με μορφολογία πολυκυστικών ωοθηκών χωρίς υπερανδρογοναιμία (Rotterdam, 2004).

1.2.3 Ανδρικός παράγοντας

Εργαστηριακά, η σοβαρότητα του ανδρικού παράγοντα υπογονιμότητας αξιολογείται με την ανάλυση σπέρματος. Η ανάλυση σπέρματος μας παρέχει πληροφορίες σχετικά με τη συγκέντρωση, την κινητικότητα και τη μορφολογία του σπέρματος. Τα κριτήρια για να θεωρηθεί ένα σπέρμα φυσιολογικό είναι τα εξής: όγκος 1.5-5.0 ml, PH >7.2, συγκέντρωση >20x10⁶, συνολικός αριθμός σπερματοζωαρίων >40x10⁶, κινητικότητα >50%, φυσιολογική μορφολογία >30% (κριτήρια WHO), συγκολλητικότητα <2 (σε κλίμακα από 0 έως 3), ιξώδες <3 (σε κλίμακα από 0 έως 4) (ASRM, 2006;86:S203-209).

Επιπλέον παράγοντες ανδρικής υπογονιμότητας αποτελούν ενδοκρινικές (διαταραχές στην υπόφυση και τον υποθάλαμο) και ανοσολογικές (αντισπερματικά αντισώματα) διαταραχές, ανατομικές (υποσπαδίας), γενετικές (κυστική ίνωση) και χρωμοσωμικές (σύνδρομο Klinefelter, μικροελλείψεις του χρωμοσώματος Y) ανωμαλίες, η κίρσοκήλη, η ύπαρξη λευκοκυττάρων στο σπέρμα, φλεγμονές και τραύματα των όρχεων (ASRM, 2006;86:S203-209; Steckel *et al.* 1993, Sigman, 1997).

1.2.4 Μητρικός παράγοντας

Η μήτρα, ως το κύριο όργανο για τη διατήρηση της εγκυμοσύνης, έχει και αυτή τη συμβολή της στην υπογονιμότητα. Μεταξύ των παραγόντων της μήτρας που προκαλούν υπογονιμότητα, αξιοσημείωτοι είναι οι ενδομητρικοί πολύποδες, τα λειομύματα και ενδομητρικές συμφύσεις (σύνδρομο Asherman). Δυσπλασίες της μήτρας όπως μονόκερη, δίκερη, απλαστική ή υποπλαστική ευθύνονται περισσότερο

για αποβολές και πρόωρους τοκετούς πάρα για δυσκολίες στη γονιμοποίηση (Heinonen *et al.*, 1982). Η κύρια μέθοδος για τον έλεγχο των ανωμαλιών της μήτρας είναι η υστεροσαλπιογραφία (Simpson *et al.*, 2006).

Τα λειομύωματα είναι τα συχνότερα καλοήγη νεοπλάσματα της μήτρας και εμφανίζονται σε ποσοστό μεγαλύτερο του 20% του γυναικείου πληθυσμού. Αποτελούνται από δεσμίδες λείων μυϊκών κυττάρων μονοκλωνικής προέλευσης και ίνες συνδετικού ιστού. Μπορούν να προκαλέσουν υπογονιμότητα είτε διαταράσσοντας την φυσιολογική ανατομία της ενδομητρικής κοιλότητας, είτε αποφράσσοντας τα μητρικά στόμια των σαλπύγγων. Κακή, επίσης, αιμάτωση και κυκλοφορία στη μήτρα μπορεί να προκαλέσει προβλήματα στην εμφύτευση του εμβρύου (Wallach *et al.*, 2004).

Ενδομητρικοί πολύποδες είναι προεκβολές του ενδομητρίου προς την ενδομητρική κοιλότητα. Η αιτιοπαθολογία τους στην πρόκληση υπογονιμότητας δεν είναι απόλυτα γνωστή και εκτός της απόφραξης των σαλπυγγικών στομίων, της παρεμπόδισης της διόδου των σπερματοζωαρίων και της διαταραχής της φυσιολογικής ανατομίας της ενδομητρικής κοιλότητας, πιθανόν να συμμετέχουν και άλλοι παράγοντες όπως φλεγμονές, διαταραχές αιμάτωσης κτλ (Κρεατσάς, 2009).

Το σύνδρομο Asherman αποτελεί μία κατάσταση κατά την οποία το λειτουργικό ενδομήτριο αντικαθίσταται από συνδετικό ιστό και έχουμε ανάπτυξη ενδομήτριων συμφύσεων (Buckley, 2002). Υπογονιμότητα υπάρχει στο 43% των περιπτώσεων του συνδρόμου και οφείλεται σε αποκλεισμό των σαλπυγγικών στομίων, του τραχηλικού αυλού ή σε μείωση της ακεραιότητας της ενδομήτριας κοιλότητας. Ακόμη, οι συμφύσεις είναι δυνατόν να παρεμποδίζουν την κίνηση των σπερματοζωαρίων ή και την εμφύτευση του γονιμοποιημένου ωαρίου στο ενδομήτριο (Schenker *et al.*, 1982).

1.2.5 Τραχηλικός παράγοντας

Ο τράχηλος παίζει σημαντικό ρόλο στην προστασία της άνω γεννητικής οδού από λοιμώξεις. Η παραγωγή βλέννης είναι αυτή που παρέχει το φραγμό προστασίας. Στο πρώτο μισό το έμμηνο κύκλου, πριν την ωορρηξία, η βλέννη είναι άφθονη και ρευστή και τα σπερματοζωάρια μπορούν εύκολα να διεισδύσουν σε αυτήν και να εισέλθουν στη μήτρα (Harris-Glocker and McLaren, 2013). Σε ορισμένες όμως

γυναίκες η τραχηλική βλέννη μπορεί να εμποδίσει τα σπερματοζώαρια να κινηθούν ελεύθερα μέσα στη μήτρα, γεγονός που μπορεί να οφείλεται είτε στο ότι δεν υπάρχει αρκετή βλέννη, είτε στο ότι η βλέννη είναι παχιά και κολλώδης, είτε στο ότι η βλέννη δεν είναι συμβατή με το σπέρμα.

Η δοκιμασία στην οποία αξιολογείται η ποσότητα και η ποιότητα της παραγόμενης βλέννης, καθώς και η αλληλεπίδραση σπέρματος-βλέννης είναι η μετά τη συνουσία δοκιμασία (postcoital test – PCT) και πρέπει να εφαρμόζεται 2 ή 3 μέρες πριν την ωορρηξία και 2 με 12 ώρες μετά τη σεξουαλική επαφή. Στην τρέχουσα πρακτική όμως η δοκιμασία αυτή σπανίως χρησιμοποιείται (Makar and Toth, 2002).

1.2.6 Σαλπγγικός-περιτοναϊκός παράγοντας

Ένα από τα σημαντικότερα αίτια της γυναικείας υπογονιμότητας είναι η παθολογία των σαλπίγγων. Σαλπγγικοί και περιτοναϊκοί παράγοντες ευθύνονται για την υπογονιμότητα του 30-35% των υπογόνιμων ζευγαριών (Harris-Glocker and McLaren, 2013). Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας το ποσοστό υπογονιμότητας σαλπγγικού παράγοντα στο σύνολο της υπογονιμότητας, κυμαίνεται από λιγότερο από 40% στις αναπτυγμένες χώρες μέχρι πάνω από 85% στις αναπτυσσόμενες χώρες (WHO, 1987). Στους σαλπγγικούς και περιτοναϊκούς παράγοντες συμπεριλαμβάνονται η ενδομητρίωση, η φλεγμονώδης νόσος της πυέλου (pelvic inflammatory disease – PID), πυελικές συμφύσεις, απόφραξη σαλπίγγων, υδρόσάλπιγγα, καθώς και επίκτητες βλάβες λόγω χειρουργικής επέμβασης είτε στην ίδια τη σάλπιγγα, είτε σε άλλα όργανα της πυέλου και της περιτοναϊκής κοιλότητας (Evers JL, 2002). Η διάγνωση της παθολογίας των σαλπίγγων γίνεται με την υστεροσαλπγγογραφία, όπου χρωστική ενίεται στη μήτρα και τις σάλπιγγες για να διαπιστωθεί πιθανή απόφραξη των σαλπίγγων, και με τη λαπαροσκόπηση (Simpson *et al.*, 2006).

1.2.6.1 Ενδομητρίωση

Η ενδομητρίωση χαρακτηρίζεται από την έκτοπη ανάπτυξη ενδομητρικού ιστού (αδένων και στρώματος) εκτός της κοιλότητας της μήτρας. Η επίπτωση στο γενικό πληθυσμό είναι περίπου 5-10%, ενώ στις υπογόνιμες γυναίκες το ποσοστό ανέρχεται στο 20-55% (Buyalos and Agarwal, 2000).

Η συσχέτιση της ενδομητρίωσης με την υπογονιμότητα μπορεί να αποδοθεί σε διάφορους μηχανισμούς. Οι εστίες ενδομητρίωσης μπορούν να προκαλέσουν συμφύσεις και σχηματισμό ουλών, οι οποίες διαταράσσουν την επικοινωνία σάλπιγγας-ωοθήκης ή να προκαλέσουν απόφραξη των σαλπίγγων. Επίσης, σε ορισμένους ασθενείς με ενδομητρίωση έχουν παρατηρηθεί διαταραχές της ωοθυλακιογένεσης, ωοθυλακιορρηξίας ή και της ωχρινικής λειτουργίας, οι οποίες μπορεί να επηρεάσουν δυσμενώς τη γονιμότητα. Ακόμα, ασθενείς με ενδομητρίωση εμφανίζουν στο περιτοναϊκό τους υγρό παράγοντες όπως προσταγλανδίνες, παρακρινικές ορμόνες, πρωτεολυτικά ένζυμα, μονοκινάσες, αυτοαντισώματα, ενεργοποιημένα μακροφάγα και συμπλήρωμα. Αυτοί οι παράγοντες μπορεί να είναι εμβρυοτοξικοί και μπορούν να επηρεάσουν την ωοθηκική λειτουργία, την κινητικότητα και επιβίωση του σπέρματος και τη σαλπιγγική μεταφορά (Κρεατσάς, 2009; ASRM, 2006;86:S156-60).

1.2.6.2 Φλεγμονώδης νόσος της πυέλου (PID)

Η φλεγμονώδης νόσος της πυέλου (pelvic inflammatory disease - PID) συνίσταται από μια ποικιλία λοιμώξεων που επηρεάζουν τα όργανα της πυέλου και προκαλούνται από διάφορους μικροοργανισμούς, όπως βακτήρια, και από φλεγμονώδεις καταστάσεις τμημάτων του γαστρεντερικού σωλήνα που βρίσκονται στην περιοχή της πυέλου, όπως σαλπιγγίτιδα (Eniola *et al.*, 2012). Το *Chlamydia trachomatis* και η *Neisseria gonorrhoea* είναι από τα πιο συχνά σεξουαλικά μεταδιδόμενα νοσήματα που παίζουν ρόλο στην απόφραξη των σαλπίγγων μετά από πυελική φλεγμονή (Falcone, 2001). Άλλοι μικροοργανισμοί, όπως το μυκόπλασμα (*Mycoplasma hominis*), το ουρεάπλασμα (*Ureaplasma urealyticum*) και στρεπτόκοκκοι ομάδας A μπορεί επίσης να εμπλέκονται στην αιτιολογία της σαλπιγγίτιδας. Το ουρεάπλασμα σχετίζεται πιο πολύ με αυτόματες αποβολές. Επιπρόσθετα, η PID ενοχοποιείται σαν ο κύριος παράγοντας κινδύνου για έκτοπη κύηση και χρόνια πυελικό πόνο (Westrom *et al.*, 1992; Haggerty *et al.*, 2003).

Υπολογίζεται ότι μετά από ένα επεισόδιο πυελικής φλεγμονής το 10% των γυναικών εμφανίζει υπογονιμότητα. Το ποσοστό αυτό αυξάνεται στο 20% μετά από δύο επεισόδια και στο 40% μετά από τρία ή περισσότερα επεισόδια (Westrom, 1994).

1.2.7 Ανεξήγητη υπογονιμότητα

Ανεξήγητη υπογονιμότητα παρουσιάζουν περίπου το 15% των ασθενών με υπογονιμότητα. Η διάγνωση της ανεξήγητης υπογονιμότητας είναι μια διαδικασία αποκλεισμού. Γίνεται συνήθως εφόσον δεν επιβεβαιώνεται κάποια διαταραχή. Μια τυπική διερεύνηση περιλαμβάνει μέτρηση προγεστερόνης ορού για τη διερεύνηση ωοθυλακιορρηξίας, ανάλυση σπέρματος, υστεροσαλπιγγογραφία και αν ενδείκνυται η λαπαροσκόπηση. Η πιθανότητα να είναι φυσιολογικές οι παραπάνω εξετάσεις, δηλαδή το ζευγάρι να έχει ανεξήγητη υπογονιμότητα είναι περίπου 15% (Aboulghar *et al.*, 2003). Οι βασικές θεραπείες για την ανεξήγητη υπογονιμότητα περιλαμβάνουν την παρακολούθηση του ζευγαριού μετά από επαφές τις γόνιμες ημέρες, την ωοθηκική διέγερση με κιτρική κλομιφαίνη ή με γοναδοτροπίνες σε συνδυασμό με την ενδομήτρια σπερματέγχυση (IUI). Αν δεν προκύψει εγκυμοσύνη μετά από 3 με 6 θεραπευτικούς κύκλους τότε συστήνεται εξωσωματική γονιμοποίηση (IVF) (ASRM, 2006;86:S111-4).

1.2.8 Ανοσολογικοί και Ιογενείς παράγοντες

Η πλειοψηφία των ανοσολογικών αιτιών υπογονιμότητας φαίνεται ότι αποδίδεται σε ιογενείς κυρίως λοιμώξεις της γυναίκας. Συγκεκριμένα, η παρουσία ερπητοϊών, όπως ο ιός του απλού έρπητα, είναι η βασικότερη αιτία της αύξησης κάποιων τοξικών κυττάρων στο αίμα που είναι γνωστά σαν NK κύτταρα - natural killer cells ή φυσικοί φονείς (Thomas *et al.*, 2005). Τα κύτταρα αυτά συνιστούν το 5-12% του συνόλου των λεμφοκυττάρων και ταξινομούνται σε $CD16^+/CD56^+$, $CD16^+/CD56^-$ και $CD16^-/CD56^+$ σύμφωνα με τους δείκτες επιφανείας τους. Ο κύριος πληθυσμός που υπάρχει στο ενδομήτριο στην διάρκεια δημιουργίας του πλακούντα και παραμένει σε υψηλά επίπεδα σε όλη την εμφυτευτική επιφάνεια είναι ο $CD16^-/CD56^+$ και είναι ο λιγότερο κυτταροτοξικός (Thum *et al.*, 2004; Saito *et al.*, 2008; Moffett-King, 2002). Η παρουσία των NK κυττάρων έχει το ρόλο της στην υπογονιμότητα και στις αυτόματες αποβολές (Fukui *et al.*, 1999; Kwak *et al.*, 1995; Moffett *et al.*, 2004). Η συγκέντρωση και το ποσοστό αυτών των κυττάρων στο περιφερικό αίμα έχουν χρησιμοποιηθεί για να προβλεφτεί η επιτυχία εμφύτευσης και της έκβασης της κύησης (Michou *et al.*, 2003; Coulam *et al.*, 1995). Το φυσιολογικό εύρος των $CD56^+$ NK κυττάρων στο αίμα κυμαίνεται από 5-12% επί του συνόλου των λεμφοκυττάρων. Ποσοστό μεγαλύτερο του

12% σε γυναίκες με υπογονιμότητα ή αποβολές, αποτελεί ένδειξη για θεραπεία (Kwak *et al.*, 2000).

1.2.9 Θρομβοφιλικός παράγοντας

Θρομβοφιλικοί παράγοντες παίζουν ρόλο στην υπογονιμότητα, κυρίως όμως στις αυτόματες αποβολές (Coulam and Jeyendran, 2009; Behjati *et al.*, 2006; Mierla *et al.*, 2012). Υπάρχει αυξημένη δυνατότητα θρομβώσεων των αγγείων του ενδομητρίου στην περιοχή εμφύτευσης με αποτέλεσμα την αναστολή της ροής του αίματος μέσα στα αγγεία και την ανεπαρκή τροφοδοσία του εμβρύου με θρεπτικά συστατικά. Ιστολογική εξέταση των μητροπλακουντιακών αγγείων και του μεσολάχιου χώρου μετά από αυτόματη αποβολή, δείχνει αυξημένη εναπόθεση ινώδους, θρόμβωση, αλλαγές στο ενδοθήλιο και την τροφοβλάστη οφειλόμενες στην υποξία (Abbate *et al.*, 2002). Υπεύθυνες για θρομβοφιλία είναι κυρίως τρεις μεταλλάξεις: η μετάλλαξη G1691A του γονιδίου FV-Leiden (παράγοντας πήξης αίματος V), η μετάλλαξη G20210A του γονιδίου Factor II (προθρομβίνη) και η μετάλλαξη C677T του γονιδίου MTHFR (ομοκυστεΐνη) (Rai and Regan, 2006), καθώς και ο πολυμορφισμός 4G/4G του γονιδίου PAI-1. Μοριακός έλεγχος αυτών των μεταλλάξεων ή πολυμορφισμών συνιστάται για τον εντοπισμό θρομβοφιλικών αιτιών της ανεξήγητης υπογονιμότητας και των αυτόματων αποβολών. Πέραν βέβαια των κληρονομικών παραγόντων θρομβοφιλίας, σημαντικό ρόλο παίζουν και μη κληρονομικοί παράγοντες που συνήθως σχετίζονται με αυτοάνοσες καταστάσεις, όπως η παρουσία αντιπηκτικού λύκου ή αντιφωσφολιπιδικού συνδρόμου.

1.2.10 Χρωμοσωμικός παράγοντας

Χρωμοσωμικές ανωμαλίες παρουσιάζονται σε περιπτώσεις γυναικείας και ανδρικής υπογονιμότητας (αδυναμία σύλληψης με φυσικό τρόπο ή μετά από IVF), καθώς και στην περίπτωση καθ' ἑξιν αποβολών, όπου η πιθανότητα ένας από τους δυο γονείς να είναι φορέας χρωμοσωμικής ανακατάταξης είναι 4% (Clifford *et al.*, 1994). Υπολογίζεται ότι καρυοτυπικές ανωμαλίες των εμβρύων ευθύνονται για το 50% των αυτόματων αποβολών πρώτου τριμήνου (Kalousek *et al.*, 1993). Όμως τις περισσότερες φορές δεν γίνεται διαγνωστική απόξεση και έτσι δεν λαμβάνεται υλικό για καρυοτυπική ανάλυση.

Παρόλο που στις περισσότερες περιπτώσεις η υπογονιμότητα δεν σχετίζεται με χρωμοσωμικές ανωμαλίες, υπάρχουν κάποιες εξαιρέσεις, στις οποίες ο παθολογικός καρύοτυπος είναι το κύριο αίτιο της υπογονιμότητας. Στις γυναίκες τέτοιες περιπτώσεις είναι το σύνδρομο Turner (45, XO) ή σύνδρομο Turner σε μωσαϊκισμό (45,XO/46,XX) και η τρισωμία X (47,XXX) ή η τρισωμία X σε μωσαϊκισμό (47,XXX/46,XX). Στον άνδρα μια χρωμοσωμική ανωμαλία, όπως προαναφέραμε, είναι το σύνδρομο Klinefelter (47,XXY) και οι μικροελλείψεις του χρωμοσώματος Y. Επίσης, η μετάθεση τύπου Robertson (κεντρική σύντηξη δύο ακροκεντρικών χρωμοσωμάτων στα ζεύγη 13, 14, 15, 21 και 22) σε έναν από τους δύο γονείς, είναι ακόμα μια ανωμαλία που σχετίζεται με υπογονιμότητα και αυτόματες αποβολές (Fryns and Van Buggenhout, 1998).

1.2.11 Λοιμώξεις, μη ιογενείς παράγοντες

Η όλο και αυξανόμενη επικράτηση των σεξουαλικά μεταδιδόμενων λοιμώξεων αποτελεί ένα σημαντικό ζήτημα υγείας, ιδιαίτερα εκείνων που εμπλέκονται στη γυναικεία υπογονιμότητα. Οι λοιμώξεις αν παραμείνουν χωρίς θεραπεία μπορεί να έχουν σοβαρές συνέπειες, όπως αποβολές, πρόωρο τοκετό, απόφραξη σαλπίγγων, συμφύσεις, έκτοπη κύηση, χρόνια πυελικό πόνο, υπογονιμότητα. Οι λοιμώξεις που αφορούν την πύελο είναι η πιο σημαντική αιτία υπογονιμότητας, κυρίως ως αποτέλεσμα της βλάβης των σαλπίγγων (Rhoton-Vlasak, 2000; Radek *et al.*, 2013).

Οι μικροοργανισμοί που προκαλούν τις λοιμώξεις στο γεννητικό σύστημα της γυναίκας και ενοχοποιούνται για προβλήματα στη γονιμότητα είναι, σύμφωνα με τη μέχρι τώρα βιβλιογραφία, κυρίως (όπως προαναφέραμε και στην ενότητα του σαλπιγγικού- περιτοναϊκού παράγοντα) *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoea*, μυκόπλασμα (*Mycoplasma hominis*) και ουρεάπλασμα (*Ureaplasma urealyticum*) (Eschenbach *et al.*, 1988). Τα *Chlamydia trachomatis* και *Neisseria gonorrhoea* είναι οι κύριες αιτίες για την PID, μέσω της απόφραξης των σαλπίγγων (Falcone, 2001; Radek *et al.*, 2013). Στα *C. trachomatis* και στα Χλαμύδια γενικότερα θα αναφερθούμε εκτενέστερα στη συνέχεια.

Το βακτήριο *N. gonorrhoea* προκαλεί οξεία γονοκοκκική λοίμωξη στις γυναίκες, η οποία χαρακτηρίζεται από κολπίτιδα, φλεγμονή παραουρηθρικών αδένων (Skene glands), Bartholinίτιδα, σαλπιγγίτιδα,

περιτονίτιδα και PID (Κρεατσάς, 2009). Υπολογίζεται ότι η λοίμωξη από *N. gonorrhoea* παρουσιάζεται σε ποσοστό 0,5-1% μεταξύ των υπογόνιμων γυναικών (Taylor *et al.*, 2011; Imudia *et al.*, 2008).

Τα *M. hominis* και *U. urealyticum* έχουν συσχετιστεί με αυτόματες αποβολές, με λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος που περιλαμβάνουν την πυελονεφρίτιδα, με τη λοιμώδη νόσο της πυέλου και με χοριοαμνιονίτιδα (Harger *et al.*, 1983; Taylor-Robinson, 1996; Mardh and Westrom, 1970; Thomsen *et al.*, 1979; Cassell *et al.*, 1983). Επίσης, έχουν συσχετιστεί και με υπογονιμότητα, αν και το *U. urealyticum* εμφανίζεται πιο πολύ στις αυτόματες αποβολές (Miron *et al.*, 2013; Imudia *et al.*, 2008; Capoccia *et al.*, 2013).

1.3 Χλαμύδια

1.3.1 Ταξινόμηση

Αρχικά, τα χλαμύδια είχαν τοποθετηθεί σε ξεχωριστή τάξη Chlamydiales, οικογένεια Chlamydiaceae με ένα γένος, τα Chlamydia, και αναγνωρισμένα είδη το *C. trachomatis*, το *C. psittaci*, το *C. pneumoniae* και το *C. pecorum*. Από το 1999, όμως, προτάθηκε μια νέα ταξινόμηση των χλαμυδίων βάσει της ανάλυσης των γονιδιακών αλληλουχιών 16S και 23S του ριβοσωμικού RNA. Τα μέλη της τάξης Chlamydiales ομαδοποιήθηκαν σε τέσσερις οικογένειες:

α) οικογένεια Chlamydiaceae με δύο γένη, Chlamydia και Chlamydophila. Στο γένος Chlamydia περιλαμβάνονται τρία είδη: το *C. trachomatis*, το *C. suis* και το *C. muridarum*. Στο γένος Chlamydophila περιλαμβάνονται έξι είδη: το *C. psittaci*, το *C. pneumoniae*, το *C. pecorum*, το *C. felis*, το *C. caviae* και το *C. abortus* (Everett *et al.*, 1999; Everett and Andersen 1999).

β) οικογένεια Simkaniaceae με το είδος *Simkania negevensis*.

γ) οικογένεια Parachlamydiaceae με το είδος *Parachlamydia acanthamoeba*.

δ) οικογένεια Waddliaceae με το είδος *Waddlia chondrophila* (Rurangirwa *et al.*, 1999).

Επομένως, σύμφωνα με τη νέα ταξινόμηση το *C. trachomatis* ανήκει στην τάξη Chlamydiales, οικογένεια Chlamydiaceae και γένος Chlamydia.

Το *C. trachomatis* διακρίνεται σε δύο βιοτύπους: τον οφθαλμογεννητικό βióτυπο και τον βióτυπο LGV. Η διάκριση αυτή αντανακλά θεμελιώδεις διαφορές στη μολυσματικότητά τους και την εμπλοκή τους σε λοιμώξεις του ανθρώπου. Ο οφθαλμογεννητικός βióτυπος προκαλεί το ελάχιστο διεισδυτικό τράχωμα, επιπεφυκίτιδα, λοιμώξεις οφθαλμών και γεννητικού συστήματος και αντιδραστική αρθρίτιδα. Το τράχωμα είναι μια ασθένεια που προσβάλλει τον οφθαλμό με τη δημιουργία νέων αιμοφόρων αγγείων και ουλών στον κερατοειδή χιτώνα. Ο βióτυπος LGV προκαλεί αφροδίσιο λεμφοκοκκίωμα, μια πιο διεισδυτική λοίμωξη του γεννητικού συστήματος, που σχετίζεται με βλάβες του λεμφικού ιστού. Και οι δύο βióτυποι διαιρούνται σε οροτύπους με βάση επιτόπους της μείζονος πρωτεΐνης της εξωτερικής μεμβράνης (MOMP). Ο οφθαλμογεννητικός βióτυπος περιλαμβάνει 15 οροτύπους, που χαρακτηρίζονται A-K. Ο βióτυπος LGV περιλαμβάνει τρεις οροτύπους, που χαρακτηρίζονται L1, L2 και L3. Δεν είναι σπάνιο ένα άτομο με λοίμωξη του γεννητικού συστήματος να είναι μολυσμένο με περισσότερους από έναν ορότυπο ταυτόχρονα (Greenwood, 2010; Madigan, 2005).

1.3.2 Μορφολογικά χαρακτηριστικά

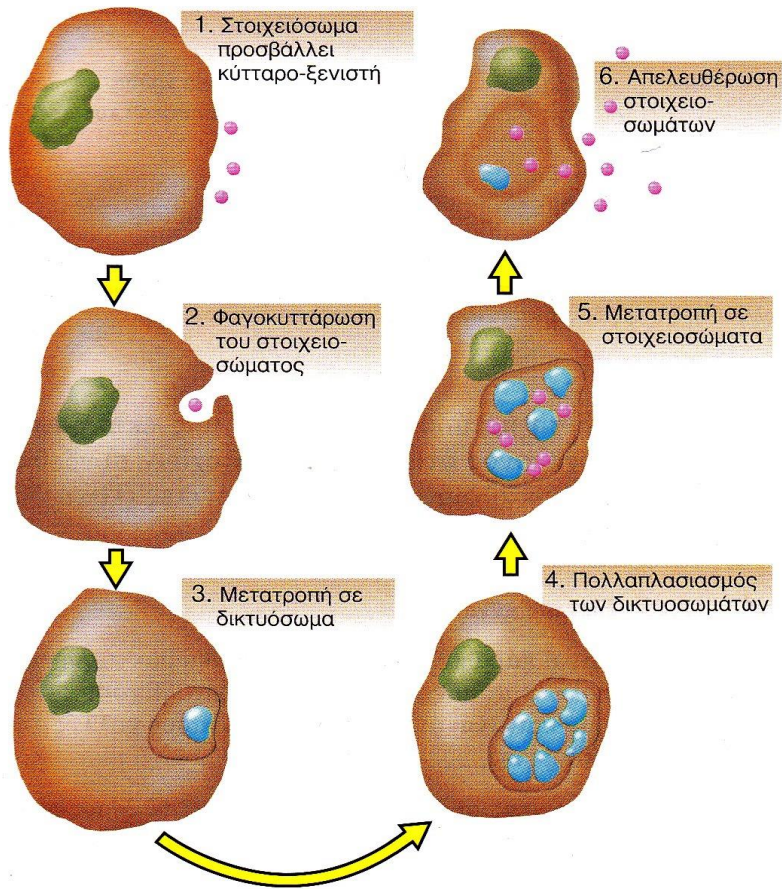
Ο όρος *Chlamydia* προέρχεται από την αρχαία ελληνική λέξη «χλαμύς», η οποία δόθηκε για να αποδώσει τη θέση του ενδοκυτταροπλασματικού εγκλείστου γύρω από τον πυρήνα του κυττάρου ξενιστή. Τα χλαμύδια είναι υποχρεωτικά ενδοκυτταρικά παρασιτικά βακτήρια των ευκαρυωτικών κυττάρων με μικρή μεταβολική ικανότητα. Είναι Gram αρνητικά παθογόνα βακτήρια, περιέχουν DNA και RNA και έχουν κυτταρικό τοίχωμα ανάλογο εκείνου των Gram αρνητικών βακτηρίων, δηλαδή διαθέτουν τον τυπικό λιποπολυσακχαρίτη (LPS) με ασθενή δράση ενδοτοξίνης, που φέρει έναν ειδικό αντιγονικό καθοριστή των χλαμυδίων. Για μεγάλο χρονικό διάστημα θεωρούσαν ότι τα χλαμύδια ήταν ενεργειακά παράσιτα, που τα μόρια υψηλής ενέργειας για βιοσύνθεση (ATP) έπρεπε να παρέχονται από το κύτταρο-ξενιστή. Ωστόσο, αυτή η υπόθεση αμφισβητείται ύστερα από πολλές μελέτες και από την ανάλυση του γονιδιώματός τους (Pliffe-Lee and McClarty, 1999; Greenwood, 2010). Τα χλαμύδια έχουν ένα από τα μικρότερα γονιδιώματα μεταξύ των βακτηρίων με αλληλουχία μήκους περίπου 1.2 Mb, η οποία κωδικοποιεί 700 πρωτεΐνες. Ο προσδιορισμός της αλληλουχίας των

γονιδίων, αποκαλύπτει γονίδια που κωδικοποιούν μεταβολικές οδούς παραγωγής τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP), καθώς και μόρια απαραίτητα για τη σύνθεση πεπτιδογλυκάνης, πενικιλλινοδεσμευτικών πρωτεϊνών και του κύριου ενισχυτικού συστατικού των βακτηριακών κυτταρικών τοιχωμάτων. Ένα ακόμα ενδιαφέρον χαρακτηριστικό του γονιδιώματος των χλαμυδίων είναι η απουσία του γονιδίου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη FtsZ, απαραίτητη για τη δημιουργία διαφράγματος κατά την κυτταροδιαίρεση. Το στέλεχος *C. trachomatis* και αρκετά ακόμα χλαμύδια, φέρουν ένα κρυπτικό πλασμιδίο άγνωστης λειτουργίας. Ωστόσο, δεδομένου ότι σχεδόν πάντοτε υπάρχουν πολλαπλά αντίγραφα του πλασμιδίου αυτού στο *C. trachomatis*, αποτελεί ένα ιδιαίτερα χρήσιμο στόχο για την ανίχνευση και τη διάγνωση χλαμυδιακών λοιμώξεων με μοριακές μεθόδους (Greenwood, 2010).

1.3.3 Κύκλος ζωής

Τα μέλη του γένους *Chlamydia* παρουσιάζουν διφασικό κύκλο ζωής και μολύνουν επιθηλιακά κύτταρα. Διακρίνονται δύο κυτταρικοί τύποι: το στοιχειώδες σωματίο (elementary body – EB) και το δικτυωτό σωματίο (reticulate body – RB). Το στοιχειώδες σωματίο είναι μικρό σε μέγεθος (~0.3 μm), είναι εξωκυττάρια μορφή, μεταβολικά αδρανές, μη αναπτυσσόμενο και έχει την ικανότητα έναρξης της λοίμωξης με την προσκόλληση και την είσοδό του στο κύτταρο ξενιστή. Το δικτυωτό σωματίο είναι μεγαλύτερο σε μέγεθος (~1 μm), είναι ενδοκυττάρια μορφή, μεταβολικά δραστικό, μη μολυσματικό και διαιρείται με απλή διχοτόμηση (Moulder, 1991; Madigan, 2005). Ο κύκλος ζωής των χλαμυδίων (Εικ. 1) ξεκινάει με την προσκόλληση ενός στοιχειώδους σωματίου στο κύτταρο-ξενιστή, συνήθως κοντά στη βάση των μικρολαχνών και την επακόλουθη είσοδό του στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου με τη διαδικασία της φαγοκυττάρωσης. Εκεί, στο κυτταρικό έγκλειστο, το στοιχειώδες σωματίο μετατρέπεται σε δικτυωτό σωματίο και αυτό με τη σειρά του πολλαπλασιάζεται με απλή διχοτόμηση. Στη συνέχεια, τα πολλαπλασιασμένα δικτυωτά σωματία μετατρέπονται ξανά σε στοιχειώδη σωματία, τα οποία απελευθερώνονται όταν τα κύτταρα του ξενιστή αποσυντεθούν και τότε μπορούν να μολύνουν άλλα κύτταρα. Ο κύκλος ολοκληρώνεται σε 48 ώρες περίπου (Madigan, 2005). Στην Εικ. 2 φαίνεται ένα επιθηλιακό κύτταρο σάλπιγγας 72 ώρες μετά τη μόλυνση να

διαρρηγνύεται και να απελευθερώνει ώριμα στοιχειώδη σωμάτια (μικρά μαύρα στρογγυλά σωμάτια).



Εικόνα 1: Σχηματική αναπαράσταση του κύκλου ζωής των χλαμυδίων (Madigan, 2005).



Εικόνα 2: Επιθηλιακό κύτταρο σάλπιγγας διαρρηγνύεται και απελευθερώνει ώριμα στοιχειώδη σωματίδια (Cooper *et al.*, 1999).

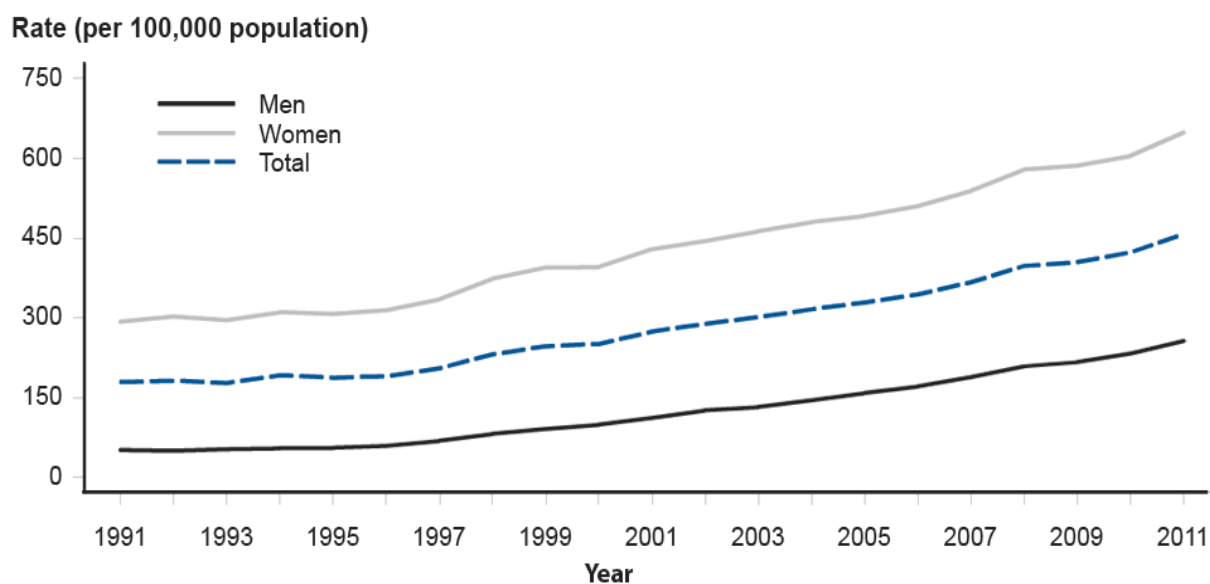
1.3.4 Επιδημιολογία του *C. trachomatis*

Οι λοιμώξεις από *C. trachomatis* είναι οι πιο διαδεδομένες σεξουαλικά μεταδιδόμενες λοιμώξεις βακτηριακής αιτιολογίας που έχουν αναγνωριστεί παγκοσμίως. Υπολογίζεται ότι πάνω από 90 εκατομμύρια νέα περιστατικά συμβαίνουν κάθε χρόνο, γεγονός που συμβάλλει και σε σημαντική νοσηρότητα και σε κοινωνικο-οικονομική επιβάρυνση παγκοσμίως (Paavonen and Eggert-Kruse, 1999; Gerbase *et al.*, 1998). Άτομα ηλικίας <25 ετών, άγαμα, με δύο ή περισσότερους συντρόφους τα τελευταία χρόνια, έχει δειχθεί ότι έχουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης γλαυμοδιακών λοιμώξεων σε σχέση με άτομα μεγαλύτερης ηλικίας (Stergachis *et al.*, 1993).

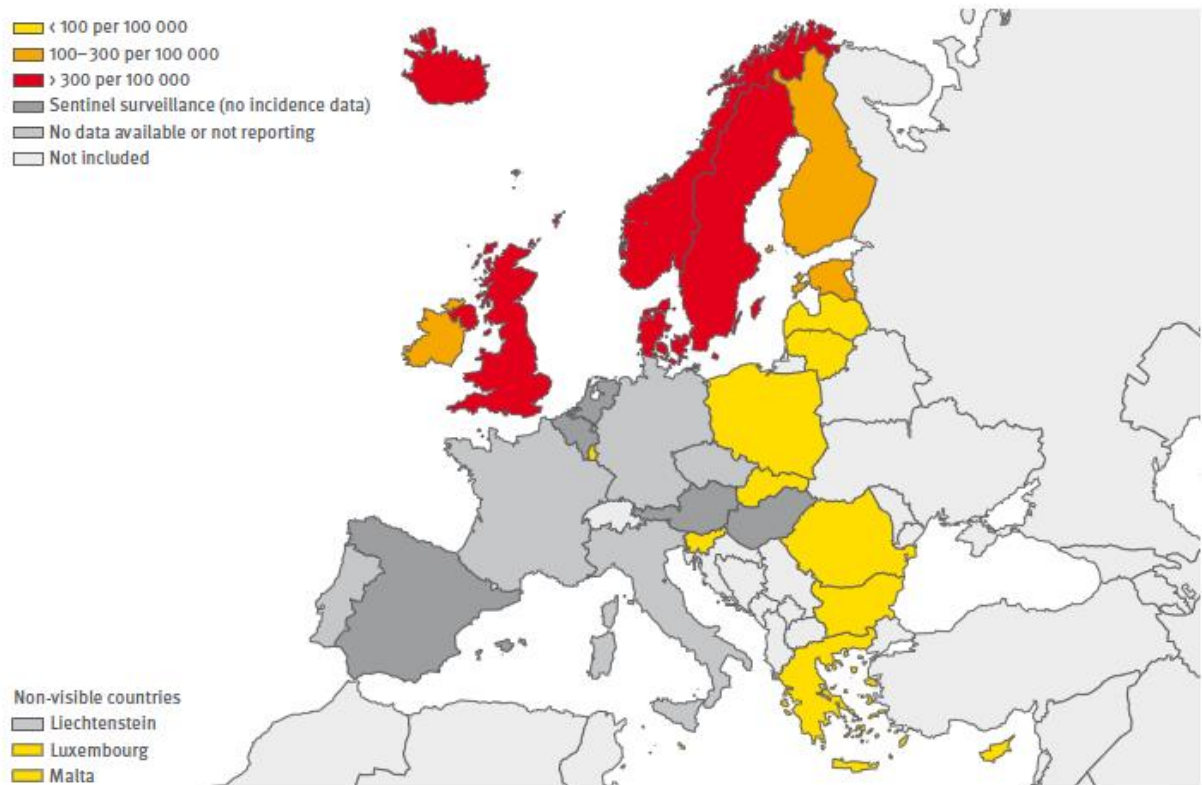
Στις ΗΠΑ, συγκεκριμένα σε 50 πολιτείες, σύμφωνα με το CDC (Centres for Disease Control and Prevention) το 2011 καταμετρήθηκαν 1.412.791 περιστατικά λοιμώξεων από *C. trachomatis*. Το ποσό αυτό αντιστοιχεί σε 457,6 κρούσματα ανά 100.000 κατοίκους. Μεταξύ των ετών 1991 και 2011 το ποσοστό των γλαυμοδιακών λοιμώξεων έχει αυξηθεί από 179,7 σε 457,6 περιστατικά ανά 100.000 κατοίκους. Το ποσοστό λοιμώξεων στις γυναίκες είναι πάνω από 2,5 φορές μεγαλύτερο σε σχέση με το αντίστοιχο των ανδρών (Εικ. 3).

Σύμφωνα με έρευνα του ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control) σε 24 χώρες της Ευρώπης το 2010

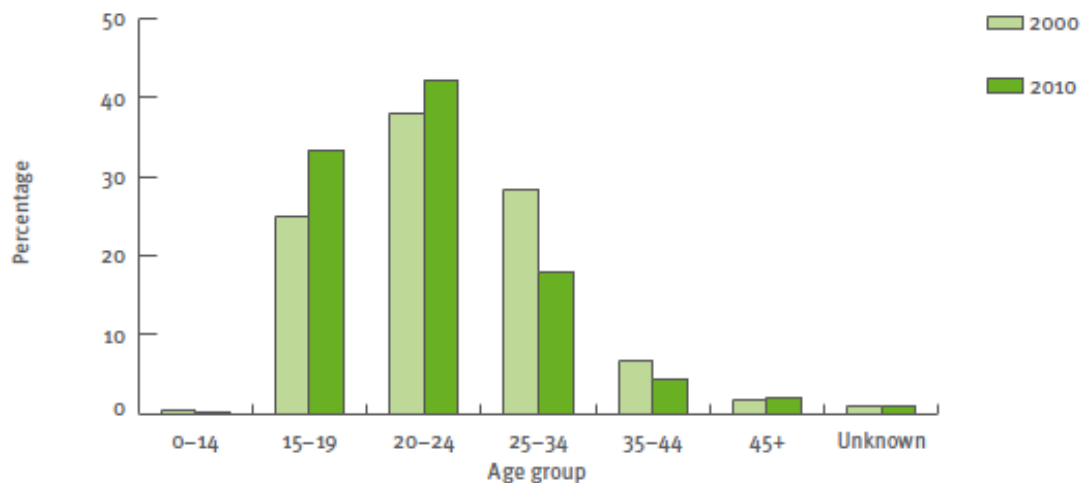
καταμετρήθηκαν 345.421 περιστατικά λοιμώξεων από *C. trachomatis*, εκ των οποίων το 88% είναι από τις χώρες Δανία, Νορβηγία, Σουηδία και Ηνωμένο Βασίλειο. Το *C. trachomatis* παρατηρήθηκε πιο συχνά στις γυναίκες από ότι στους άνδρες με αναλογία 203 κρούσματα ανά 100.000 γυναίκες και 145 κρούσματα ανά 100.000 άνδρες. Στην Εικόνα 4 φαίνεται παραστατικά ο αριθμός των κρουσμάτων από *C. trachomatis* ανά 100.000 κατοίκους στις χώρες της Ευρώπης. Όπως παρατηρείται, τα περισσότερα κρούσματα εντοπίζονται στις χώρες, Ισλανδία, Σουηδία, Νορβηγία, Δανία και Ηνωμένο Βασίλειο. Στην Εικόνα 5 παρουσιάζεται η διανομή των ηλικιών σε ποσοστά από τις χλαμυδιακές λοιμώξεις μεταξύ των ετών 2000 και 2010 σε 7 και 16 χώρες της Ευρώπης αντίστοιχα. Το μεγαλύτερο ποσοστό κρουσμάτων παρατηρείται στις ηλικίες 20-24 με ποσοστό 42% το 2010 και ακολουθείται από το ποσοστό 33% που σημειώθηκε στις ηλικίες 15-19 το 2010. Τα ποσοστά μειώνονται προοδευτικά με την αύξηση της ηλικίας. Στην Εικόνα 6 παρουσιάζεται η προοδευτική αύξηση των περιστατικών *C. trachomatis* ανά 100.000 πληθυσμό, σε γυναίκες και άνδρες, από το 1995 έως το 2009 σε 8 χώρες της Ευρώπης (Δανία, Εσθονία, Φινλανδία, Ισλανδία, Ιρλανδία, Λετονία, Σουηδία και Ηνωμένο Βασίλειο) (ECDC, 2012).



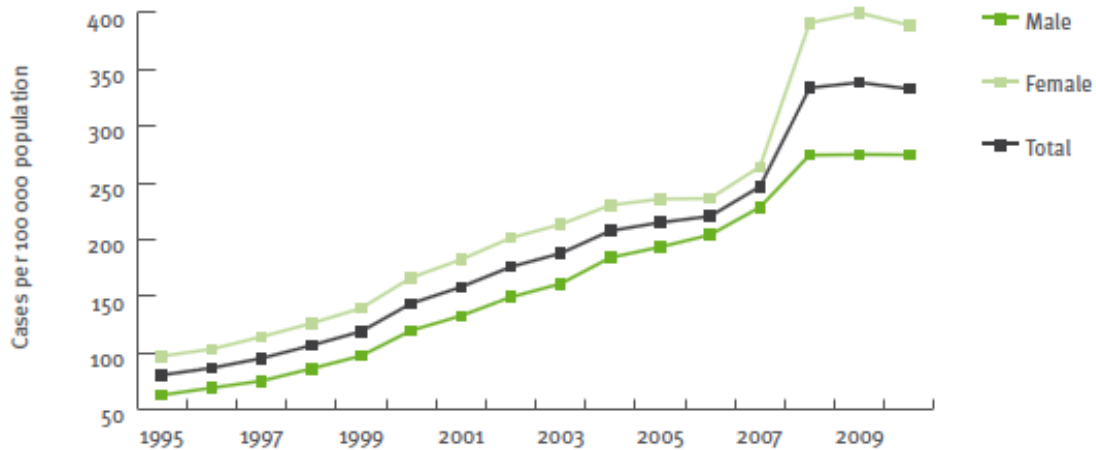
Εικόνα 3: Περιστατικά *C. trachomatis* ανά 100.000 πληθυσμό στις ΗΠΑ μεταξύ 1991-2011 (CDC).



Εικόνα 4: Περιστατικά *C. trachomatis* ανά πληθυσμό 100.000 το 2010 στην Ευρώπη (ECDC, 2012).



Εικόνα 5: Περιστατικά *C. trachomatis* κατηγοριοποιημένα σε ηλικίες μεταξύ 2000 (7 χώρες) και 2010 (16 χώρες) στην Ευρώπη (ECDC, 2012).



Εικόνα 6: Περιστατικά *C. trachomatis* ανά 100.000 πληθυσμό σε 8 χώρες τις Ευρώπης μεταξύ 1995-2009 (ECDC, 2012).

Όσον αφορά την Ελλάδα, από τον Οκτώβρη του 1998 έως το Μάιο του 2004, σε μελέτη που διενεργήθηκε σε τέσσερα κέντρα συμμετείχαν 17.869 ασθενείς εκ των οποίων 16.834 γυναίκες 18-55 ετών και 1.035 άνδρες 18-65 ετών. Η συχνότητα των χλαμυδιακών λοιμώξεων στις γυναίκες ήταν 3.5% (4.1% ασυμπτωματικές και 2.9% συμπτωματικές) και στους άνδρες ήταν 11.2%, όπου όλοι ήταν συμπτωματικοί. Το 88% αυτών των περιπτώσεων αφορούν ηλικίες κάτω των 30 ετών. Η μικρή ηλικία και οι πολλαπλοί σύντροφοι σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο, καθώς το 14% των ασθενών που είχαν περισσότερους από έναν συντρόφους τον τελευταίο χρόνο εμφανίζουν χλαμυδιακή λοίμωξη (Levidiotou *et al.*, 2005).

1.3.5 Λοιμώξεις από *C. trachomatis*

Το *C. trachomatis* προσβάλει το γεννητικό σύστημα ανδρών και γυναικών αλλά και τον οφθαλμό. Το μεγαλύτερο πρόβλημα που υπάρχει όσο αφορά την αντιμετώπιση των χλαμυδιακών λοιμώξεων του γεννητικού συστήματος είναι ότι ποσοστό 70-80% των γυναικών και 50% των αντρών που έχουν προσβληθεί από χλαμύδια είναι ασυμπτωματικοί (Thejls *et al.*, 1991; Zelin *et al.*, 1995). Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα πολλές λοιμώξεις να μένουν αθεράπευτες και με την πάροδο του χρόνου να οδηγούν σε βλάβες του γεννητικού συστήματος τόσο των γυναικών όσο και των ανδρών.

1.3.5.1 Οφθαλμικές λοιμώξεις

Στις οφθαλμικές λοιμώξεις που προκαλούνται από *C. trachomatis* περιλαμβάνονται κυρίως το τράχωμα, η επιπεφυκίτιδα εξ εγκλείστων των ενηλίκων και η χλαμυδιακή νεογνική οφθαλμία.

Το τράχωμα είναι κερατοεπιπεφυκίτιδα που αρχίζει σαν οξεία φλεγμονή και καταλήγει σε σχηματισμό ουλής και τύφλωση. Το ενεργό τράχωμα είναι κυρίως νόσος των παιδιών και χαρακτηρίζεται από την παρουσία λεμφοειδών θυλακίων του επιπεφυκότα και από διαλείπουσα διασπορά των χλαμυδίων. Αντίθετα, τύφλωση παρατηρείται κυρίως στους ενήλικες. Προκαλείται από δημιουργία ουλώδους ιστού στον επιπεφυκότα, η οποία οδηγεί σε παραμόρφωση των βλεφάρων (εντρόπιο) και τραυματισμό του επιπεφυκότα από τις βλεφαρίδες (τριχίαση). Οι ορότυποι που προκαλούν το τράχωμα είναι οι A, B, Ba και C (Greenwood, 2010).

Η επιπεφυκίτιδα εξ εγκλείστων των ενηλίκων (παρατράχωμα) μεταδίδεται από τα γεννητικά όργανα στους οφθαλμούς. Στην οξεία φάση εκδηλώνεται ως θυλακιώδης επιπεφυκίτιδα συχνά με βλεννοπυώδες έκκριμα. Ωστόσο, η λοίμωξη είναι πιο ήπια, συνήθως αυτοπεριοριζόμενη και σπανίως προκαλεί απώλεια όρασης (Greenwood, 2010).

Η χλαμυδιακή νεογνική οφθαλμία παρατηρείται σε νεογνά περίπου 14 ημερών. Η νόσος εκδηλώνεται με οίδημα των βλεφάρων και περικογχικό οίδημα, υπεραιμία και πυώδη διήθηση του επιπεφυκότα (βλεννόρροια εξ εγκλείστων). Στο νεογνό το μικρόβιο μεταδίδεται από τον μολυσμένο από χλαμύδια τράχηλο της μητέρας κατά τον τοκετό (Greenwood, 2010).

1.3.5.2 Αφροδίσιο λεμφοκοκκίωμα (LGV)

Το αφροδίσιο λεμφοκοκκίωμα (Lymphogranuloma venereum – LGV) είναι λοίμωξη του γεννητικού συστήματος ανδρών και γυναικών που προκαλείται από τους οροτύπους L1-L3 του *C. trachomatis*. Χαρακτηρίζεται από διόγκωση και διαπύηση των βουβωνικών λεμφαδένων. Η νόσος είναι ενδημική σε χώρες της Ασίας, Αφρικής, Βορείου Αμερικής και Καραϊβικής. Η πρώτη εκδήλωση της νόσου εμφανίζεται στα γεννητικά όργανα, τον πρωκτό ή σε άλλη θέση. Από εκεί η λοίμωξη μεταφέρεται με τα λεμφαγγεία και εμφανίζεται διόγκωση των επιχωρίων λεμφαδένων, με ιστολογική εικόνα νεκρωτικής

κοκκιωματώδους λεμφαδενίτιδας. Το τελικό στάδιο της νόσου χαρακτηρίζεται από την ανάπτυξη ινώδους ιστού και στενωμάτων στο γεννητικό σωλήνα ή το ορθό. Στο ορθό εντοπίζεται η νόσος σε ομοφυλόφιλους. Εάν η νόσος παραμείνει χωρίς θεραπεία μπορεί να καταλήξει σε ελεφαντίαση της γεννητικής περιοχής (Schachter *et al.*, 1983).

1.3.5.3 Λοιμώξεις γεννητικού συστήματος άρρενος

Στους άνδρες το *C. trachomatis* προκαλεί κυρίως ουρηθρίτιδα, χρόνια προστατίτιδα και επιδιδυμίτιδα.

Το *C. trachomatis* είναι η κυριότερη αιτία της μη γονοκοκκικής ουρηθρίτιδας στον άνδρα. Τα συμπτώματά της στους συμπτωματικούς άνδρες είναι δυσουρία, συχνουρία και βλεννοπυώδες έκκριμα. Η ουρηθρίτιδα όμως είναι συχνά ασυμπτωματική, γεγονός που κάνει τους μολυσμένους άνδρες να λειτουργούν ως δεξαμενές της λοίμωξης στην κοινότητα (Holmes *et al.*, 1975; Quinn *et al.*, 1996).

Το *C. trachomatis* σε νεαρής ηλικίας άνδρες μπορεί να προκαλέσει οξεία προστατίτιδα. Τα συμπτώματα της προστατίτιδας είναι κυρίως πόνος του περινέου, πόνος στο κάτω μέρος της πλάτης και πόνος κατά την ούρηση ή την εκσπερμάτωση. Περισσότεροι από ένας στους πέντε άνδρες με χρόνια προστατίτιδα, με προφανή φλεγμονή στις προστατικές εκκρίσεις έχουν ενδείξεις χλαμυδιακής λοίμωξης. Αυτό υποδηλώνει ότι το *C. trachomatis* μπορεί να είναι ένας από τους αιτιολογικούς παράγοντες της χρόνιας προστατίτιδας (Ostaszewska *et al.*, 1998).

Οξεία επιδιδυμίτιδα είναι πιο συχνή σε άνδρες ηλικίας κάτω των 35 ετών (Scheibel *et al.*, 1983). Επιδιδυμίτιδα οφειλόμενη σε *C. trachomatis* είναι ηπιότερης μορφής από εκείνη οφειλόμενη σε *Neisseria gonorrhoea* και *Escherichia coli*. Ωστόσο, μπορεί να προκαλέσει μόνιμη απόφραξη των πόρων και κατά συνέπεια υπογονιμότητα λόγω αζωοσπερμίας (Greenwood, 2010; Beerger *et al.*, 1978).

1.3.5.4 Λοιμώξεις γεννητικού συστήματος θήλεος

Στις γυναίκες, όπως προαναφέρθηκε, οι λοιμώξεις του γεννητικού συστήματος είναι σε ποσοστό 70-80% ασυμπτωματικές με αποτέλεσμα να εμμένουν χρόνιες παθήσεις με δυσμενή αποτελέσματα στο γεννητικό σύστημα της γυναίκας (Thejls *et al.*, 1991). Στο υπόλοιπο ποσοστό τα συμπτώματα της λοίμωξης από *C. trachomatis* είναι βλεννοπυώδης κολπική έκκριση, δυσουρία, συχνουρία, κοιλιακό άλγος,

μετασυνουσιακή ή ανώμαλη αιμορραγία, τοπική ερυθρότητα, κνησμός, οίδημα του κόλπου και δυσπαρεύνια (Κρεατσάς, 2009).

Λοιμώξεις και επιπλοκές του γεννητικού συστήματος της γυναίκας οφειλόμενες σε *C. trachomatis* είναι κυρίως ουρηθρίτιδα, τραχηλίτιδα, ενδομητρίτιδα, σαλπινγίτιδα, PID, χρόνιος πυελικός πόνος, υπογονιμότητα σαλπινγικού παράγοντα, έκτοπη κύηση και αποβολές (Schachter, 1978; Cates and Wasserheit, 1991; Greenwood, 2010).

Οι περισσότερες γυναίκες με χλαμυδιακή τραχηλίτιδα είναι ασυμπτωματικές ή αναφέρουν μη ειδικά συμπτώματα όπως κολπικές εκκρίσεις ή μετασυνουσιακή αιμορραγία. Η χλαμυδιακή τραχηλίτιδα μπορεί να είναι μικτή λοίμωξη. Στο έκκριμα τραχήλου μαζί με χλαμύδια είναι δυνατόν να ανευρίσκονται *Candida*, τριχομονάδα, ιός του έρπητα και άλλα. Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων η χλαμυδιακή τραχηλίτιδα συνυπάρχει με τη χλαμυδιακή ουρηθρίτιδα. Χλαμύδια έχουν βρεθεί ακόμα και στο 1/3 των περιπτώσεων γονοκοκκικής τραχηλίτιδας αλλά και σε 4-20% των γυναικών που δεν είχαν συμπτώματα τραχηλίτιδας (Marrazzo *et al.*, 2002). Η επέκταση της λοίμωξης μπορεί να φτάσει στο ενδομήτριο προκαλώντας ενδομητρίτιδα, στην οποία τα χλαμύδια επιβιώνουν την μηνιαία αποβολή του ενδομητρίου κατά την περίοδο. Περεταίρω επέκταση της λοίμωξης μπορεί να μολύνει τις σάλπιγγες προκαλώντας σαλπινγίτιδα και PID (Greenwood, 2010).

Ένα ποσοστό περίπου 20% των γυναικών με λοίμωξη του γεννητικού συστήματος από *C. trachomatis* αναπτύσσουν PID (Paavonen and Eggert-Kruse, 1999). Όπως προαναφέρθηκε σε αντίστοιχη ενότητα, η νόσος αυτή συνίσταται από φλεγμονώδεις καταστάσεις τμημάτων του γενετικού σωλήνα που βρίσκονται στην περιοχή της πυέλου και μπορεί να προκαλέσει συμφύσεις και απόφραξη των σαλπίγγων. Συνήθως στην PID συνυπάρχουν σημάδια και ενδομητρίτιδας και σαλπινγίτιδας. Τα κλινικά συμπτώματα της νόσου είναι μη ειδικά και είναι εύκολο να μη διαγνωστεί σε γυναίκες με ήπια συμπτώματα, καθώς μπορεί να μην υπάρχει σχέση μεταξύ της σοβαρότητας των συμπτωμάτων και της σοβαρότητας της εξέλιξης της νόσου. Τα πιο συνηθισμένα συμπτώματα είναι χαμηλό κοιλιακό άλγος, δυσπαρεύνια, ανώμαλη κολπική αιμορραγία, ρίγη, πυρετός. Υπάρχει και ένα ποσοστό γυναικών στο οποίο δεν παρατηρείται κανένα σύμπτωμα (Manavi, 2006).

Μακροχρόνιες συνέπειες της PID είναι η υπογονιμότητα σαλπινγικού παράγοντα, η έκτοπη κύηση και ο χρόνιος πυελικός πόνος

(Westrom *et al.*, 1992; Haggerty *et al.*, 2003; Hu *et al.*, 2004). Όπως προαναφέρθηκε, μετά από ένα επεισόδιο πυελικής φλεγμονής, ο σχετικός παράγοντας κινδύνου για υπογονιμότητα είναι περίπου 10%. Κάθε επανάληψη τέτοιου επεισοδίου διπλασιάζει τον παράγοντα κινδύνου και επομένως είναι 20% μετά από δύο επεισόδια και σχεδόν 40% μετά από τρία ή περισσότερα επεισόδια (Westrom, 1994). Γυναίκες με ιστορικό πυελικής νόσου έχουν 7 έως 10 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης έκτοπης κύησης σε σύγκριση με γυναίκες χωρίς ανάλογο ιστορικό (Westrom, 1980; Westrom *et al.*, 1981). Ο χρόνιος πυελικός πόνος συμβαίνει σε ποσοστό γυναικών 24-75% με ιστορικό PID, ενώ αυτός που προκαλείται από *C. trachomatis* χωρίς απαραίτητα την παρουσία PID, συμβαίνει σε ποσοστό 4% των γυναικών (Paavonen and Eggert-Kruse, 1999).

1.3.6 *C. trachomatis* και προβλήματα γονιμότητας στις γυναίκες

Λόγω της «σιωπηλής» φύσης της λοίμωξης από *C. trachomatis*, οι περισσότερες γυναίκες είναι ασυμπτωματικές και έτσι δεν εντοπίζεται η λοίμωξη με αποτέλεσμα να μένουν αθεράπευτες (Akande *et al.*, 2010). Οι γυναίκες των οποίων η χλαμυδιακή λοίμωξη μένει αθεράπευτη για πολύ καιρό, με ή χωρίς ιστορικό PID, μπορεί να έχουν δυσμενείς επιπτώσεις στο αναπαραγωγικό τους σύστημα, όπως υπογονιμότητα (κυρίως σαλπινγικού παράγοντα), έκτοπη κύηση και δυσμενή έκβαση της εγκυμοσύνης (Mardh, 2002; Cates and Wasserheit, 1991). Υπολογίζεται ότι περίπου το 3% των γυναικών με λοίμωξη του γεννητικού συστήματος από *C. trachomatis* θα αναπτύξει υπογονιμότητα και το 2% θα έχει δυσμενή έκβαση της εγκυμοσύνης (Paavonen and Eggert-Kruse, 1999). Από την άλλη, περίπου το 25% των γυναικών με υπογονιμότητα σαλπινγικού παράγοντα έχουν χλαμυδιακή λοίμωξη (Gump *et al.*, 1983; Khron *et al.*, 1995). Αποδεδειγμένα, πάντως, η PID οφειλόμενη σε *C. trachomatis* είναι ο πιο σημαντικός παράγοντας υπογονιμότητας και δυσμενούς έκβασης της εγκυμοσύνης, στην οποία νόσο αναφερθήκαμε εκτενέστερα στην προηγούμενη ενότητα.

Υπάρχουν ενδείξεις ότι το *C. trachomatis* μπορεί επίσης να συμβάλλει σε επιπλοκές της εγκυμοσύνης εκτός της έκτοπης κύησης, όπως πρόωρη ρήξη των μεμβρανών, πρόωρο τοκετό, χαμηλό βάρος γέννησης και θνησιγονία. Αποβολές, σποραδικές ή καθ' έξιν, ίσως μπορούν να προκληθούν από ασυμπτωματική λοίμωξη από *C. trachomatis* μέσω της λειτουργίας ανοσολογικών μηχανισμών (Witkin and

Ledger, 1992; Witkin, 1995; Baud *et al.*, 2011) αν και δεν έχει βρεθεί σε όλες τις μελέτες τέτοια συσχέτιση (Paukku *et al.*, 1999).

Αναφορικά, η πρώτη μελέτη στην οποία συσχετίστηκε η χλαμυδιακή λοίμωξη με την υπογονιμότητα σαλπινγικού παράγοντα δημοσιεύτηκε το 1979. Στη μελέτη αυτή βρέθηκε ότι η μέση τιμή των αντισωμάτων έναντι των χλαμυδίων σε ασθενείς με διμερείς απόφραξη σαλπίγγων ήταν υψηλότερη από εκείνη των ασθενών με φυσιολογική υστεροσαλπιγγογραφία (Punnonen *et al.*, 1979).

1.3.7 Ανοσολογική απόκριση στη λοίμωξη από *C. trachomatis*

Ο μηχανισμός με τον οποίο η λοίμωξη από *C. trachomatis* οδηγεί σε συμφύσεις, απόφραξη ή καταστροφή των σαλπίγγων, τα οποία με τη σειρά τους οδηγούν σε υπογονιμότητα δεν είναι ξεκάθαρος. Πρόσφατες ενδείξεις υποστηρίζουν ότι σημαντικό ρόλο παίζει η άμεση κυτταροτοξική δράση του *C. trachomatis* στο κροσσωτό επιθήλιο (Baczynska *et al.*, 2007).

Μελέτες σε πειραματικά μοντέλα έχουν δείξει ότι η λοίμωξη από χλαμύδια κινητοποιεί τόσο την κυτταρική όσο και τη χυμική ανοσία. Η προστασία που προέρχεται από τη χυμική ανοσία συνίσταται στην παρεμπόδιση της αρχικής σύνδεσης και εισόδου των στοιχειωδών σωματίων στα κύτταρα-ξενιστές. Αυτό επιτυγχάνεται με τη βοήθεια των Β λεμφοκυττάρων, τα οποία εκκρίνουν IgA αντισώματα και κατευθύνονται προς χλαμυδιακά αντιγόνα για την εξουδετέρωση στοιχειωδών σωματίων (EB) (Morrison *et al.*, 2005). Αντισώματα IgG και IgM στον ορό θεωρούνται αποδεικτικά ενεργού χλαμυδιακής λοίμωξης. Από την είσοδο και μετά, για τον έλεγχο της λοίμωξης τον κυρίαρχο ρόλο παίζει η κυτταρική ανοσία και τα Τ λεμφοκύτταρα, τα οποία μπορούν να ανιχνεύσουν τα μολυσμένα κύτταρα (Morrison *et al.*, 2000). Τα CD4⁺ και CD8⁺ Τ κύτταρα ασκούν προστατευτική δράση και εμπλέκονται στον περιορισμό της λοίμωξης μέσω της έκκρισης της ιντερφερόνης-γ (IFN-γ), που είναι η βασική προστατευτική κυτταροκίνη (Shemer and Sarov, 1985). Κυτταροκίνες που προκύπτουν ως αποτέλεσμα λοίμωξης από χλαμύδια και συμβάλλουν στην ενεργοποίηση και διατήρηση της ανοσολογικής απάντησης είναι η IL-1α, IL-8, IL-6, IL-12 και ο TNF-α.

Παρά τους ισχυρούς μηχανισμούς άμυνας του ξενιστή, η λοίμωξη μπορεί να επιμείνει και να οδηγήσει σε υπογονιμότητα και έκτοπη κύηση

(Beatty *et al.*, 1994; den Hartog *et al.*, 2006). Οι κυτταροκίνες IL-1α και IL-8 εμπλέκονται στην καταστροφή ιστού που οδηγεί στην υπογονιμότητα σαλπινγικού παράγοντα και σε έκτοπη κύηση (Hvid *et al.*, 2007).

Υποστηρίζεται ότι η χλαμυδιακή πρωτεΐνη θερμικής καταπληξίας HSP60 παίζει σημαντικό ρόλο στην ανοσοπαθογένεια της χλαμυδιακής λοίμωξης. Τα κύτταρα που απομονώθηκαν από ενδομητρικούς και σαλπινγικούς ιστούς ασθενών με PID και υπογονιμότητα σαλπινγικού παράγοντα ανταποκρίθηκαν στη διέγερση με χλαμυδιακή HSP60 πρωτεΐνη σε μεγαλύτερο βαθμό από ότι με χλαμυδιακά στοιχειώδη σωμάτια EB (Kinnunen *et al.*, 2000). Η παρουσία αντισωμάτων έναντι της χλαμυδιακής HSP60 πρωτεΐνης έχει συσχετιστεί, επίσης, με τη σοβαρότητα της PID, την έκτοπη κύηση, την υπογονιμότητα σαλπινγικού παράγοντα και με σοβαρή σαλπινγική παθογένεια (Peeling *et al.*, 1997; Ault *et al.*, 1998; Lichtenwalner *et al.*, 2004; Sziller *et al.*, 2008).

1.3.8 Εργαστηριακή διάγνωση της λοίμωξης από *C. trachomatis*

Η επιτυχής διάγνωση της χλαμυδιακής λοίμωξης εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως το είδος και τον τρόπο συλλογής του δείγματος, το είδος του προς έλεγχο πληθυσμού, τις συνθήκες στις οποίες το δείγμα φυλάσσεται και τη σωστή εφαρμογή της κάθε διαγνωστικής μεθόδου. Μέχρι σήμερα υπάρχουν πολλές εργαστηριακές μέθοδοι για τη διάγνωση του *C. trachomatis*, οι οποίες ποικίλουν σε κόστος, ευαισθησία, ειδικότητα και θετική προγνωστική αξία. Σε αυτές περιλαμβάνονται κυρίως η κυτταροκαλλιέργεια, ο άμεσος ανοσοφθορισμός, η ανοσοενζυμική μέθοδος για ανίχνευση αντιγόνων ή αντισωμάτων και οι μοριακές τεχνικές. Υλικά εξέτασης αποτελούν κυρίως το τραχηλικό ή ουρηθρικό επίχρισμα, τα ούρα, ο ορός, το προστατικό υγρό και το σπέρμα.

1.3.8.1 Κυτταροκαλλιέργεια

Η ανάπτυξη του *C. trachomatis* σε κυτταροκαλλιέργεια είναι η πιο ειδική διαγνωστική μέθοδος αλλά έχει σχετικά χαμηλή ευαισθησία, είναι χρονοβόρα και ακριβή. Οι κυτταρικές σειρές που κυρίως χρησιμοποιούνται ως υπόστρωμα για την ανίχνευση των χλαμυδίων *in vitro* είναι τα McCoy (κυτταρικό στέλεχος από ινοβλάστες μυός). Άλλες κυτταρικές σειρές είναι οι HEp-2 και HeLa. Εκτιμάται ότι η ευαισθησία

των ευρημάτων από την καλλιέργεια ενός μόνο δείγματος από το ενδομήτριο είναι μόλις 70-85% (Murray, 2012).

1.3.8.2 Άμεσος ανοσοφθορισμός (*Direct Immunofluorescence Assay - DFA*)

Μονοκλωνικά αντισώματα σημασμένα με φλουορεσκεΐνη (fluorescein-labeled monoclonal antibodies) μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση χλαμυδίων μέσω σύνδεσής τους με τη μείζονα πρωτεΐνη της εξωτερικής μεμβράνης (MOMP), ενώ άλλοι προτιμούν αντισώματα που συνδέονται με ένα συστατικό του λιποπολυσακχαρίτη (LPS) του κυτταρικού τοιχώματος. Με τον DFA ανιχνεύουμε κυρίως στοιχειώδη σωμάτια EB. Μελέτες δείχνουν ότι μέθοδος με τη χρήση σημασμένων με φλουορεσκεΐνη μονοκλωνικών αντισωμάτων έχει ευαισθησία που κυμαίνεται από 70% έως 95% και ειδικότητα από 92% έως 99% (Johnson *et al.*, 2002; Mahon, 2011).

1.3.8.3 Ανοσοενζυμική μέθοδος (*Enzyme Immune Assay – EIA*)

Σε αυτή τη μέθοδο χρησιμοποιούνται μονοκλωνικά ή πολυκλωνικά αντισώματα, τα οποία είναι συζευγμένα με ένα ένζυμο, για την ανίχνευση αντιγόνων είτε της MOMP είτε του LPS. Το ένζυμο μετατρέπει ένα άχρωμο υπόστρωμα σε ένα έγχρωμο προϊόν, το οποίο ανιχνεύεται με φασματοφωτόμετρο. Η ευαισθησία και η ειδικότητα της μεθόδου κυμαίνεται στα ίδια επίπεδα με αυτά του DFA, όμως μειονεκτεί απέναντι στον DFA λόγω των ψευδώς-θετικών αποτελεσμάτων που παίρνουμε όταν στη μέθοδο ανιχνεύουμε LPS. Αυτό συμβαίνει διότι οι αντιγονικοί καθοριστές στον LPS υπάρχουν και σε άλλα Gram-αρνητικά βακτήρια π.χ. *E. Coli* και έτσι η πρόσδεση των αντισωμάτων στα αντιγόνα του LPS δεν είναι ειδική (CDC, 1991; Kellogg *et al.*, 1992; Johnson *et al.*, 2002).

1.3.8.4 Ανίχνευση αντισωμάτων – Ορολογικές μέθοδοι

Η αναζήτηση αντισωμάτων IgM και IgG έναντι του *C. trachomatis* στον ορό των ασθενών, με ορολογικές μεθόδους, έχει περιορισμένη χρησιμότητα στη διάγνωση ουρογεννητικών λοιμώξεων σε ενήλικες, επειδή οι τίτλοι των αντισωμάτων διατηρούνται για μεγάλα χρονικά διαστήματα. Επομένως, η εξέταση δεν μπορεί να διακρίνει την πιθανή τωρινή λοίμωξη από μια παλαιότερη και έτσι δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως διαγνωστική μέθοδος στις χλαμυδιακές ουρηθρίτιδες -

τραχηλίτιδες. Όμως, οι ορολογικές μέθοδοι είναι χρήσιμες στη διάγνωση της νεογνικής πνευμονίας, του αφροδίσιου λεμφοκοκκιώματος (LGV) και στις εν τω βάθει λοιμώξεις του γεννητικού συστήματος από *C. trachomatis* (Murray, 2012).

Οι ορολογικές μέθοδοι που υπάρχουν είναι ο μικροανοσοφθορισμός (microimmunofluorescence–MicroIF) και η σύνδεση συμπληρώματος (complement fixation–CF). Ο μικροανοσοφθορισμός είναι μέθοδος που χρησιμοποιείται για τη διάγνωση του LGV, του PID, της σαλπινγίτιδας, της επιδιδυμίτιδας και ανιχνεύει αντισώματα για τα χλαμυδιακά στοιχειώδη σωματίδια EB (Mahon, 2011). Αρχικά αυτή η μέθοδος είχε αναπτυχθεί για την ταξινόμηση των οροτύπων του *C. trachomatis* με σκοπό τη χρήση τους σε οροεπιδημιολογικές μελέτες (Wang and Grayston, 1970). Η σύνδεση συμπληρώματος είναι μέθοδος που χρησιμοποιείται για τη διάγνωση του LGV και οφθαλμογεννητικών παθήσεων μέσω ανίχνευσης αντισωμάτων έναντι του LPS των *C. trachomatis* (Murray, 2012).

1.3.8.5 Μοριακές τεχνικές (Nucleic Acid Amplification Assays – NAATs)

Οι μοριακές τεχνικές είναι πλέον οι μέθοδοι επιλογής για την ανίχνευση του *C. trachomatis* αλλά και άλλων μικροβίων, αν και το κόστος είναι υψηλότερο σε σχέση άλλες μεθόδους (Black, 1997). Στηρίζονται στην ενίσχυση και τον πολλαπλασιασμό του νουκλεϊκού οξέος των χλαμυδίων με τη δυνατότητα να ανιχνεύουν ακόμα και έναν μικροοργανισμό. Η ευαισθησία των μεθόδων αυτών είναι μεγαλύτερη από 90% και η ειδικότητα μεγαλύτερη από 99,5% (Murray, 2012; Akande *et al.*, 2010). Υλικά εξέτασης αποτελούν το τραχηλικό επίχρισμα και τα ούρα, τα οποία είναι αναγνωρισμένα από τον Αμερικανικό οργανισμό Food and Drug Administration (FDA). Ένα μειονέκτημα των μοριακών τεχνικών είναι ότι το υλικό εξέτασης μπορεί να περιέχει αναστολείς της ενίσχυσης και σαν αποτέλεσμα να έχουμε ψευδώς-αρνητικά αποτελέσματα. Ορισμένοι κατασκευαστές παρέχουν controls για να ανιχνεύσουν την αναστολή (Johnson *et al.*, 2002).

Οι μοριακές τεχνικές αποτελούν πολύτιμο εργαλείο για την αξιόπιστη καθημερινή διάγνωση των *C. trachomatis* και είναι εργαστηριακές δοκιμές που απαιτούν εξειδικευμένο εργαστηριακό προσωπικό (Pate *et al.*, 1998). Συχνότερα χρησιμοποιούμενες τεχνικές NAATs είναι η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), η αλυσιδωτή

αντίδραση λιγάσης (LCR) και η ενίσχυση μέσω της μεταγραφής (TMA). Η τελευταία ανιχνεύει ειδικές αλληλουχίες 23S ριβοσωμικών RNA στόχων. Άλλη μια μέθοδος είναι η ανίχνευση rRNA μέσω DNA ανιχνευτών, όπου ο ανιχνευτής υβριδίζεται σε μια ειδική αλληλουχία χλαμυδιακού 16S rRNA (Black, 1997).

Κύρια εκπρόσωπος των μοριακών τεχνικών που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση του *C. trachomatis* καθώς και άλλων μικροβίων, είναι η PCR. Η PCR είναι αλυσιδωτή αντίδραση του ενζύμου DNA πολυμεράση, με τη δράση του οποίου επιτυγχάνεται πολλαπλή αντιγραφή *in vitro* μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA. Πιο συγκεκριμένα η μέθοδος αυτή στηρίζεται στη συνεχή επανάληψη ενός κύκλου που αποτελείται από τρία διαδοχικά στάδια: α) αποδιάταξη του δίκλωνου DNA (denaturation), β) υβριδοποίηση εκκινητών στις αλληλουχίες του DNA-στόχου (annealing), γ) επιμήκυνση εκκινητών (extension). Σε κάθε στάδιο γίνεται επώαση του δείγματος σε διαφορετική κάθε φορά θερμοκρασία με τη βοήθεια του θερμικού κυκλοποιητή (Mullis, 1990). Για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της PCR, δηλαδή των προϊόντων της, εφαρμόζεται η διαδικασία ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης μαζί με μοριακούς δείκτες των οποίων τα μεγέθη είναι γνωστά. Έτσι διαπιστώνεται αν το προϊόν της PCR καταρχήν υπάρχει και κατά δεύτερον αν έχει το αναμενόμενο μέγεθος. Τα προϊόντα γίνονται ορατά με τη βαφή του βρωμιούχου αιθιδίου, το οποίο ενσωματώνεται στην πηκτή πριν την ηλεκτροφόρηση και φθορίζει κάτω από υπεριώδη ακτινοβολία UV όταν συγκεντρώνεται στις περιοχές των προϊόντων της PCR.

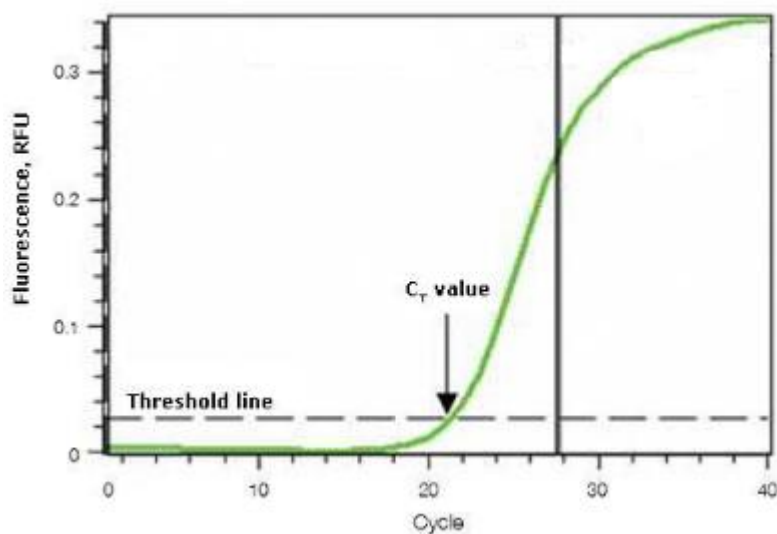
Με την πάροδο του χρόνου και την εξέλιξη της μοριακή βιολογίας, αναπτύχθηκαν και άλλες μέθοδοι βασιζόμενες στην ιδέα της συμβατικής PCR. Μια από αυτές είναι η PCR πραγματικού χρόνου (real-time PCR). Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται σε μελέτες ανίχνευσης του *C. trachomatis* (Jaton *et al.*, 2006), αλλά δεν αποτελεί επιλογή για τα περισσότερα διαγνωστικά κέντρα και κλινικές λόγω της πολυπλοκότητας και του υψηλού κόστους του εξοπλισμού της. Η real-time PCR αποτελεί μια παραλλαγή της συμβατικής PCR, η οποία επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό, την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση μιας αλληλουχίας στόχου με μεγαλύτερη ταχύτητα, ακρίβεια, επαναληψιμότητα και σε πραγματικό χρόνο. Επιπλέον μειώνει τον κίνδυνο επιμολύνσεων. Επιτρέπει τη μέτρηση της ποσότητας των

προϊόντων και κατ' επέκταση την παρακολούθηση του ρυθμού πολλαπλασιασμού ενός μορίου-στόχου σε όλη τη διάρκεια της αντίδρασης (Houghton and Cockerill, 2006). Μετά από μια αρχική φάση όπου το προϊόν της PCR δεν είναι ανιχνεύσιμο λόγω της πολύ μικρής του ποσότητας, ακολουθεί μια εκθετική φάση κατά την οποία η ποσότητα του προϊόντος σχεδόν διπλασιάζεται σε κάθε βήμα. Αν αρχικά υπάρχουν περισσότερα μόρια-στόχοι, θα χρειαστούν λιγότεροι κύκλοι για να αρχίσει η εκθετική φάση. Συγκρίνοντας τον αριθμό των κύκλων που απαιτούνται για την έλευση της εκθετικής φάσης σε διαφορετικές αντιδράσεις, μπορούμε να προσδιορίσουμε την αρχική ποσότητα των μορίων (Watson, 2007).

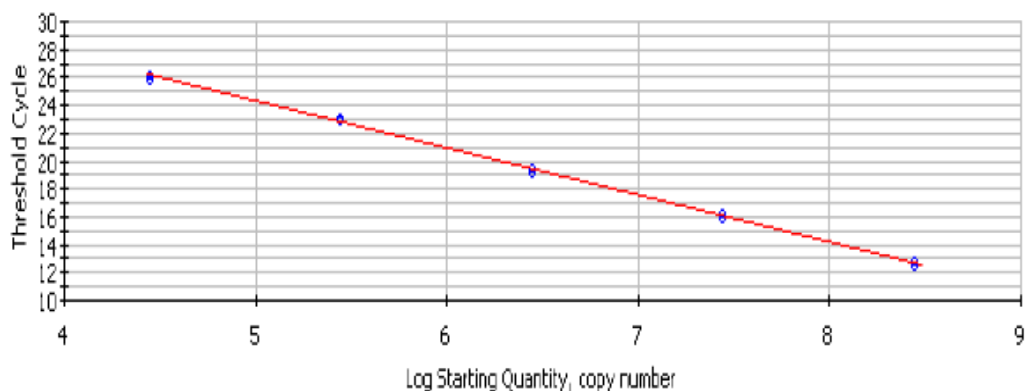
Η ανίχνευση και η παρακολούθηση των προϊόντων επιτυγχάνεται με τη χρήση σημασμένων μορίων εκκινητών ή φθορίζοντων μορίων που συνδέονται στην επιθυμητή αλληλουχία. Ο φθορισμός που εκπέμπεται μετράται σε κάθε κύκλο και βοηθάει στην ποσοτικοποίηση του προϊόντος. Η ένταση του φθορισμού αυξάνεται σταδιακά σε συνάρτηση με την αύξηση των αντιγράφων που παράγονται σε κάθε κύκλο αντίδρασης. Υπάρχουν αρκετές μέθοδοι για τη σήμανση των προϊόντων, οι σημαντικότερες από τις οποίες είναι οι ειδικοί σημασμένοι ιχνηθέτες (TaqMan), οι ιχνηθέτες τύπου Beacons (μοριακοί φάροι), τα ειδικά δίκλινα μόρια FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) και οι μη ειδικές φθορίζουσες χρωστικές SYBR Green I (Pfaffl, 2004).

Συνήθως στην real-time PCR χρησιμοποιείται η «απόλυτη ποσοτικοποίηση» (Absolute quantification), με την οποία μετράται η ακριβής ποσότητα της αλληλουχίας στο δείγμα. Αυτό γίνεται με τη χρήση μιας πρότυπης καμπύλης αναφοράς (standard curve), με την οποία συγκρίνεται το φθορίζον σήμα που εκπέμπεται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης. Για τη δημιουργία αυτής της καμπύλης επιλέγεται μια γνωστή συγκέντρωση του γονιδίου-στόχου (μάρτυρας), στον οποίο στη συνέχεια πραγματοποιούνται διαδοχικές αραιώσεις. Τα αραιωμένα δείγματα θα περάσουν από τις ίδιες συνθήκες της real-time PCR μαζί με τα πειραματικά δείγματα. Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης PCR, ένα κατώφλι-σήμα φθορίζουσας χρωστικής (threshold) καθορίζει σε πιο σημείο όλα τα δείγματα μπορούν να συγκριθούν. Αυτό το κατώφλι υπολογίζεται ως συνάρτηση του ποσού του υπόβαθρου της φθορίζουσας χρωστικής και τελικά ο κλασματικός αριθμός των κύκλων PCR που απαιτούνται για να παράγουν αρκετό σήμα φθορίζουσας χρωστικής που

θα φθάσει σε αυτό το κατώφλι χαρακτηρίζεται ως κατώφλι κύκλου (cycle threshold, C_t) (Εικ. 7). Μετά το τέλος της αντίδρασης, η καμπύλη αναφοράς εμφανίζεται ως ευθεία γραμμή σε γράφημα που εκφράζει τον αριθμό των αντιγράφων του αρχικού μάρτυρα συναρτήσει των τιμών C_t (Εικ. 8). Η καμπύλη αναφοράς πρέπει να βασίζεται σε τουλάχιστον 4 σημεία γνωστής συγκέντρωσης που θα πρέπει να καλύπτουν το εύρος των συγκεντρώσεων των υπό μελέτη δειγμάτων. Στη συνέχεια γίνεται σύγκριση των τιμών C_t των υπό μελέτη δειγμάτων με αυτές της καμπύλης αναφοράς και με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται η ποσοτικοποίηση.



Εικόνα 7: Προσδιορισμός της τιμής C_t .



Εικόνα 8: Παράδειγμα καμπύλης αναφοράς (standard curve).

1.3.8.6 Ανοσοϊστοχημεία (Immunohistochemistry – IHC)

Η εφαρμογή τεχνικών ανοσοϊστοχημείας για την ανίχνευση του *C. trachomatis* δεν αποτελεί μέθοδο ρουτίνας για ένα ιστοπαθολογικό

εργαστήριο. Παρόλα αυτά, η ανοσοϊστοχημεία έχει χρησιμοποιηθεί σε μελέτες ανίχνευσης του χλαμυδίου σε υλικά εξέτασης όπως κυρίως οι βιοψίες επιδιδυμίδας, πλακούντα, ενδομητρίου και τοιχώματος μήτρας (Hori and Tsutsumi, 1995; Pal *et al.*, 1999; Baud *et al.*, 2011; Paukku *et al.*, 1999; Mount *et al.*, 2001; Kannar *et al.*, 2012).

Ανοσοϊστοχημεία είναι η εργαστηριακή τεχνική που συνδυάζει την ιστοπαθολογία με την ανοσολογία και τη χημεία. Καθιστά ορατά διάφορα αντιγόνα σε ιστούς και κύτταρα ύστερα από χημική αντίδραση που πραγματοποιείται με τη σύνδεση αντιγόνου-αντισώματος. Η τεχνική βασίζεται στην ικανότητα ειδικών αντισωμάτων να εντοπίζουν και να συνδέονται με τα αντίστοιχα αντιγόνα. Η σήμανση του αντισώματος με την κατάλληλη ουσία-ετικέτα καθιστά ορατό το σύμπλεγμα αντιγόνου-αντισώματος και αναλόγως την ουσία και τη φύση της τεχνικής, η αντίδραση ελέγχεται με κοινό, φθορίζον ή ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (Rosai, 2004). Τα αντισώματα που χρησιμοποιούνται ανήκουν κυρίως στην οικογένεια των ανοσοσφαιρινών IgG ή IgM.

Η ανάπτυξη της ανοσοϊστοχημείας ξεκίνησε το 1950 από τον Coons και τους συνεργάτες του, οι οποίοι σήμαναν αντισώματα με μια φθορίζουσα χρωστική γεγονός που επέτρεπε την ανίχνευση του αντιγόνου σε τομές ιστών (Coons and Kaplan, 1950). Η μέθοδος του Coons και των συνεργατών του υπήρξε για αρκετά χρόνια η μοναδική μέθοδος ταυτοποίησης αντιγόνων στους ιστούς. Ωστόσο, η μικρή διάρκεια διατήρησης του φθορισμού στα δείγματα οδήγησε στην ανάπτυξη παραλλαγών, στις οποίες τα φθορίζοντα μόρια αντικαταστάθηκαν με ένζυμα ή ενζυμικά συστήματα. Τα πιο κοινά ένζυμα είναι η υπεροξειδάση, η αλκαλική φωσφατάση και η οξειδάση της γλυκόζης (Nakane and Pierce, 1966; Mason and Sammons, 1978; Suffin *et al.*, 1979).

Η ανοσοϊστοχημεία συγκεντρώνει πολλά πλεονεκτήματα, όπως είναι η καλή ευαισθησία, η ειδικότητα, η επαναληψιμότητα και η δυνατότητα συσχέτισης με τις μορφολογικές παραμέτρους. Είναι συμβατή με όλα σχεδόν τα μονιμοποιητικά υλικά που χρησιμοποιούνται σήμερα (Jacobsen and Jacobsen, 1984; Larsson, 1993). Επιπλέον η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί και σε δείγματα που έχουν υποστεί αυτόλυση ή ακόμα και νέκρωση (Judkins *et al.*, 1998). Ακόμα, με την ανοσοϊστοχημεία μπορούν να ανιχνευθούν ταυτόχρονα στην ίδια τομή ή σε διαδοχικές τομές ιστού περισσότερα του ενός αντιγόνα. Μειονέκτημα της μεθόδου αποτελεί το γεγονός ότι η εκτίμηση της έντασης και της

κατανομής της χρώσης είναι υποκειμενική (Νακοπούλου, 1999). Επίσης, με τη μονιμοποίηση το αντιγόνο μπορεί να μεταβληθεί και έτσι να μην μπορεί να αναγνωριστεί από το αντίσωμα, με αποτέλεσμα να έχουμε ψευδώς αρνητικό αποτέλεσμα.

Οι πιο κοινές μέθοδοι ανοσοϊστοχημείας είναι η μέθοδος ανοσοϋπεροξειδάσης (PAP), η μέθοδος συμπλέγματος αβιδίνης-βιοτίνης (ABC) και η μέθοδος στρεπταβιδίνης-βιοτίνης (B-SA). Βασίζονται στις χημικές ιδιότητες των ενζύμων ή ενζυμικών συμπλεγμάτων που αντιδρούν με άχρωμα υποστρώματα χρωμογόνων ενώσεων για το σχηματισμό ενός χρωματισμένου τελικού προϊόντος. Στη μέθοδο της ανοσοϋπεροξειδάσης το πρώτο βήμα περιλαμβάνει την αλληλεπίδραση του αντισώματος με το αντιγόνο που αναγνωρίζει. Το δεύτερο βήμα περιλαμβάνει επώαση του συμπλέγματος αντιγόνου-αντισώματος με δεύτερο αντίσωμα, το οποίο αναγνωρίζει το σταθερό τμήμα των IgG ή IgM του ζωικού είδους στο οποίο έχει δημιουργηθεί το πρώτο αντίσωμα. Το δεύτερο αντίσωμα είναι συνδεδεμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση που καθιστά δυνατή την αντίχρωση του συμπλέγματος.

Η πρώτη τεχνική ανοσοϋπεροξειδάσης αναφέρθηκε από τους Nakane και Pierce (Nakane and Pierce, 1966). Έκτοτε, έχουν σημειωθεί πολλές εξελίξεις που οδήγησαν στην αυξημένη ευαισθησία έναντι των προγενέστερων τεχνικών. Μια εξέλιξη ήταν η χρήση πολυμερούς σήμανσης που έχει εφαρμοστεί τόσο σε πρωτοταγή αντισώματα όσο και σε συστήματα αντίχρωσης (Tsutsumi *et al.*, 1995). Το NovoLink™ Polymer Detection System, που χρησιμοποιείται στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιεί μια νέα τεχνολογία ελεγχόμενου πολυμερισμού για την παρασκευή συζυγών πολυμερούς υπεροξειδάσης- αντισώματος συνδέτη. Επομένως, το πρόβλημα της μη ειδικής χρώσης που είναι δυνατό να συμβεί με τα συστήματα αντίχρωσης στρεπταβιδίνης/βιοτίνης λόγω ενδογενούς βιοτίνης, δεν παρουσιάζεται.

1.3.9 Ιστός περιόδου ως υλικό εξέτασης για την αντίχρωση του *C. trachomatis*

Το αρχικό υλικό εξέτασης αποτελεί πολύ σημαντικό παράγοντα καθορισμού των ορίων αντίχρωσης της εκάστοτε τεχνικής που χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό μικροβίων όπως το *C. trachomatis*. Τα πιο διαδεδομένα υλικά εξέτασης είναι τα κολπο-τραχηλικά επιχρίσματα των οποίων η καλλιέργεια ανιχνεύει μόνο το 70-80% των

μικροβιακών λοιμώξεων του κατώτερου γεννητικού συστήματος, με αποτέλεσμα ακόμα μικρότερο ποσοστό να παρατηρείται στην άνω γεννητική οδό (Dunlop *et al.*, 1985; Black, 1997; Zariffard *et al.*, 2002). Επιπλέον, τα δείγματα που χρησιμοποιούνται στη ρουτίνα των εργαστηρίων δεν περιλαμβάνουν το ενδομήτριο με αποτέλεσμα πολλές λοιμώξεις να μην εντοπίζονται και να καταλήγουν σε δυσμενείς συνέπειες για τις γυναίκες που μένουν χωρίς θεραπεία (Michou *et al.*, 2013).

Ο ιστός περιόδου (ιστός αποπεπτωκτός ενδομητρίου) αποτελείται από εκφυλισμένο ενδομήτριο μαζί με κύτταρα αίματος από τα ραγέντα αγγεία (Junqueira and Carneiro, 2004). Στη βιβλιογραφία, εκτός από μια πρόσφατη δημοσίευση των Μίχου και συνεργατών (Michou *et al.*, 2013), δεν αναφέρεται να έχει χρησιμοποιηθεί ο ιστός αυτός ως υλικό εξέτασης για ανίχνευση του *C. trachomatis*. Το υλικό αυτό χρησιμοποιείται αποκλειστικά στην Ελλάδα από τα εργαστήρια Locus-Medicus και τα δικαιώματα προστατεύονται από διεθνή πατέντα (1395670).

Η διερεύνηση του ιστού περιόδου έχει μεγάλη κλινική σημασία καθώς αποτελεί ένα από τα κυριότερα μέρη όπου περιέχονται επιθηλιακά κύτταρα κυλινδρικού τύπου, τα οποία αποτελούν τους κυτταρικούς στόχους του γλαυιδίου και επίσης συνδέεται άμεσα με το ενδομήτριο, δηλαδή το μέρος όπου εμφυτεύεται και αναπτύσσεται το έμβρυο (Michou *et al.*, 2013).

2 ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Σκοπός μελέτης

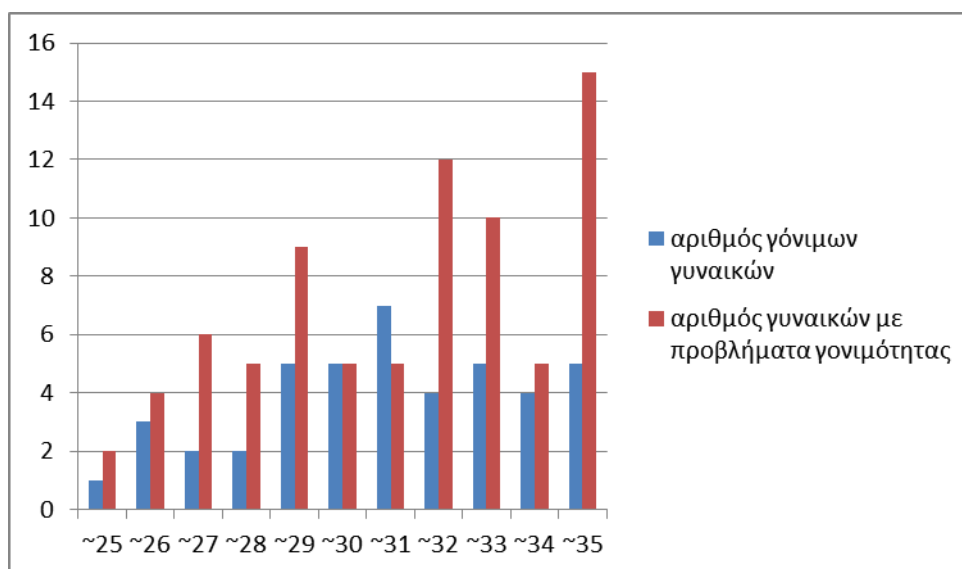
Κύριοι στόχοι της μελέτης ήταν οι εξής: **α)** Η χρήση του ιστού περιόδου ως υλικό για μοριακή ανίχνευση (real-time PCR) του *C. trachomatis* σε δύο ομάδες γυναικών ίσης περίπου μέσης ηλικίας: την πρώτη ομάδα αποτελούν γυναίκες με προβλήματα γονιμότητας και τη δεύτερη γόνιμες γυναίκες. **β)** Εξαγωγή ποσοστού ανίχνευσης του *C. trachomatis* σε καθεμία από τις δύο ομάδες γυναικών. Από τη σύγκριση των δύο ποσοστών πιστεύουμε ότι θα διεξαχθεί ένα σημαντικό συμπέρασμα για τη χρήση της πρωτοποριακής αυτής μεθόδου στη διαγνωστική πρακτική και να μπορέσει να επεκταθεί και σε άλλου είδους μικρόβια που προσβάλλουν το γεννητικό σύστημα και πιθανά συμβάλλουν στην υπογονιμότητα. **γ)** Ανοσοϊστοχημική ανίχνευση του *C. trachomatis* σε επιλεγμένα δείγματα ιστού περιόδου που ήταν εφικτό να πραγματοποιηθεί, ως επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων της μοριακής μεθόδου.

2.2 Υλικό

2.2.1 Ασθενείς

Στο τμήμα Μοριακής Παθολογίας και Γενετικής του πολυιατρείου Locus-Medicus καθημερινά παραπέμπονται δείγματα προς ανίχνευση του *C. trachomatis*. Στην παρούσα μελέτη συμπεριλήφθησαν δείγματα Ελληνίδων γυναικών που παραπέμφθηκαν από τον Οκτώβριο του 2009 έως και τον Οκτώβριο του 2012. Την ομάδα των γυναικών με προβλήματα γονιμότητας αποτελούν 78 γυναίκες ηλικίας μεταξύ 25-35 ετών (μέση ηλικία 31.16 ± 2.99 έτη) (Εικ.9), οι οποίες εξετάστηκαν στο Τμήμα Διερεύνησης Υπογονιμότητας του πολυιατρείου Locus-Medicus. Για την καθεμία ξεχωριστά λήφθηκε το απαραίτητο ιστορικό υπογονιμότητας. Κριτήριο επιλογής των γυναικών αυτών ήταν η ανεπιτυχής προσπάθεια σύλληψης ή η ανεπιτυχής προσπάθεια γέννησης ζώντος τέκνου (λόγω αποβολής, παλίνδρομης ή έκτοπης κύησης) τουλάχιστον για 2 συνεχόμενα έτη με έναν σύντροφο. Συγκεκριμένα οι 59 από τις 78 γυναίκες δεν έχουν στο ιατρικό τους ιστορικό καμία σύλληψη, ενώ οι υπόλοιπες 19 έχουν στο ιστορικό τους είτε αυτόματη αποβολή, είτε παλίνδρομη, είτε έκτοπη κύηση.

Την ομάδα των γόνιμων γυναικών αποτελούν 43 γυναίκες ηλικίας μεταξύ 25-35 ετών (μέση ηλικία 30.91 ± 2.78 έτη) (Εικ.9) των οποίων ήταν εφικτό να βρεθεί ιστορικό γονιμότητας για τη μελέτη από τον θεράποντα γυναικολόγο τους. Ένα μέρος των γυναικών αυτών αποτελούν ασθενείς του Γυναικολογικού Ιατρείου του πολυϊατρείου Locus-Medicus. Κριτήριο επιλογής των γόνιμων γυναικών ήταν η επίτευξη τοκετού τουλάχιστον 6 μήνες πριν την παραπομπή τους για ανίχνευση του *C. trachomatis* ή η φυσική σύλληψη το μέγιστο μέχρι 4 μήνες μετά την παραπομπή τους για ανίχνευση του *C. trachomatis*. Σε κάθε περίπτωση η φυσική σύλληψη έπρεπε να είχε πραγματοποιηθεί σε διάστημα 3 μηνών προσπάθειας.



Εικόνα 9: Αριθμός γόνιμων γυναικών και γυναικών με προβλήματα γονιμότητας ανά ηλικία.

2.2.2 Δειγματοληψία

Η συλλογή του δείγματος ιστού περιόδου έγινε από τις γυναίκες τις ίδιες στο σπίτι τους, χωρίς να χρειαστεί επίσκεψη σε ιατρό. Πραγματοποιείται την ημέρα της μεγαλύτερης ροής της εμμήνου ρήσεως (συνήθως το πρωινό της δεύτερης ημέρας του κύκλου). Είναι σημαντικό το γεγονός ότι πρέπει να αποφευχθεί η παρουσία ούρων στο δείγμα. Το δείγμα συλλέγεται σε αποστειρωμένο σωληνάριο των 50ml, το οποίο περιέχει περίπου 0,4ml ρυθμιστικού υγρού phosphate buffered saline (PBS, pH 7,6). Οι οδηγίες σωστής συλλογής του δείγματος είναι οι εξής: σε καθιστή στάση η γυναίκα ακουμπάει το στόμιο του φιαλιδίου στην

είσοδο του κόλπου όπου το αίμα της εμμήνου ρήσεως ρέει ελεύθερα (φυσικά) χωρίς μυϊκή προσπάθεια. Λόγω της βλεννώδους φύσης του υλικού, όταν αυτό προσκολλάται κοντά στο στόμιο και δεν ρέει στον πάτο του σωληναρίου, οι γυναίκες συνιστάται να ανατρέπουν το σωληνάριο, έτσι ώστε το ρυθμιστικό υγρό να παρασύρει όλο το υλικό στον πυθμένα. Απαιτείται ποσότητα υλικού γύρω στο 1ml. Ύστερα από τη συλλογή του υλικού πρέπει να βιδώνεται καλά το πώμα, να πλένεται το σωληνάριο εξωτερικά με σαπούνι και να επικολλάται ετικέτα με το όνομα. Το δείγμα φυλάσσεται στη συντήρηση του ψυγείου (2-8°C) μέχρι να προσκομισθεί στο εργαστήριο. Η επεξεργασία του υλικού από το εργαστήριο θα πρέπει να ξεκινήσει σε διάστημα 2 ημερών από τη συλλογή του.

Η ρευστή ποσότητα του δείγματος που συλλέγεται είναι κατάλληλη για την μοριακή μέθοδο που ακολουθεί. Για την ανοσοϊστοχημική μέθοδο, όμως, θα πρέπει στο δείγμα να υπάρχουν συμπαγή τεμαχίδια που να αποτελούνται από ενδομητρικό ιστό έτσι ώστε αυτά να μπορούν να μονιμοποιηθούν και να εγκλωβιστούν σε κύβο παραφίνης. Τέτοια τεμαχίδια δεν ήταν εφικτό να υπάρξουν σε όλα τα δείγματα και γι' αυτό η ανοσοϊστοχημική μέθοδος πραγματοποιήθηκε σε 8 δείγματα ιστού περιόδου και σε 3 βιοψίες ενδομητρίου, οι οποίες ανήκαν σε γυναίκες της ομάδας με προβλήματα υπογονιμότητας, στις οποίες ανιχνεύτηκε με τη μοριακή μέθοδο *C. trachomatis* και ως εκ τούτου αποτέλεσαν τους θετικούς μάρτυρες για τη βελτιστοποίηση της ανοσοϊστοχημικής μεθόδου. Από τα 8 δείγματα ιστού περιόδου στα οποία εφαρμόστηκε η ανοσοϊστοχημεία, τα 6 ανήκαν σε γυναίκες της ομάδας με τα προβλήματα γονιμότητας και τα άλλα 2 σε γυναίκες της γόνιμης ομάδας.

2.3 Μεθοδολογία

2.3.1 Απομόνωση DNA

Η απομόνωση ολικού DNA έγινε με το Quick-gDNA™ MiniPrep της εταιρίας ZYMO RESEARCH. Όλη η διαδικασία της απομόνωσης πραγματοποιήθηκε σε ειδικά διαμορφωμένο χώρο, με DNase-free εξοπλισμό και με αποστειρωμένα pipette tips έτσι ώστε να μειωθεί ο κίνδυνος επιμόλυνσης.

Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε είναι το εξής:

- Σε 200μl ιστού περιόδου προστίθενται 800μl διαλύματος λύσης Genomic Lysis Buffer.
- Αναμιγνύουμε καλά το μίγμα με vortex και το αφήνουμε σε θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον 15 λεπτά μέχρι να γίνει διαυγές.
- Μεταφέρουμε το μίγμα σε κολώνα Zymo-Spin™ Column, η οποία έχει ως υποδοχέα ένα σωληνάριο συλλογής (collection tube) και φυγοκεντρούμε στις 10.000 στροφές για 1 λεπτό.
- Πετάμε το collection tube με το υγρό και μεταφέρουμε την κολώνα σε νέο collection tube.
- Προσθέτουμε 250μl Pre-Wash Buffer στην κολώνα και φυγοκεντρούμε στις 10.000 στροφές για 1 λεπτό.
- Πετάμε το collection tube με το υγρό και μεταφέρουμε την κολώνα σε νέο collection tube.
- Προσθέτουμε 500μl g-DNA Wash Buffer στην κολώνα και φυγοκεντρούμε στις 10.000 στροφές για 1 λεπτό.
- Πετάμε το collection tube με το υγρό και μεταφέρουμε την κολώνα σε νέο collection tube.
- Επαναλαμβάνουμε την πλύση με 500μl g-DNA Wash Buffer και φυγοκεντρούμε στις 10.000 στροφές για 2 λεπτά.
- Πετάμε το collection tube με το υγρό και μεταφέρουμε την κολώνα σε καθαρά σωληνάρια των 1,5ml. Αφήνουμε ανοιχτό το καπάκι της κολώνας για να στεγνώσει για 10 λεπτά.
- Προσθέτουμε 100μl DNA Elution Buffer και επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά.
- Φυγοκεντρούμε στις μέγιστες στροφές για 1 λεπτό και έτσι εκλύεται το DNA.
- Το DNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί αμέσως ή να φυλαχθεί στους -20 °C για μελλοντική χρήση.

2.3.2 Φωτομέτρηση DNA

Η ποσότητα και η ποιότητα του DNA που εκλούσθηκε από την απομόνωση, μετρήθηκε σε φασματοφωτόμετρο NanoDrop 2000c της εταιρίας Thermo Scientific. Η συγκέντρωση του DNA του εκάστοτε δείγματος υπολογίζεται σε ng/μl.

2.3.3 Real-time PCR

Για την ανίχνευση του *C. trachomatis* χρησιμοποιήθηκε το PrimerDesign™ kit σε εξοπλισμό της LightCycler – Roche.

Το παραγόμενο προϊόν από την ενίσχυση της αλληλουχίας στόχου ανιχνεύεται μέσω φθορισμού με τη χρήση ειδικών εκκινητών (probes) TaqMan. Κατά τη διάρκεια της ενίσχυσης, οι 5'→3' (forward) και 3'→5' (reverse) εκκινητές υβριδίζονται στο χλαμυδιακό DNA/cDNA. Ένας φθορίζον ιχνηθέτης περιλαμβάνεται στο ίδιο μίγμα της αντίδρασης, ο οποίος είναι σημασμένος στο 5' και 3' άκρο του. Κατά τη διάρκεια της ενίσχυσης, ο ιχνηθέτης διασπάται και οι 5' και 3' χρωστικές διαχωρίζονται. Η αύξηση του φθορισμού που έπεται μπορεί να ανιχνευθεί από τη συσκευή της real-time PCR. Η ποσοτικοποίηση του εκάστοτε δείγματος πραγματοποιείται βάσει ειδικού θετικού μάρτυρα γνωστού βακτηριακού φορτίου, ο οποίος χρησιμοποιείται για τον σχηματισμό της πρότυπης καμπύλης αναφοράς (standard curve), τον υπολογισμό της τιμής C_i και τον υπολογισμό του χλαμυδιακού DNA σε copies/μl. Στη συνέχεια, μετατρέπονται τα copies/μl σε copies/μg πολλαπλασιάζοντας το πρώτο νούμερο με το 1000 και διαιρώντας το με τη συγκέντρωση του DNA που υπολογίστηκε από τη φωτομέτρηση. Για να επιβεβαιωθεί η απουσία επιμόλυνσης, χρησιμοποιείται κάθε φορά και ένα αρνητικό control, το οποίο είναι νερό RNase/DNase free.

Τα συστατικά της αντίδραση είναι τα εξής:

Συστατικά	Όγκος
2x Precision™ MasterMix	10μl
Chlamydia Primer/Probe mix	1μl
dH ₂ O	4μl
DNA template	5μl (5ng/μl)
Τελικός όγκος	20μl

Το θερμικό πρωτόκολλο για την πειραματική διαδικασία αποτελείται από τα εξής στάδια:

Βήματα	Θερμοκρασία	Χρόνος
Enzyme activation	95°C	00:15:00
Denaturation	95°C	00:00:10
Annealing	60°C	00:01:00
Cooling	40°C	00:00:20

} 50 κύκλοι

2.3.4 Ανοσοϊστοχημεία

Τα συμπαγή τεμάχια από τα δείγματα ιστού περιόδου που αποτελούνταν από ενδομητρικό ιστό και κρίθηκαν κατάλληλα για ανοσοϊστοχημεία, μονιμοποιήθηκαν σε φορμόλη και στη συνέχεια εγκλωβίστηκαν σε κύβους παραφίνης. Με τη χρήση μικροτόμου παρασκευάστηκαν τομές πάχους 2,5μm, οι οποίες καθλώθηκαν σε αντικειμενοφόρους πλάκες και παρέμειναν σε θερμοκρασία 65 °C -70 °C όλη τη νύχτα.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε στις τομές χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης για να εντοπισθεί αν υπάρχουν στα δείγματα επιθηλιακά κύτταρα ενδομητρίου. Η χρώση αιματοξυλίνης στα επιθηλιακά κύτταρα εντοπίζεται πυρηνικά (μωβ ή μπλε χρώμα), ενώ η ηωσίνη παράγει κυτταροπλασματική χρώση (ρόδινη).

Το πρωτόκολλο της χρώσης αιματοξυλίνης-ηωσίνης που ακολουθήθηκε είναι το εξής:

- Αποπαραφίνωση των τομών σε διάλυμα ξυλόλης για 10 λεπτά, επί τέσσερις φορές (σε θερμοκρασία 65 °C οι πρώτες τρεις φορές και σε θερμοκρασία δωματίου η τέταρτη).
- Ενυδάτωση των τομών σε κατιούσα διαλυμάτων αλκοόλης.
- Διάλυμα αλκοόλης 100%, για 3 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου.
- Δεύτερο διάλυμα αλκοόλης 100%, για 3 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου.
- Διάλυμα αλκοόλης 96%, για 3 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου.
- Διάλυμα αλκοόλης 80%, για 15 δευτερόλεπτα, σε θερμοκρασία δωματίου.
- Διάλυμα αλκοόλης 50%, για 15 δευτερόλεπτα, σε θερμοκρασία δωματίου.
- Απεσταγμένο νερό, για 15 δευτερόλεπτα, σε θερμοκρασία δωματίου.
- Εμβάπτιση με διάλυμα αιματοξυλίνης για 10 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου.

- Πλύση με νερό βρύσης.
- Πλύση με οξυνισμένη αλκοόλη για 15 δευτερόλεπτα, σε θερμοκρασία δωματίου.
- Πλύση με νερό βρύσης.
- Διάλυμα αλκοόλης 80%, για 15 δευτερόλεπτα, σε θερμοκρασία δωματίου.
- Εμβάπτιση με διάλυμα ηωσίνης για 8 δευτερόλεπτα, σε θερμοκρασία δωματίου.
- Αφυδάτωση των τομών σε ανιούσα διαλυμάτων αλκοόλης.
- Διάλυμα αλκοόλης 50%, για 15 δευτερόλεπτα, σε θερμοκρασία δωματίου.
- Διάλυμα αλκοόλης 80%, για 15 δευτερόλεπτα, σε θερμοκρασία δωματίου.
- Διάλυμα αλκοόλης 96%, για 15 δευτερόλεπτα, σε θερμοκρασία δωματίου.
- Διάλυμα αλκοόλης 100%, για 15 δευτερόλεπτα, σε θερμοκρασία δωματίου.
- Διάλυμα ξυλόλης, για 15 δευτερόλεπτα, σε θερμοκρασία δωματίου.
- Δεύτερο διάλυμα ξυλόλης, για 15 δευτερόλεπτα, σε θερμοκρασία δωματίου.
- Επικάλυψη των τομών με καλυπτρίδες.
- Παρατήρηση των τομών σε οπτικό μικροσκόπιο.

Στη συνέχεια, από τους κύβους παραφίνης κόπηκαν άλλες τομές στις οποίες πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημεία. Το kit ανίχνευσης που χρησιμοποιήθηκε είναι το NovoLink™ Polymer Detection System της Novocastra. Το πρωτογενές αντίσωμα το οποίο χρησιμοποιήθηκε είναι το Chlamydia trachomatis Antibody (K14.67) από την εταιρία Novus Biologicals. Είναι μονοκλωνικό αντίσωμα, ανήκει στην οικογένεια των ανοσοσφαιρινών IgG και αλληλεπιδρά με μια μείζονα πρωτεΐνη επιφανείας των *C. trachomatis*.

Το πρωτόκολλο της ανοσοϊστοχημείας που ακολουθήθηκε είναι το εξής:

- Αποπαραφίνωση των τομών σε διάλυμα ξυλόλης για 10 λεπτά, επί τέσσερις φορές (σε θερμοκρασία 65 °C οι πρώτες τρεις φορές και σε θερμοκρασία δωματίου η τέταρτη).
- Ενυδάτωση των τομών σε κατιούσα διαλυμάτων αλκοόλης.

- Διάλυμα αλκοόλης 100%, για 10 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου.
- Δεύτερο διάλυμα αλκοόλης 100%, για 10 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου.
- Διάλυμα αλκοόλης 96%, για 10 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου.
- Διάλυμα αλκοόλης 80%, για 10 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου.
- Διάλυμα αλκοόλης 50%, για 10 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου.
- Απεσταγμένο νερό, για 10 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου.
- Επώαση των τομών με προθερμασμένο διάλυμα κιτρικών 95 °C-100°C για 20 λεπτά. Το διάλυμα κιτρικών αποτελείται από 21,014g Citric acid monohydrate σε 1000ml απεσταγμένο νερό και έχει pH=6.
- Επώαση των τομών με διάλυμα κιτρικών για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Απεσταγμένο νερό, για 10 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου.
- Μαρκάρισμα των τομών με ειδικό μαρκαδόρο PAP pen.
- Επώαση με διάλυμα Tris Buffered Saline (TBS), 50mM, pH=7,6 για 10 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου.
- Εξουδετέρωση της ενδογενούς υπεροξειδάσης με χρήση του Peroxidase Block (υπεροξείδιο του υδρογόνου 3%) για 8 λεπτά σε σκοτάδι.
- Πλύση με TBS για 5 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου.
- Δεύτερη πλύση με TBS για 10 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου.
- Επώαση με Protein Block (καζεΐνη 0,4% σε ρυθμιστικό αλατούχο διάλυμα φωσφορικών με σταθεροποιητές, επιφανειοδραστικό παράγοντα και 0,2% Bronidox L ως συντηρητικό) σε αραιώση 1:3 για 8 λεπτά σε σκοτάδι.
- Πλύση με TBS για 5 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου.
- Δεύτερη πλύση με TBS για 10 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου.
- Επώαση των τομών με το πρωτογενές αντίσωμα Chlamydia trachomatis Antibody σε αραιώση 1:1000.
- Φύλαξη των τομών με το αντίσωμα σε τριβλία με υγρασία στη συντήρηση του ψυγείου, όλη τη νύχτα.
- Την επόμενη μέρα, πλύση με κρύο TBS (από το ψυγείο) για 5 λεπτά.
- Δεύτερη πλύση με TBS για 10 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου.
- Επώαση με Post Primary Block (πολυμερής παράγοντας ενίσχυσης της διείσδυσης που περιέχει 10% (v/v) ζωικό ορό σε αλατούχο

ρυθμιστικό διάλυμα Tris/0,09% ProClin™ 950) σε αραίωση 1:3 για 30 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου.

- Πλύση με TBS για 5 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου.
- Δεύτερη πλύση με TBS για 10 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου.
- Επώαση με NovoLink Polymer (IgG αντι-ποντικού/κουνελιού-Poly-HRP που περιέχει 10% (v/v) ζωικό ορό σε αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα Tris/0,09% ProClin™ 950) σε αραίωση 1:3 για 30 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου.
- Πλύση με TBS για 5 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου.
- Δεύτερη πλύση με TBS για 10 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου.
- Ανάπτυξη δραστηριότητας υπεροξειδάσης με διάλυμα εργασίας DAB το πολύ για 8 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου. Το DAB Chromogen (1,74% w/v 3,3'-διαμινοβενζιδίνη σε διάλυμα σταθεροποιητή) αραιώνεται σε NovoLink DAB Substrate Buffer (ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει υπεροξείδιο του υδρογόνου 0,05% και συντηρητικό) σε αραίωση 1:20 και η προεργασία του γίνεται άμεσα πριν τη χρήση.
- Πλύση 2-3 φορές με νερό βρύσης.
- Χρώση με αιματοξυλίνη 0,02% για 3 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου.
- Πλύση 2-3 φορές με νερό βρύσης.
- Αφυδάτωση των τομών σε ανιούσα διαλυμάτων αλκοόλης.
- Διάλυμα αλκοόλης 50%, για 1.30 λεπτό, σε θερμοκρασία δωματίου.
- Διάλυμα αλκοόλης 80%, για 1.30 λεπτό, σε θερμοκρασία δωματίου.
- Διάλυμα αλκοόλης 96%, για 1.30 λεπτό, σε θερμοκρασία δωματίου.
- Διάλυμα αλκοόλης 100%, για 1.30 λεπτό, σε θερμοκρασία δωματίου.
- Διάλυμα ξυλόλης, για 1.30 λεπτό, σε θερμοκρασία δωματίου.
- Δεύτερο διάλυμα ξυλόλης, για 1.30 λεπτό, σε θερμοκρασία δωματίου.
- Επικάλυψη των τομών με καλυπτρίδες.
- Παρατήρηση των τομών σε οπτικό μικροσκόπιο.

2.3.5 Μικροσκοπική παρατήρηση

Οι τομές με χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης και ανοσοϊστοχημείας παρατηρήθηκαν σε οπτικό μικροσκόπιο OLYMPUS BX41. Η μεγέθυνση ήταν x100.

2.4 Στατιστική ανάλυση

Για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων μεταξύ των ομάδων γυναικών χρησιμοποιήθηκε το κριτήριο χ^2 του Pearson μέσω του στατιστικού προγράμματος SPSS 19.0. Η στατιστική σημαντικότητα τέθηκε στο 0,05.

2.5 Αποτελέσματα

2.5.1 Μοριακή ανίχνευση

Από την ομάδα των 78 γυναικών με προβλήματα γονιμότητας, DNA του *C. trachomatis* ανιχνεύθηκε στις 30 με τη μέθοδο της real-time PCR (μέση τιμή χλαμυδιακού DNA $6.65 \times 10^5 \pm 4.7 \times 10^4$ copies/μg), δηλαδή σε ποσοστό 38.5%. Από την ομάδα των 43 γόνιμων γυναικών, DNA του *C. trachomatis* ανιχνεύθηκε στις 8 (μέση τιμή χλαμυδιακού DNA $1.4 \times 10^5 \pm 1.06 \times 10^4$ copies/μg), δηλαδή σε ποσοστό 18.6% (Πίνακας 1). Η διαφορά αυτή των ποσοστών είναι στατιστικά σημαντική με $p=0.024$. Επίσης, από τις 78 γυναίκες με προβλήματα γονιμότητας, οι 59 δεν έχουν στο ιατρικό τους ιστορικό καμία σύλληψη και στις 23 από αυτές ανιχνεύθηκε DNA του *C. trachomatis*, δηλαδή σε ποσοστό 38.9% (Πίνακας 2). Η διαφορά και αυτού του ποσοστού σε σύγκριση με το ποσοστό των γόνιμων γυναικών είναι στατιστικά σημαντική με $p=0.027$.

	<i>C. trachomatis</i>
Γυναίκες με προβλήματα γονιμότητας	38.5% (30/78)
Γόνιμες γυναίκες	18.6% (8/43)

Πίνακας 1: Ποσοστά ανίχνευσης του *C. trachomatis* σε γυναίκες με προβλήματα γονιμότητας και σε γόνιμες γυναίκες.

	<i>C. trachomatis</i>
Γυναίκες χωρίς σύλληψη	38.9% (23/59)
Γόνιμες γυναίκες	18.6% (8/43)

Πίνακας 2: Ποσοστά ανίχνευσης του *C. trachomatis* σε γυναίκες χωρίς ιστορικό σύλληψης και σε γόνιμες γυναίκες.

Το ιατρικό ιστορικό των γυναικών με προβλήματα γονιμότητας καθώς και η παρουσία ή μη του *C. trachomatis* στην καθεμία, παρουσιάζονται στον Πίνακα 3. Μια πιο συνοπτική εικόνα της

παρουσίας του *C. trachomatis* ανάλογα με το ιστορικό των γυναικών αυτών παρουσιάζεται στον Πίνακα 4. Οι παράγοντες υπογονιμότητας στις οποίες κατατάχθηκαν οι γυναίκες αυτές είναι οι εξής: σαλπιγγικός παράγοντας (απόφραξη σαλπίγγων), ενδομητρίωση, ενδοκρινολογικός παράγοντας (ορμονικές διαταραχές, σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών - PCOS), ανωοθυλακιορρηξία, ανεξήγητη υπογονιμότητα, αυτόματες αποβολές/ παλίνδρομη κύηση, έκτοπη κύηση και ανδρικός παράγοντας. Κάποιες γυναίκες, όπως φαίνεται στον Πίνακα 3, ανήκαν σε περισσότερες από μια κατηγορίες.

ID	Σαλπιγγικός παράγοντας	Ενδομητρίωση	Ενδοκρινολογικός παράγοντας	Ανωθυλακιορρηξία	Ανεξήγητη υπογονιμότητα	Αυτόματες αποβολές/ Παλίνδρομη κύηση	Έκτοπη κύηση	Ανδρικός παράγοντας	<i>C. trachomatis</i>
1						+			+
2			+						-
3	+								-
4	+								+
5					+				-
6						+			-
7	+								+
8				+					-
9						+			-
10						+	+		+
11		+							-
12			+						-
13	+							+	+
14			+						-
15					+				-
16				+					-
17	+								-
18			+					+	-
19		+							-
20						+	+		+
21						+			-
22				+					+
23					+				+
24			+				+		-
25	+								+
26				+					-
27						+			+
28						+			-
29						+			-
30		+							+
31			+						-
32				+					+
33	+								+
34						+			-
35					+				+
36		+							-
37			+					+	+
38						+			-
39						+			-
40	+								+

ID	Σαλπιγγικός παράγοντας	Ενδομητρίωση	Ενδοκρινολογικός παράγοντας	Ανωοθυλακιορρηξία	Ανεξήγητη υπογονιμότητα	Αυτόματες αποβολές/ Παλίνδρομη κύηση	Έκτοπη κύηση	Ανδρικός παράγοντας	<i>C. trachomatis</i>
41			+					+	-
42						+			-
43			+						+
44						+			-
45	+								+
46					+				-
47	+								+
48				+					+
49		+							-
50			+					+	-
51			+						+
52	+								+
53						+	+		+
54			+						-
55					+				-
56	+								+
57	+								-
58				+					-
59			+						-
60			+						-
61					+				+
62		+							-
63	+							+	-
64	+								-
65				+					-
66			+						+
67			+			+			-
68						+			+
69					+				-
70	+								+
71			+			+			+
72				+					-
73	+							+	-
74			+					+	-
75				+					-
76		+							-
77			+						+
78	+								-

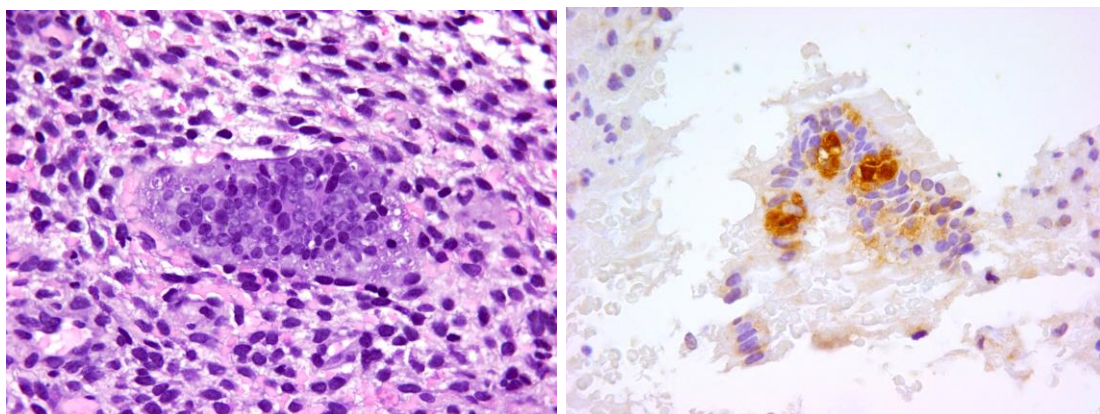
Πίνακας 3: Ιστορικό των γυναικών με προβλήματα γονιμότητας και η παρουσία ή μη του *C. trachomatis* στην καθεμία.

	<i>C. trachomatis</i>
Σαλπινγκικός παράγοντας (n=18)	11/18 (61.1%)
Ενδομητρίωση (n=7)	1/7 (14.3%)
Ενδοκρινολογικός παράγοντας (n=19)	6/19 (31.6%)
Ανωοθυλακιορρηξία (n=10)	3/10 (30%)
Ανεξήγητη υπογονιμότητα (n=8)	3/8 (37.5%)
Αυτόματες αποβολές/ παλίνδρομη κύηση (n=18)	7/18 (38.9%)
Έκτοπη κύηση (n=4)	3/4 (75%)
Ανδρικός παράγοντας (n=8)	2/8 (25%)

Πίνακας 4: Παρουσία του *C. trachomatis* ανά παράγοντα υπογονιμότητας.

2.5.2 Ανοσοϊστοχημική ανίχνευση

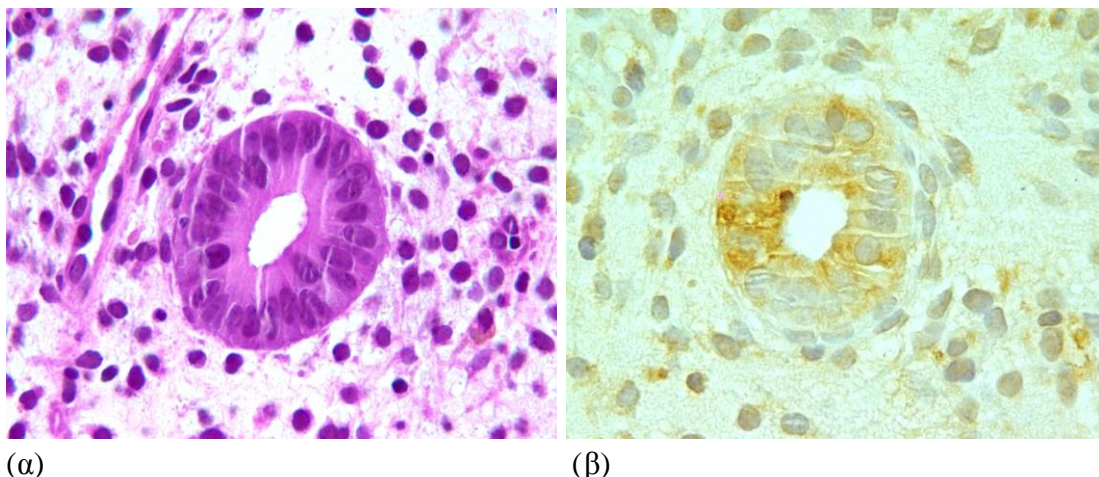
Οι 3 βιοψίες ενδομητρίου οι οποίες ανήκαν σε γυναίκες της ομάδας με προβλήματα γονιμότητας, βγήκαν θετικές σε *C. trachomatis* με την ανοσοϊστοχημική μέθοδο. *C. trachomatis* ανιχνεύθηκαν και στον ιστό περιόδου των γυναικών αυτών με τη μέθοδο της real-time PCR, με γλαμυδιακό DNA 3.4×10^2 , 2.3×10^2 και 1.7×10^2 copies/μg αντίστοιχα. Οι Εικόνες 10 (α και β) και 11 (α και β) αποτελούν αντιπροσωπευτικές απεικονίσεις της χρώσης αιματοξυλίνης-ηωσίνης και της ανοσοϊστοχημείας αντίστοιχα των βιοψιών αυτών. Στην ανοσοϊστοχημεία η παρουσία των καστανόχρωμων εγκλείστων στο κυτταρόπλασμα των επιθηλιακών κυττάρων υποδηλώνουν την ύπαρξη *C. trachomatis*.



(α)

(β)

Εικόνα 10: Βιοψία ενδομητρίου. Μεγέθυνση x100. (α) Απεικόνιση χρώσης αιματοξυλίνης-ηωσίνης (ιστολογική). (β) Ανοσοϊστοχημική απεικόνιση *C. trachomatis* σε επιθηλιακά κύτταρα ενδομητρίου.

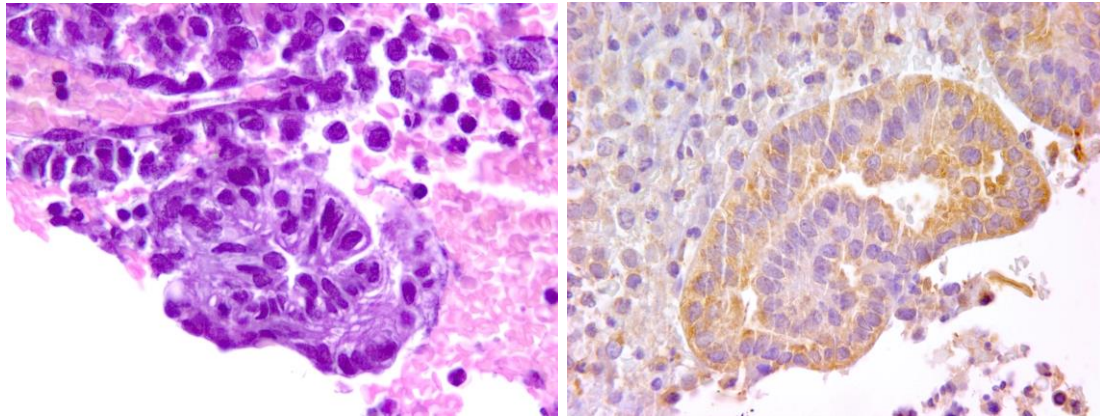


(α)

(β)

Εικόνα 11: Βιοψία ενδομητρίου. Μεγέθυνση x100. (α) Απεικόνιση χρώσης αιματοξυλίνης-ηωσίνης (ιστολογική). (β) Ανοσοϊστοχημική απεικόνιση *C. trachomatis* σε επιθηλιακά κύτταρα ενδομητρίου.

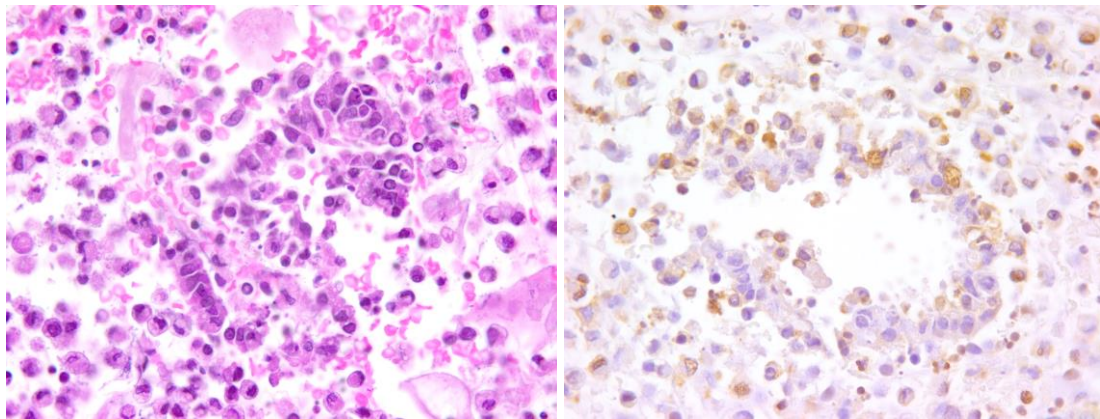
Από τα 8 δείγματα ιστού περιόδου στα οποία εφαρμόστηκε και ανοσοϊστοχημεία, *C. trachomatis* ανιχνεύθηκαν στα 6 με τη μέθοδο της real-time PCR, με γλαυδιακό DNA 2×10^3 , 1.6×10^5 , 3.4×10^2 , 1.2×10^3 , 3.3×10^4 και 8.9×10^2 copies/μg αντίστοιχα. Η παρουσία *C. trachomatis* στα 6 από τα 8 δείγματα ιστού περιόδου επαληθεύτηκε και με τη μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας. Οι Εικόνες 12 (α και β) και 13 (α και β) εκπροσωπούν τις απεικονίσεις της χρώσης αιματοξυλίνης-ηωσίνης και της ανοσοϊστοχημείας αντίστοιχα των δειγμάτων ιστού περιόδου. Στην ανοσοϊστοχημεία, όπως προαναφέρθηκε, η παρουσία των καστανόχρωμων εγκλείστων στο κυτταρόπλασμα των επιθηλιακών κυττάρων υποδηλώνουν την ύπαρξη *C. trachomatis*.



(α)

(β)

Εικόνα 12: Ιστός περιόδου. Μεγέθυνση x100. (α) Απεικόνιση χρώσης αιματοξυλίνης-ηωσίνης (ιστολογική). (β) Ανοσοϊστοχημική απεικόνιση *C. trachomatis* σε επιθηλιακά κύτταρα ενδομητρίου.

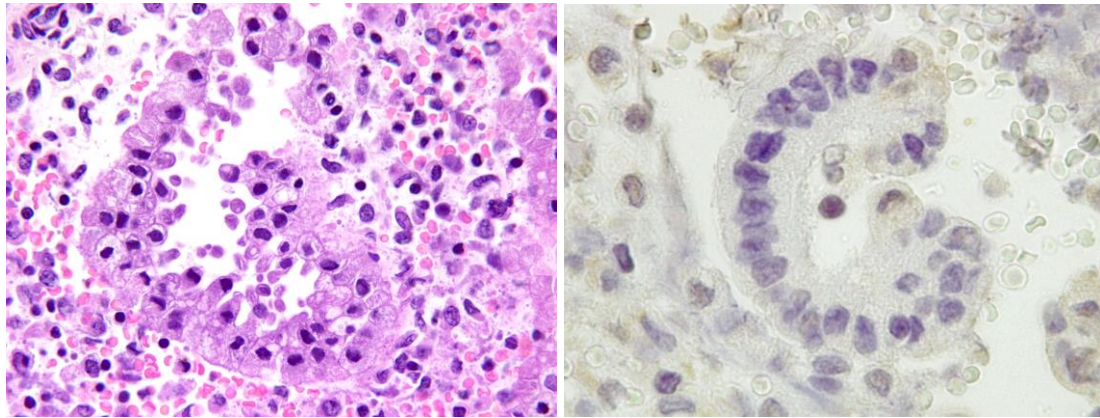


(α)

(β)

Εικόνα 13: Ιστός περιόδου. Μεγέθυνση x100. (α) Απεικόνιση χρώσης αιματοξυλίνης-ηωσίνης (ιστολογική). (β) Ανοσοϊστοχημική απεικόνιση *C. trachomatis* σε επιθηλιακά κύτταρα ενδομητρίου.

Η Εικόνα 14 (α και β) εκπροσωπεί τις απεικονίσεις της χρώσης αιματοξυλίνης-ηωσίνης και της ανοσοϊστοχημείας αντίστοιχα των δειγμάτων ιστού περιόδου τα οποία ήταν αρνητικά για *C. trachomatis*.



(α)

(β)

Εικόνα 14: Ιστός περιόδου. Μεγέθυνση x100. (α) Απεικόνιση χρώσης αιματοξυλίνης-ηωσίνης (ιστολογική). (β) Ανοσοϊστοχημική απεικόνιση επιθηλιακών κυττάρων ενδομητρίου, αρνητικών για *C. trachomatis*.

2.6 Συζήτηση

Η λοίμωξη του γεννητικού συστήματος από *C. trachomatis* αποτελεί μια από τις πιο κοινές σεξουαλικά μεταδιδόμενες λοιμώξεις παγκοσμίως, με ιδιαίτερα ανοδική πορεία επέκτασης στις χώρες της Ευρώπης (ECDC, 2012). Η λοίμωξη αυτή, η οποία στην πλειοψηφία των περιπτώσεων είναι ασυμπτωματική, έχει σοβαρό αντίκτυπο ιδιαίτερα στις γυναίκες και την αναπαραγωγική τους υγεία, καθώς τα Χλαμύδια συμβάλλουν σε προβλήματα γονιμότητας (Akande *et al.* 2010; Mardh, 2002). Γι αυτό το λόγο έχει μεγάλη σημασία η έγκαιρη διάγνωση και θεραπεία της λοίμωξης τόσο στις γυναίκες όσο και στους άνδρες (Templenton, 2000; Akande *et al.* 2010).

Στην παρούσα εργασία, *C. trachomatis* ανιχνεύτηκε με τη μέθοδο της real-time PCR στον ιστό περιόδου των γυναικών με προβλήματα γονιμότητας (υπογονιμότητα, παλίνδρομη κύηση, αυτόματες αποβολές, έκτοπη κύηση) σε ποσοστό 38.5%, σε σύγκριση με τις γόνιμες γυναίκες που το ποσοστό ανίχνευσης ήταν 18.6%. Επιπλέον, *C. trachomatis* ανιχνεύτηκε σε ποσοστό 38.9% των γυναικών οι οποίες δεν είχαν στο ιστορικό τους καμία σύλληψη (υπογονιμότητα). Τα ποσοστά αυτά ανίχνευσης στην ομάδα των γυναικών με προβλήματα γονιμότητας είναι αρκετά υψηλά και αποτελούν επιπλέον απόδειξη στις ήδη υπάρχουσες μελέτες ότι το *C. trachomatis* συμβάλει στην αδυναμία σύλληψης και γενικότερα σε προβλήματα γονιμότητας. Αντιστρόφως, τα παραπλήσια

ποσοστά θετικότητας μεταξύ της ομάδας γυναικών με αδυναμία σύλληψης σε σχέση με αυτά των υπογόνιμων γυναικών με ιστορικό ανεπιτυχών κυήσεων, παρουσιάζονται συνηγορητικά προς τις επιστημονικές θεωρήσεις για τις ομάδες αυτές ότι πρόκειται για καταστάσεις που οφείλονται σε παρόμοια αίτια. Σε εργασία των Μίχου και συνεργατών 2003, φαίνεται ότι και ο ανοσολογικός παράγοντας υπογονιμότητας που μελετάται με τη συγκέντρωση των NK κυττάρων στο περιφερικό αίμα χαρακτηρίζει την υπογονιμότητα αλλά και τις αποβολές, μόνο όμως σε έδαφος «δύσκολης σύλληψης» (Michou *et al.*, 2003).

Ο ιστός περιόδου (ιστός αποπεπτωκώτος ενδομητρίου) έχει χρησιμοποιηθεί ως υλικό εξέτασης για ανίχνευση του *C. trachomatis*, με real-time PCR, σε μια πρόσφατη μελέτη των Μίχου και συνεργατών 2013, στην οποία η ανίχνευση υπήρξε σε ποσοστό 25.3% υπογόνιμων γυναικών (μέσης ηλικίας 34.04 ± 5.17 έτη), σε σύγκριση με το ποσοστό 18.3% από την ίδια ομάδα γυναικών, όπου το υλικό εξέτασης ήταν κυτταρικό εναιώρημα του τραχήλου της μήτρας (Michou *et al.*, 2013). Τα αποτελέσματα αυτά έδειξαν την μικροβιακή παρουσία κυρίως στο ανώτερο γεννητικό σύστημα της γυναίκας. Σε μια άλλη μελέτη, όπου χρησιμοποιήθηκαν οι τεχνικές της κυτταροκαλλιέργειας και του ανοσοφθορισμού σε τραχηλικά επιχρίσματα, *C. trachomatis* ανιχνεύθηκαν σε ποσοστό 31.8% υπογόνιμων γυναικών και σε ποσοστό 5.8% γόνιμων γυναικών (Gorini *et al.*, 1990). Επίσης, σε μια άλλη μελέτη, όπου χρησιμοποιήθηκαν η κυτταροκαλλιέργεια και η ανοσοενζυμική μέθοδος (EIA) σε τραχηλικά επιχρίσματα, *C. trachomatis* ανιχνεύθηκαν σε ποσοστό 28.1% υπογόνιμων γυναικών και σε ποσοστό 3.3% γόνιμων γυναικών (Malik *et al.*, 2006). Συγκεκριμένα, με την κυτταροκαλλιέργεια ανιχνεύθηκαν *C. trachomatis* σε ποσοστό 22.72% υπογόνιμων γυναικών και με την ανοσοενζυμική μέθοδο σε ποσοστό 16.37%. Το ποσοστό ανίχνευσης στις γόνιμες γυναίκες (3.3%) βρέθηκε μόνο με την κυτταροκαλλιέργεια. Επιπλέον, σε μια μελέτη όπου έγινε ανίχνευση του *C. trachomatis* σε δείγματα φρέσκου ιστού από το ενδομήτριο, τις σάλπιγγες και τις ωοθήκες με μοριακή μέθοδο, βρέθηκε ότι το 56% των γυναικών με ιστορικό έκτοπων κυήσεων και το 71% των γυναικών με υπογονιμότητα σαλπινγικού παράγοντα είχαν χλαμυδιακό DNA (Barlow *et al.* 2001).

Επιπροσθέτως, η αυξημένη ευαισθησία της PCR σε σχέση με άλλες τεχνικές όπως αυτή της κυτταροκαλλιέργειας, συμβάλλει περισσότερο στο να έχουμε λιγότερα ψευδώς-αρνητικά αποτελέσματα και επομένως έγκαιρη διάγνωση. Αυτό φαίνεται και σε μια μελέτη όπου το 36% των γυναικών με αρνητικό τεστ καλλιέργειας στην παρουσία χλαμυδίων, ήταν θετικές με την μέθοδο της PCR (Toth *et al.*, 2000). Προφανώς η PCR έχει τη δυνατότητα ανίχνευσης της λανθάνουσας κατάστασης (dormant state) που πολλές φορές καταφεύγει το χλαμύδιο ύστερα από ανοσιακή ενεργοποίηση ή και θεραπευτική αντιμετώπιση, αναμένοντας την έκπτωση της ανοσιακής επαγρύπνησης για να περάσει στη μολυσματική κατάσταση εξάγοντας στον εξωκυττάριο χώρο νέα στοιχειώδη σωματίδια (EB) για την έναρξη νέων μολυσματικών κύκλων.

Τα Χλαμύδια φαίνεται να προσβάλουν κυρίως το ανώτερο γεννητικό σύστημα των γυναικών αφήνοντας πολλές φορές τον κόλπο και τον τράχηλο της μήτρας ανεπηρέαστο. Αυτό φαίνεται και σε μια μελέτη η οποία έδειξε ότι το 65% γυναικών που υποβλήθηκαν σε λαπαροσκόπηση, με αρνητικό τεστ καλλιέργειας σε επιχρίσματα του κατώτερου γεννητικού συστήματος, είχαν χλαμυδιακή λοίμωξη μόνο στο ανώτερο γεννητικό σύστημα (Luciano *et al.*, 1992). Επομένως, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι τα Χλαμύδια εδράζονται κυρίως στο ανώτερο γεννητικό σύστημα των γυναικών και υλικά εξέτασης όπως τα κολποτραχηλικά επιχρίσματα να μην είναι ίσως τα πιο κατάλληλα για ανίχνευση του χλαμυδιακού DNA. Ο ιστός περιόδου αντίθετα, έχει το μεγαλύτερο πλεονέκτημα ότι προέρχεται από το ενδομήτριο, όπου τα επιθηλιακά κύτταρα είναι κυλινδρικά και αποτελούν τους κυτταρικούς στόχους του χλαμυδίου. Επίσης, είναι ένα υλικό που μπορεί να συλλεχτεί εύκολα στο σπίτι, χωρίς τη βοήθεια ιατρού, από όλες τις γυναίκες, συμπεριλαμβανομένων και αυτών χωρίς σεξουαλική δραστηριότητα. Η συλλογή, όμως, θα πρέπει να αφορά την πρώτη μέρα της μεγαλύτερης ροής, όταν δηλαδή περιέχονται στο αίμα περιόδου τα ενδομητρικά (συμπαγή) στοιχεία. Ένα μειονέκτημα αυτού του είδους εξέτασης σε σύγκριση με την καλλιέργεια είναι η αδυναμία πραγματοποίησης τεστ ευαισθησίας σε αντιβιοτικά (Michou *et al.*, 2013).

Όσον αφορά το κομμάτι της ανοσοϊστοχημείας, δεν έχει αναφερθεί ξανά στη βιβλιογραφία μελέτη ανίχνευσης του *C. trachomatis* στον ιστό περιόδου με τη μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας. Η τεχνική αυτή έχει χρησιμοποιηθεί σε μελέτες ανίχνευσης του χλαμυδίου σε υλικά εξέτασης

όπως κυρίως οι βιοψίες επιδιδυμίδας, πλακούντα, ενδομητρίου και τοιχώματος μήτρας (Hori and Tsutsumi, 1995; Pal *et al.*, 1999; Baud *et al.*, 2011; Paukku *et al.*, 1999; Mount *et al.*, 2001; Kannar *et al.*, 2012). Ο αριθμός των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη (3 βιοψίες ενδομητρίου και 8 δείγματα ιστού περιόδου) ήταν μικρός καθώς δεν ήταν εφικτό να υπάρξουν σε όλα τα δείγματα ιστού περιόδου συμπαγή τεμάχια που να αποτελούνται από ενδομητρικό ιστό, έτσι ώστε αυτά να μπορούν να μονιμοποιηθούν και να εγκλωβιστούν σε κύβο παραφίνης. Παρόλα αυτά, η παρουσία του *C. trachomatis* στις 3 βιοψίες ενδομητρίου και στα 6 από τα 8 δείγματα ιστού περιόδου με την ανοσοϊστοχημική μέθοδο, επαλήθευσαν τα αποτελέσματα της μοριακής μεθόδου real-time PCR. Το πρωτογενές αντίσωμα το οποίο χρησιμοποιήθηκε [Chlamydia trachomatis Antibody (K14.67)], έχει χρησιμοποιηθεί σε μια μελέτη ανίχνευσης του *C. trachomatis* σε βιοψίες επιδιδυμίδας (Hori and Tsutsumi, 1995).

Εν τέλει, η χρήση της μοριακής μεθόδου real-time PCR σε δείγματα ιστού περιόδου θα μπορούσε να επεκταθεί και σε άλλου είδους μικρόβια που προσβάλλουν το γεννητικό σύστημα και πιθανά συμβάλλουν στην υπογονιμότητα ή ακόμα και σε άλλες παθολογικές μολυσματικές καταστάσεις, όπως π.χ. η φυματίωση.

3 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1395670: Μέθοδος διερεύνησης του ενδομητρίου με εξετάσεις που εφαρμόζονται επί του ιστού αποπεπτωκότος ενδομητρίου (ιστού περιόδου). Τσιλιβάκος Β. Δίπλωμα ευρεσιτεχνίας διεθνούς ισχύος. Αριθμ. OBI: 1004154, INT CL: Go 1N 33/50, Go 1N 33/569, B01L 3/00. Ευρωπαϊκός Αριθμός Ευρεσιτεχνίας: 1395670

Κρεατσάς Γ. Γυναικολογία και Μαιευτική. τόμος Ι. Ιατρικές εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης. Αθήνα 2009.

Λαϊνάς Τ.Γ. Επιδημιολογία και διαγνωστική προσέγγιση του υπογόνιμου ζευγαριού. Μονάδα Μελέτης και Θεραπείας της Υπογονιμότητας. Ιατρική Έρευνα Α.Ε. Αθήνα 2002.

Νακοπούλου Α. Ανοσοϊστοχημεία. Ιατρικές εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης. Αθήνα 1999.

Abbate R, Sofi F, Gensini F, Fatini C, Sticchi E, Fedi S. Thrombophilias as risk factors for disorders of pregnancy and fetal damage. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2002;32(5-6):318-321.

Aboulghar M, Mansour R, Serour G, Al-Inany H. Diagnosis and management of unexplained infertility: an update. *Arch Gynecol Obstet* 2003;267(4):177-188.

Akande V, Turner C, Horner P, Horne A, Pacey A; British Fertility Society. Impact of Chlamydia trachomatis in the reproductive setting: British Fertility Society Guidelines for practice. *Hum Fertil (Camb)* 2010;13(3):115-25.

American Society for Reproductive Medicine (ASRM). Definition of infertility and recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril* 2008;90:S60.

American Society for Reproductive Medicine (ASRM). Practice Committee. Optimal evaluation of the infertile male. *Fertil Steril* 2006;86:S203-209.

American Society for Reproductive Medicine (ASRM). Practice Committee. Endometriosis and infertility. *Fertil Steril* 2006;86:S156-60.

American Society for Reproductive Medicine (ASRM). Practice Committee. Effectiveness and treatment for unexplained infertility. *Fertil Steril* 2006;86:S111-4.

American Society for Reproductive Medicine (ASRM) in collaboration with Society for Reproductive Endocrinology and I. Practice Committee. Optimizing natural fertility. *Fertil Steril* 2008;90:S1-6.

Baczynska A, Funch P, Fedder J, Knudsen HJ, Birkelund S, Christiansen G. Morphology of human Fallopian tubes after infection with *Mycoplasma genitalium* and *Mycoplasma hominis*-in vitro organ culture study. *Human Reproduction* 2007;22:968-979.

Barlow RE, Cooke ID, Odukoya O, Heatley MK, Jenkins J, Narayansingh G, Ramsewak SS, Eley A. The prevalence of *Chlamydia trachomatis* in fresh tissue specimens from patients with ectopic pregnancy or tubal factor infertility as determined by PCR and in-situ hybridisation. *J Med Microbiol* 2001;50(10):902-8.

Baud D, Goy G, Jatou K, Osterheld MC, Blumer S, Borel N, Vial Y, Hohlfield P, Pospischil A, Greub G. Role of *Chlamydia trachomatis* in miscarriage. *Emerg Infect Dis* 2011;17(9):1630-5.

Beatty WL, Byrne GI, Morrison RP. Repeated and persistent infection with *Chlamydia* and the development of chronic inflammation and disease. *Trends Microbiol* 1994;2:94-98.

Beerger RE, Alexander ER, Monda GD, Ansell J, McCormick G, Holmes KK. *Chlamydia trachomatis* as a cause of acute "idiopathic" epididymitis. *N Engl J Med* 1978;298:301-4.

Behjati R, Modarressi MH, Jeddi-Tehrani M, Dokoohaki P, Ghasemi J, Zarnani AH, Aarabi M, Memariani T, Ghaffari M, Akhondi MA. Thrombophilic mutations in Iranian patients with infertility and recurrent spontaneous abortion. *Ann Hematol*. 2006;85(4):268-71.

Benagiano G, Bastianelli C, Farris M. [Infertility: a global perspective]. *Minerva Ginecol* 2006;58(6):445-57.

Bjoro T, Holmen J, Krüger O, Midthjell K, Hunstad K, Schreiner T, Sandnes L, Brochmann H. Prevalence of thyroid disease, thyroid dysfunction and thyroid peroxidase antibodies in a large, unselected population. The Health Study of Nord-Trøndelag (HUNT). *Eur J Endocrinol* 2000;143(5):639-47.

Black CM. Current methods of laboratory diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infection. *Clin Microbiol Rev* 1997;10:160-184.

Boivin J, Bunting L, Collins JA, Nygren KG. International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. *Hum Reprod* 2007;22(6):1506-12.

Buckley CH. Normal endometrium and non-proliferative conditions of the endometrium. In: Fox 4, Wells M eds. *Obstetrical and gynaecological pathology*. 5th ed. London: hurchill Livingstone, 2002: 391-442.

Buyalos RP, Agarwal SK. Endometriosis-associated infertility. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2000;12:377-381.

Capoccia R, Greub G, Baud D. *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis* and adverse pregnancy outcomes. *Curr Opin Infect Dis* 2013;26(3):231-40.

Carr BR, Wilson JD. Disorders of the ovary and female reproductive tract. In: Wilson JD, Braunwald E, Isselbacher KJ, et al, eds. Harrison's Principles of Internal Medicine. 12th ed. New York, NY: McGraw-Hill; 1991:1776-1795.

Cassell GH, Davis RO, Waites KB, Brown MB, Marriott PA, Stagno S, Davis JK. Isolation of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* from amniotic fluid at 16–20 weeks of gestation: potential effect on outcome of pregnancy. Sex Transm Dis 1983;10:294–302.

Cates W, Wasserheit JN. Genital chlamydial infections: epidemiology and reproductive sequelae. Am J Obstet Gynecol 1991;164:1771–81.

Centers for Disease Control (CDC). False-positive results with the use of chlamydia tests in the evaluation of suspected sexual abuse--Ohio, 1990. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1991;39(51-52):932-5.

Chard T. Frequency of implantation and early pregnancy loss in natural cycles. Baillieres Clin Obstet Gynaecol 1991;5:179–89.

Clifford K, Rai R, Watson H, Regan L. An informative protocol for the investigation of recurrent miscarriage: preliminary experience of 500 consecutive cases. Hum Reprod 1994;9:1328–32.

Coons AH, Kaplan MH. Localization of antigen in tissue cells; improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody. J Exp Med 1950;91(1):1-13.

Cooper MD, Rapp J, Jeffery-Wiseman C, Barnes RC, Stephens DS. *Chlamydia trachomatis* infection of human fallopian tube organ cultures. Journal of General Microbiology 1990;136:1109-1115.

Cooper TG, Noonan E, von Eckardstein S, Auger J, Baker HW, Behre HM, Haugen TB, Kruger T, Wang C, Mbizvo MT, Vogelsong KM. World health organization reference values for human semen characteristics. Hum Reprod 2010;16(3):231-245.

Coutifaris C, Myers ER, Guzick DS, Diamond MP, Carson SA, Legro RS, et al. Histological dating of timed endometrial biopsy tissue is not related to fertility status. Fertil Steril 2004;82:1264-72.

Coulam CB, Goodman C, Roussev RG, Thomanson EJ, Beaman KD. Systemic CD56+ cells can predict pregnancy outcome. Am J Reprod Immunol 1995;33:40–46.

Coulam CB, Jeyendran RS. Thrombophilic gene polymorphisms are risk factors for unexplained infertility. Fertil Steril. 2009;91(4 Suppl):1516-7.

de Crespigny LC, O'Herlihy C, Robinson HP. Ultrasonic observation of the mechanism of human ovulation. Am J Obstet Gynecol 1981;139(6):636-9.

den Hartog JE, Morré SA, Land JA. *Chlamydia trachomatis*-associated tubal factor subfertility: Immunogenetic aspects and serological screening. *Hum Reprod Update* 2006;12:719–730.

Dunlop EM, Goh BT, Darougar S, Woodland R. Triple-culture tests for diagnosis of chlamydial infection of the female genital tract. *Sex Transm Dis* 1985;12(2):68-71.

Eniola OW, Adetola AA and Abayomi BT. A review of Female Infertility; important etiological factors and Management. *J Microbiol Biotech Res* 2012;2(3):379-385.

Eschenbach, DA, Hillier S, Critchlow C, Stevens C, DeRouen T, Holmes KK. Diagnosis and clinical features associated with bacterial vaginosis. *Am J Obstet Gynecol* 1988;158: 819–828.

European Centre for Disease Prevention and Control. Sexually transmitted infections in Europe, 1990–2010. Stockholm: ECDC, 2012.

Everett KD, Andersen AA. Identification of nine species of the Chlamydiaceae using PCR-RFLP. *Int J Syst Bacteriol* 1999;49:803-13.

Everett KD, Bush RM, Andersen AA. Emended description of the order Chlamydiales, proposal of Parachlamydiaceae fam. nov. and Simkaniaceae fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family Chlamydiaceae, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. *Int J Syst Bacteriol* 1999;49:415-40.

Evers JL. Female subfertility. *Lancet* 2002;360:151-59.

Evers JL, Collins JA. Assessment of efficacy of varicocele repair for male subfertility: a systematic review. *Lancet* 2003;361(9372):1849-52.

Falcone T. What the internist needs to know about infertility. *Cleve Clin J Med* 2001;68:65-72.

Fryns JP, Van Buggenhout G. Structural chromosome rearrangements in couples with recurrent fetal wastage. *Eur J Obstet Gynecol* 1998;8:171-176.

Fukui A, Fujii S, Yamaguchi E, Kimura H, Sato S, Saito Y. Natural killer cell subpopulations and cytotoxicity for infertile patients undergoing in vitro fertilization. *Am J Reprod Immunol* 1999; 41:413–422.

Garbase AC, Rowley JT, Mertens TE. Global epidemiology of sexually transmitted diseases. *Lancet* 1998;351:S2-S4.

Gnoth C, Godehardt E, Frnk-HerrmannP, Friol K, Tigges J, Freundl G. Definition and prevalence of subfertility and infertility. *Hum Reprod* 2005;20(5):1144-7.

Gorini G, Milano F, Olliaro P, Regazzetti A, Rondanelli EG. Chlamydia trachomatis infection in primary unexplained infertility. *Eur J Epidemiol.* 1990;6(3):335-8.

Greene CA, O'Keane JA. Investigation of the infertile couple. In: Copeland LJ, Jarrell JF, eds. *Textbook of Gynecology.* 2nd ed. Philadelphia, PA: Saunders; 2000:357-371.

Greenwood D, Slack R, Peutherer J, Barer M. *Ιατρική Μικροβιολογία. τόμος Ι. 17^η ελληνική έκδοση. Ιατρικές εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης. Αθήνα 2010.*

Guermendi E, Vegetti W, Bianchi MM, et al. Reliability of ovulation tests in infertile women. *Obstet Gynecol* 2001;97:92-96.

Gump D, Gibson M, Ashikaga T. Evidence of prior pelvic inflammatory disease and its relationship to Chlamydia trachomatis antibody and intrauterine contraceptive device use in infertile women. *Am J Obstet Gynecol* 1983;146:153–159.

Habbema JD, Collins J, Leridon H, Evers JL, Lunenfeld B, te Velde ER. Towards less confusing terminology in reproductive medicine: a proposal. *Fertil Steril* 2004;82(1):36-40.

Haggerty CL, Schulz R, Ness RB. Lower quality of life among women with chronic pelvic pain after pelvic inflammatory disease. *Obstet Gynecol* 2003;102:934–9.

Harger JH, Archer DF, Marchese SG, Muracca-Clemens M, Garver KL. Etiology of recurrent pregnancy losses and outcome of subsequent pregnancies. *Obstet Gynecol* 1983;62:574–81.

Harris-Glocker M, McLaren JF. Role of female pelvic anatomy in infertility. *Clinical Anatomy* 2013; 26:89–96.

Heinonen, P.K., Saarikoski, S. and Pystynen, P. Reproductive performance of woman with uterine anomalies. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1982;61:157–162.

Holmes KK, Handsfield HH, Wang SP, Wentworth BB, Turck M, Anderson JB, Alexander ER. Etiology of nongonococcal urethritis. *N Engl J Med* 1975;292:1199–205.

Hori S, Tsutsumi Y. Histological differentiation between chlamydial and bacterial epididymitis: nondestructive and proliferative versus destructive and abscess forming-immunohistochemical and clinicopathological findings. *Hum Pathol* 1995;26(4):402-7.

Houghton SG, Cockerill FR 3rd. Real-time PCR: overview and applications. *Surgery* 2006;139(1):1-5.

Hu D, Hook EW III, Goldie SJ. Screening for *C. trachomatis* in Women 15 to 29 Years of Age: A Cost-Effectiveness Analysis. *Ann Intern Med* 2004;141:501–513.

Hvid M, Baczynska A, Deleuran B, Fedder J, Knudsen HJ, Christiansen G, Birkelund S. Interleukin-1 is the initiator of fallopian tube destruction during *Chlamydia trachomatis* infection. *Cell Microbiol* 2007;9:2795–2803.

Iliffe-Lee ER, McClarty G. Glucose metabolism in *Chlamydia trachomatis*: the 'energy parasite' hypothesis revisited. *Mol Microbiol* 1999;33(1):177-87.

Imudia AN, Detti L, Puscheck EE, Yelian FD, Diamond MP. The prevalence of *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*, *C. trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* infections, and the rubella status of patients undergoing an initial infertility evaluation. *J Assist Reprod & Genet* 2008;25:43–46.

Jacobsen M, Jacobsen JK. The influence of various fixatives on the immunohistochemical demonstration of a number of plasma proteins and oncofetal proteins in paraffin embedded material. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand (A)* 1984;92:461-468.

Jauniaux E, Farquharson RG, Christiansen OB, Exalto N. Evidence-based guidelines for the investigation and medical treatment of recurrent miscarriage. *Hum Reprod* 2006;21:2216–22.

Jaton K, Bille J, Greub G. A novel real-time PCR to detect *Chlamydia trachomatis* in first-void urine or genital swabs. *J Med Microbiol* 2006;55(Pt 12):1667-74.

Johnson RE, Newhall WJ, Papp JR, Knapp JS, Black CM, Gift TL, Steece R, Markowitz LE, Devine OJ, Walsh CM, Wang S, Gunter DC, Irwin KL, DeLisle S, Berman SM. Screening tests to detect *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* infections--2002. *MMWR Recomm Rep* 2002;51(RR-15):1-38.

Judkins AR, Montone KT, LiVolsi VA, van de Rijn M. Sensitivity and specificity of antibodies on necrotic tumor tissue. *Am J Clin Pathol* 1998;110:641-646.

Junqueira LC and Carneiro J. Βασική Ιστολογία. Τόμος ΙΙ. 5^η ελληνική έκδοση. Ιατρικές εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης. Αθήνα 2004.

Kalousek DK, Pantzar T, Tsai M, Paradise B. Early spontaneous abortion: morphologic and karyotypic findings in 3912 cases. *Birth Defects Orig Artic Ser* 1993;29:53–61.

Kannar V, Lingaiah HK, Sunita V. Evaluation of endometrium for chronic endometritis by using syndecan-1 in abnormal uterine bleeding. *J Lab Physicians* 2012;4(2):69-73.

Kelly-Weeder S., Cox CL. The impact of lifestyle risk factors on female infertility. *Women Health* 2006;44(4):1-23.

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.

Khron MA, Hillier SL, Nugent NP, Cotch MP, Carey C, Gibbs SR, Eschenbach DA. The genital flora of women with intramniotic infection. *J Infect Dis* 1995;171:1475–1480.

Kinnunen A, Molander P, Laurila A, Rantala I, Morrison R, Lehtinen M, Karttunen R, Tiitinen A, Paavonen J, Surcel HM Chlamydia trachomatis reactive T lymphocytes from upper genital tract tissue specimens. *Hum Reprod* 2000;15:1484–1489.

Klein J, Sauer M. Assessing fertility in women of advanced reproductive age. *Am J Obstet Gynecol* 2001;185:758-770.

Kwak JY, Beaman KD, Gilman-Sachs A, Ruiz JE, Schewitz D, Beer AE. Up-regulated expression of CD56+, CD56+/CD16+, and CD19+ cells in peripheral blood lymphocytes in pregnant women with recurrent pregnancy losses. *Am J Reprod Immunol* 1995; 34:93–99.

Kwak JY, Kwak FM, Gilman-Sachs A, Beaman KD, Cho DD, Beer AE. Immunoglobulin G infusion treatment for women with recurrent spontaneous abortions and elevated CD56+ natural killer cells. *Early Preg* 2000;4:154-64.

Larsson L. Tissue preparation methods for light microscopic immunohistochemistry. *Appl immunohistochem* 1993;1:2-16.

Levidiotou S, Vrioni G, Papadogeorgaki H, Avdeliodi K, Kada H, Kaparos G, Kouskouni E, Fragouli E, Legakis NJ. Chlamydia trachomatis infections in Greece: first prevalence study using nucleic acid amplification tests. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2005;24(3):207-13.

Lichtenwalner AB, Patton DL, Van Voorhis WC, Sweeney YTC, Kuo C-C. Heat shock protein 60 is the major antigen which stimulates delayed-type hypersensitivity reaction in the macaque model of *Chlamydia trachomatis* Salpingitis. *Infect Immun* 2004;72:1159–1161.

Lucisano A, Morandotti G, Marana R, Leone F, Branca G, Dell'Acqua S, Sanna A. Chlamydial genital infections and laparoscopic findings in infertile women. *Eur J Epidemiol* 1992;8(5):645-9.

Madigan MT, Martinko JM, Parker J. Βιολογία των μικροοργανισμών. Τόμος Ι. Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης. Ηράκλειο 2005.

Mahon CR, Lehman DC, Maluselis G. Textbook of Diagnostic Microbiology. 4th ed. Saunders Elsevier. 2011.

Makar RS, Toth TL. The evaluation of infertility. *Am J Clin Pathol* 2002;117(Suppl 1):S95-103.

Malik A, Jain S, Hakim S, Shukla I, Rizvi M. Chlamydia trachomatis infection & female infertility. *Indian J Med Res* 2006;123(6):770-5.

Manavi K. A review on infection with *Chlamydia trachomatis*. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2006;20(6):941-51.

Mardh PA. Influence of infection with *Chlamydia trachomatis* on pregnancy outcome, infant health and life-long sequelae in infected offspring. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2002;16:847-64.

Mardh PA, Westrom L. Tubal and cervical cultures in acute salpingitis with special reference to *Mycoplasma hominis* and T-strain mycoplasmas. *Br J Vener Dis* 1970;46:179.

Marrazzo JM, Handsfield HH, Whittington WL. Predicting chlamydial and gonococcal cervical infection: implications for management of cervicitis. *Obstet Gynecol* 2002;100:579-584.

Mason DY, Sammons R. Alkaline phosphatase and peroxidase for double immunoenzymatic labelling of cellular constituents. *J Clin Pathol* 1978;31(5):454-460.

McGovern PG, Myers ER, Silva S, Coutifaris C, Carson SA, Legro RS, et al. Absence of secretory endometrium after false-positive home urine luteinizing hormone testing. *Fertil Steril* 2004;82:1273-7.

Michou IV, Constantoulakis P, Makarounis K, Georgoulis G, Kapetanios V, Tsilivakos V. 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 Gynecol Res* 2013;7.

Michou VI, Kanavaros P, Athanasiou V, Chronis GB, Stabamas S, Tsilivakos V. Fraction of the peripheral blood concentration of CD56⁺/CD16)/CD3) cells in total natural killer cells as an indication of fertility and infertility. *Fertil Steril* 2003; 80:691-697.

Miron ND, Socolov D, Mareş M, Anton G, Nastasa V, Moraru RF, Virág K, Anghelache-Lupaşcu I, Deák J. Bacteriological agents which play a role in the development of infertility. *Acta Microbiol Immunol Hung* 2013;60(1):41-53.

Moffett A, Regan L, Braude P. Natural killer cells, miscarriage, and infertility. *BMJ* 2004;329:1283-5.

Morrison SG, Morrison RP. A predominant role for antibody in acquired immunity to chlamydial genital tract reinfection. *J Immunol* 2005;175:7536-7542.

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(12):6979-87.

Mosher WD, Pratt WF. Fecundity and infertility in the United States: incidence and trends. *Fertil Steril* 1991;56:192-3.

Moulder JW. Interaction of chlamydiae and host cells in vitro. *Microbiol Rev* 1991;55:143-190.

Mount S, Mead P, Cooper K. Chlamydia trachomatis in the endometrium: can surgical pathologists identify plasma cells? *Adv Anat Pathol* 2001;8(6):327-9.

Mullis KB. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am* 1990;262(4):56-61, 64-5.

Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Ιατρική Μικροβιολογία. 6^η έκδοση. Επιστημονικές εκδόσεις Παρισσιανού α.ε. Αθήνα 2012.

Nakane PK, Pierce GB Jr. Enzyme-labeled antibodies: preparation and application for the localization of antigens. *J Histochem Cytochem* 1966;14:929.

Olsen, J. Subfecundity according to the age of the mother and father. *Dan Med Bull* 1990;37(3):281-2.

Ostaszewska I, Zrodowska-Stefanow B, Badyda J, Pucilo K, Trybula J, Bulhak V. *Chlamydia trachomatis*: probable cause of prostatitis. *Int J STD AIDS* 1998; 9:350-353.

Paavonen J, Eggert-Kruse W. *Chlamydia trachomatis*: impact on human reproduction. *Hum Reprod Update* 1999;5:433-447.

Pal S, Peterson EM, De La Maza LM. A murine model for the study of Chlamydia trachomatis genital infections during pregnancy. *Infect Immun* 1999;67(5):2607-10.

Pate MS, Dixon PB, Hardy K, Crosby M, Hook EW. Evaluation of the Biostar Chlamydia OIA assay with specimens from women attending a sexually transmitted disease clinic. *J Clin Microbiol* 1998;36:2183-2186.

Paukku M, Puolakkainen M, Paavonen T, Paavonen J. Plasma cell endometritis is associated with Chlamydia trachomatis infection. *Am J Clin Pathol* 1999;112(2):211-5.

Paukku M, Tulppala M, Puolakkainen M, Anttila T, Paavonen J. Lack of association between serum antibodies to Chlamydia trachomatis and a history of recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril* 1999;72(3):427-30.

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;175:1153-1158.

Pfaffl MW. Chapter 3: Quantification strategies in real-time PCR. In: Bustin SA (ed) A-Z of quantitative PCR. International University Line (IUL), La Jolla, CA, USA, 2004: 89-113

- Punnonen R, Terho P, Nikkanen V, Meurman O. Chlamydial serology in infertile women by immunofluorescence. *Fertil Steril* 1979;31(6):656-9.
- Quinn TC, Gaydos C, Shepherd M, et al. Epidemiologic and microbiologic correlates of *Chlamydia trachomatis* infection in sexual partnerships. *JAMA* 1996; 276:1737–1742.
- Radek S, Vanda B, Miloslav S, Petra M, Eva K, Rudolf K, Jaroslava M, Miroslav S. Bacterial Infection as a Cause of Infertility in Humans. *Epidemiol Mikrobiol Imunol* 2013;62(1):26-32.
- Rai R, Regan L. Recurrent miscarriage. *Lancet* 2006;368:601–11.
- Regan L. Recurrent early pregnancy failure. *Curr. Opin. Obstet Gynecol* 1992;4:220-228.
- Rhoton-Vlasak A. Infections and infertility. *Prim Care Update Ob Gyns* 2000;7(5):200-206.
- Rosai J. Rosai and Ackerman's Surgical Pathology. 9th ed. Mosby. Edinburg 2004.
- Rosenfeld DL, Garcia CR. A comparison of endometrial history with simultaneous plasma progesterone determinations in infertile women. *Fertil Steril* 1976;27:1256-1266.
- Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS consensus workshop group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS). *Hum Reprod* 2004;19(1):41-7.
- Rurangirwa FR, Dilbeck PM, Crawford TB, McGuire TC, McElwain TF. Analysis of the 16S rRNA gene of micro-organism WSU 86-1044 from an aborted bovine foetus reveals that it is a member of the order Chlamydiales: proposal of Waddliaceae fam. nov., Waddlia chondrophila gen. nov., sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1999;49:577-81.
- Schachter J. Chlamydial infections (in three parts). *N Engl J Med* 1978;298:428-435;490-495;540-549.
- Schachter J, Osoba AO. Lymphogranuloma venereum. *Br Med Bull.* 1983;39(2):151-4.
- Scheibel JH, Andersen JT, Brandenhoff P, Geerdsen JP, Bay-Nielsen A, Schultz BA, Walter S. Chlamydia trachomatis in acute epididymitis. *Scand J Urol Nephrol* 1983;17(1):47-50.
- Schenker JG, Margalioth EJ. Intrauterine adhesions: an updated appraisal. *Fertil Steril* 1982; 37: 93-610.

Shemer Y, Sarov I. Inhibition of growth of *Chlamydia trachomatis* by human gamma interferon. *Infect Immun* 1985;48:592-596.

Sigman M, Lipshultz LI, Howards SS. Evaluation of the subfertile male. In: Lipshultz LI, Howards SS, eds. *Infertility in the male*. 3d ed. St. Louis: Mosby, 1997:173-93.

Simpson WL Jr, Beitia LG, Mester J. Hysterosalpingography: a reemerging study. *Radiographics*. 2006;26(2):419-31.

Steckel J, Dicker AP, Goldstein M. Relationship between varicocele size and response to varico-celectomy. *J Urol* 1993;149:769-71.

Steele PA, White GH, Judd SJ. Reliability of a single serum progesterone determination as an indicator of ovulation. *Clin Reprod Fertil* 1985;3:125-130.

Stergachis A, Scholes D, Heidrich FE, Sherer DM, Holmes KK, Stamm WE. Selective screening for *Chlamydia trachomatis* infection in a primary care population of women. *Am J Epidemiol*. 1993;138(3):143-53.

Stirrat GM. Recurrent miscarriage. *Lancet* 1990;336:673-75.

Suffin SC, Muck KB, Young JC, Lewin K, Porter DD. Improvement of glucose oxidase immunoenzyme technique: Use of a tetrazolium whose formazan is stable without heavy metal chelation. *Am J Clin Pathol* 1979;71:492-496.

Sziller I, Fedorcsák P, Csapó Z, Szirmai K, Linhares IM, Papp Z, Witkin SS. Circulating antibodies to a conserved epitope of the *Chlamydia trachomatis* 60-kDa heat shock protein is associated with decreased spontaneous fertility rate in ectopic pregnant women treated by salpingectomy. *Am J Reprod Immunol* 2008;59:99-104.

Taylor BD, Ness RB, Darville T, Haggerty CL. Microbial correlates of delayed care for pelvic inflammatory disease. *Sex Transm Dis* 2011;38:434-438.

Taylor-Robinson D. Infections due to species of *Mycoplasma* and *Ureaplasma*: an update. *Clin Infect Dis* 1996;23:671-82.

Thejls H, Gnarpe J, Lundkvist O, Heimer G, Larsson G, Victor A. Diagnosis and prevalence of persistent chlamydia infection in infertile women: tissue culture, direct antigen detection, and serology. *Fertil Steril* 1991;55(2):304-10.

Templenton A. Infertility and the establishment of pregnancy-overview. *Br Med Bull*. 2000;56(3):577-87.

Thomas D., Michou V., Moustakarias T., Aleporou V., Matzavinos T., Mitsakos-Barbogiannis K., Kalofoutis A., Tsilivakos V. Altered Immunophenotypic Parameters in Infertile Women. Possible Role of Herpes Viremia. *Am J Reprod Immunol* 2005; 54(2), 101-11.

Thomsen AC, Lindskov HO. Diagnosis of *Mycoplasma hominis* pyelonephritis by demonstration of antibodies in urine. J Clin Microbiol 1979;9:681–7.

Toth M, Patton DL, Campbell LA, Carretta EI, Mouradian J, Toth A, Shevchuk M, Baergen R, Ledger W. Detection of chlamydial antigenic material in ovarian, prostatic, ectopic pregnancy and semen samples of culture-negative subjects. Am J Reprod Immunol 2000;43(4):218-22.

Tsutsumi Y, Serizawa A, Kawai K. Enhanced polymer one-step staining (EPOS) for proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Ki-67 antigen: application to intra-operative frozen diagnosis. Pathol Int 1995;45(2):108-15.

Wallace WH, Kelsey TW. Human ovarian reserve from conception to the menopause. PLoS One 2010;5(1):e8772.

Wallach EE, Vlachos NF. Uterine myomas: an overview of development, clinical features and management. Obstet Gynecol 2004;104:393-40.

Wang SP, Grayston JT. Immunologic relationship between genital TRIC, lymphogranuloma venereum, and related organisms in a new microtiter indirect immunofluorescence test. Am J Ophthalmol 1970;70(3):367-74.

Watson JD, Myers RM, Caudy AA, Witkowski JA. Ανασυνδιασμένο DNA. Γονίδια και γονιδιώματα – Μια συνοπτική παρουσίαση. 1^η ελληνική έκδοση. Ακαδημαϊκές εκδόσεις Ι. Μπάσδρα και Σια Ο.Ε. Αλεξανδρούπολη 2007.

Westrom L. Incidence, prevalence and trends of acute pelvic inflammatory disease and its consequences in industrial countries. Am J Obstet Gynecol 1980;138:880-892.

Westrom L. Sexually transmitted diseases and infertility. Sex Transm Dis 1994;21:S32-37.

Westrom L, Bengtsson LP, Mardh PA. Incidence, trends and risks of ectopic pregnancy in a population of women. Br Med J 1981;82:15-18.

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.

Witkin SS. Immune pathogenesis of asymptomatic *Chlamydia trachomatis* infections in the female genital tract. Infect Dis Obstet Gynecol 1995;3:169-174.

Witkin SS and Ledger WJ. Antibodies to *Chlamydia trachomatis* in sera of women with recurrent spontaneous abortion. Am J Obstet Gynecol 1992;167:135-139.

World Health Organization (WHO). Infections, pregnancies and infertility: perspectives on prevention. Fertil Steril 1987;47:964-968.

World Health Organization (WHO). Infertility: a tabulation of available data on prevalence of primary and secondary infertility. Programme on Maternal and Child Health and Family Planning, Division of Family Health. World Health Organization, Geneva: 1991.

Wilson JD, Foster DW. Williams Textbook of Endocrinology. 8th ed. Philadelphia, PA: WB Saunders, 1992.

Zariffard MR, Saifuddin M, Sha BE, Spear GT. Detection of bacterial vaginosis-related organisms by real-time PCR for Lactobacilli, Gardnerella vaginalis and Mycoplasma hominis. FEMS Immunol Med Microbiol 2002;34(4):277-81.

Zegers-Hochschild F, Adamson GD, de Mouzon J, Ishihara O, Mansour R, Nygren K, Sullivan E, van der Poel S on behalf of ICMART and WHO. The International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) Revised Glossary on ART Terminology. 2009. Hum Reprod 2009;24(11):2683-2687.

Zelin JM, Robinson AJ, Ridgway GL, Allason-Jones E, Williams P. Chlamydial urethritis in heterosexual men attending a genitourinary medicine clinic: prevalence, symptoms, condom usage and partner change. Int J STD AIDS 1995;6(1):27-30.