

İNFERTİL HASTALARIN ENDOSERVİKAL ÖRNEKLERİNDE CHLAMYDIA TRACHOMATIS DNA'SININ ARAŞTIRILMASI

INVESTIGATION OF CHLAMYDIA TRACHOMATIS DNA IN ENDOSERVICAL SPECIMENS OF INFERTILE PATIENTS

Canan KÜLAH¹, Mehtap YUMUŞAK¹, Ülkü BAYAR², Elif AKTAŞ¹, Füsun Beğendik CÖMERT¹

¹Zonguldak Karaelmas Üniversitesi, Tıp Fakültesi, ¹Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD, ²Kadın Hastalıkları ve Doğum AD, Zonguldak

İletişim / Correspondence:

Canan KÜLAH

Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Zonguldak

ÖZET

Chlamydia trachomatis tubal infertilitenin en sık sebebidir. Bu çalışmada infertil kadınlardan alınan endoservikal örneklerde *C. trachomatis* DNA varlığının araştırılması ve hastaların tubal patoloji durumlarının incelenerek değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Uygulama ve Araştırma Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum kliniğine başvuran infertil hastalardan rutin tanı amaçlı olarak alınan toplam 215 endoservikal sürüntü örneği çalışmaya dahil edilmiştir. Bu örneklerde *C. trachomatis* DNA'sı Polimerize Zincir Reaksiyonu (PZR) ile araştırılmıştır. Hastaların tubal patolojileri; histerosalpingografi, ultrasonografi ve laparoskopi sonuçları incelenerek değerlendirilmiştir. Hastaların 12'sinde (%5,6) endoservikal *C. trachomatis* DNA'sı pozitif, 203'ünde (%94,4) negatif olarak saptanmıştır. *C. trachomatis* pozitif olarak saptanan 12 hastanın üçünde (%25) tubal geçişin olmadığı belirlenmiştir. *C. trachomatis* pozitif olarak tespit edilen dokuz hastada ise tubal patoloji belirlenememiştir. Tubal inceleme sonuçlarına göre, toplam 13 hastada tubal tıkanıklık olduğu (sekiz hastada çift, beş hastada tek taraflı) belirlenmiştir. Çift taraflı tubal tıkanıklık olan infertil kadınların üçünde, *C. trachomatis* DNA'sı pozitif olarak bulunmuştur. Tek taraflı tubal tıkanıklık saptanan beş hastada ise *C. trachomatis* DNA pozitifliği saptanmamıştır. Buna karşın, tubal tıkanıklık saptanmayan hastaların ise dokuzunda *C. trachomatis* pozitif olarak tespit edilmiştir. İnfertil hastalarda *C. trachomatis* PZR sonuçlarının tubal tıkanıklığı saptamada duyarlılığı %23, özgüllüğü %95 olarak bulunmuştur. Sonuç olarak infertil hastalarda *C. trachomatis* PZR sonuçlarının tubal tıkanıklığı saptamada duyarlılığın düşük ancak özgüllüğünün yüksek olduğu görülmüştür. Genital örneklerde *C. trachomatis*'in PZR yöntemiyle saptanması tanı ve tedavide yardımcı ve yol gösterici olarak değerlendirilmiştir. Ancak testin maliyet etkinliği geniş çalışmalarla desteklenmelidir.

Anahtar kelimeler: *C. trachomatis*, infertilite, tubal faktör

SUMMARY

Chlamydia trachomatis is the most common reason for tubal infertility. The aim of this study of was to search for the presence of *C. trachomatis* DNA in the endoservical samples of infertile women and to evaluate the results by investigating the tubal pathologies of the patients. A total of 215 endoservical swap samples, routinely taken from infertile patients who were admitted to Gynecology and Obstetrics Clinic of the Zonguldak Karaelmas University Application and Research Hospital were included in the study. *C. trachomatis* DNA were investigated by Polymerase Chain Reaction (PCR) in these samples. Tubal pathologies of the patients were evaluated by examining the results of histerosalpingografi, ultrasonography and laparoscopy. Endoservikal *C. trachomatis* DNA were found to be positive in 12 of the patients (5.6%), while negative in 203 of the patients (94.4%). Tubal obstruction were detected in three patients (25%) while no tubal obstruction were detected in nine patients (75%) out of the 12 patients who were identified as positive for *C. trachomatis* DNA. According to the results of the tubal investigations; tubal occlusions were determined in 13 patients (double-sided tubal obstruction in eight patients, single-sided obstruction in five patients). Three patients were found to be positive for *C. trachomatis* DNA out of the patients with double-sided tubal obstruction. In five patients who had one-sided tubal obstruction, *C. trachomatis* DNA was not detected. On the other hand, in nine of the patients who had no tubal obstruction, *C. trachomatis* DNA were identified as positive. The sensitivity of the PCR in detection of tubal occlusion was found as 23% while the specificity was 95%. In conclusion, PCR showed high specificity but low sensitivity in determining the tubal occlusions in infertile patients. Detecting *C. trachomatis* DNA in genital samples by PCR technique would help and guide the diagnosis and treatment of *C. trachomatis* infections. However, the cost effectiveness of the test must be supported by extensive studies.

Key Words: *C. trachomatis*, infertility, tubal factor

GİRİŞ

Kadın infertilitesinde temel nedenler; servikal, uterin, tubal ve ovulatuvar faktörler olarak gruplandırılmaktadır. Bunlar arasında en sık görüleni tubal faktördür. *C. trachomatis*, tubal etkileri nedeniyle gelişmiş ülkelerde tubal infertilitenin en sık sebebidir (1,2). *C. trachomatis* enfeksiyonlarının özellikle kadınlarda %50-80 oranında asemptomatik seyretmesi, tanı ve tedaviyi güçleştirmekte ve enfeksiyonun üst genital sisteme yayılarak kronik inflamasyon oluşturmaya neden olmaktadır (1,3,4).

Tubal tıkanıklık tanısında laparoskopi, ultrasonografi (USG) veya histerosalpingografi (HSG) yöntemleri uygulanmaktadır (4,5). Laparoskopi, tubal patoloji tanısında altın standart olarak kabul edilmektedir (5). Tanısal laparoskopi ile fimbrial yapışıklık, tubal tıkanıklık ve pelvik yapışıklıklar izlenebilmektedir.

Pelvik inflamatuvar hastalığı (PİH) olan kadınların %20-50'sinde *C. trachomatis*'in etken olduğu bildirilmiştir (3). Ayrıca postpartum endometrit, erken membran yırtılması, erken doğum, ölü doğum ve düşük ağırlıklı doğum gibi gebelik komplikasyonları ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir (6, 7, 8, 9). Son yıllarda *C. trachomatis*'in servikal kanser gelişiminde de rolünün olabileceği ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır (10, 11).

Chlamydia trachomatis enfeksiyonların laboratuvar tanısında serolojik, moleküler ve sitolojik yöntemler kullanılmaktadır (12, 13, 14). Hücre içinde yerleşim gösteren *C. trachomatis*'in dokudan üretilmesi oldukça güçtür (15). Bununla birlikte en uygun ve kesin sonuç veren yöntem doku kültüründe *C. trachomatis*'in gösterilmesidir (13). Günümüzde ise yaygın tanı yöntemi olarak, direkt fluoressan antikor testi ile duyarlılık ve özgüllüğü yüksek olan; polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), ligaz zincir reaksiyonu (LZR) ve transkripsiyon esaslı amplifikasyon (TMA) gibi amplifikasyon teknikleri kullanılmaktadır (14, 15).

İnfertilite ön tanısı ile izlenen kadın hastalardan rutin olarak *C. trachomatis* varlığı ile ilgili test istemi yapılmaktadır. Bu çalışmada infertil kadınlardan alınan endoservikal örneklerde *C. trachomatis* varlığının araştırılması ve hastaların tubal patolojilerinin incelenerek karşılaştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Uygulama ve Araştırma Hastanesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum

Kliniğine infertilite tanısı ile başvuran 215 hastadan endoservikal sürüntü örnekleri alınmıştır. Örnekler ticari bir toplama ve taşıma ortamına (Copan, İtalya) nakledilerek laboratuvara ulaştırılmıştır. Nükleik asitler ekstraksiyon kiti (Invitek, Almanya) kullanılarak saflaştırılmıştır. Multiplex-STD (GenID GmbH, Almanya) kiti ile, üretici talimatlarına uyularak *C. trachomatis* DNA'ları PZR yöntemiyle çoğaltılmış, ardından özgül problemlerle ters hibridizasyon gerçekleştirilerek, bantlar üzerinde sonuçlar değerlendirilmiştir.

Hastaların tubal patoloji durumları, HSG, USG ve laparoskopi sonuçları incelenerek belirlenmiştir. *C. trachomatis* DNA sonuçları ile hastaların tubal durumları karşılaştırılmıştır. Hasta sonuçlarının değerlendirilmesinde SPSS (version 11.5; SPSS Inc., Chicago, IL, USA) programı kullanılmıştır.

BULGULAR

Hastaların 12'sinde (%5,6) endoservikal *C. trachomatis* DNA'sı pozitif, 203'ünde (%94,4) negatif olarak saptanmıştır. *C. trachomatis* pozitif olarak saptanan 12 hastanın üçünde (%25) tubal geçişin olmadığı belirlenmiştir. *C. trachomatis* pozitif olarak tespit edilen dokuz hastada ise tubal patoloji belirlenmemiştir.

Tubal inceleme sonuçlarına göre, toplam 13 hastada tubal tıkanıklık olduğu (sekiz hastada çift, beş hastada tek taraflı) belirlenmiştir. Çift taraflı tubal tıkanıklık olan infertil kadınların üçünde, *C. trachomatis* DNA pozitif olarak bulunmuştur. Tek taraflı tubal tıkanıklık saptanan beş hastada ise *C. trachomatis* DNA pozitifliği saptanmamıştır. Tubal tıkanıklık görülmeyen hastaların ise dokuzunda *C. trachomatis* pozitif olarak tespit edilmiştir.

C. trachomatis PZR sonuçlarının tubal tıkanıklık durumu ile ilişkisi Tablo'da gösterilmiştir.

Çalışmamızda infertil hastalarda endoservikal *C. trachomatis* PZR sonuçlarının tubal tıkanıklığı belir-

Tablo 2. İnfertil hastalarda *C. trachomatis* PZR sonuçları ile tubal tıkanıklık ilişkisi.

	HSG	
	Tubal faktör yok	Tubal faktör var
<i>C. trachomatis</i> DNA pozitif	9	3
<i>C. trachomatis</i> DNA negatif	193	10
TOPLAM	202	13

lemede duyarlılığı %23, özgüllüğü %95, pozitif prediktif değeri %25, negatif prediktif değeri ise %95 saptanmıştır.

TARTIŞMA

Chlamydia trachomatis gelişmiş ülkelerde en yaygın görülen cinsel yolla bulaşan hastalık etkenidir (2). Tüm dünyada her yıl yaklaşık 89 milyon yeni *Chlamydia* olgusunun ortaya çıktığı bildirilmektedir (16).

Pelvik inflamatuvar hastalık tubal kaynaklı infertilitenin en önemli nedenidir. En önemli PİH etkenleri olarak *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* ya da ikisinin birlikte neden olduğu enfeksiyonlar sayılmaktadır (12). *C. trachomatis*'in eradikasyonu ile pelvik inflamatuvar hastalıkların yarısından fazlasının önlenebileceği gösterilmiştir(17).

İnfertil popülasyonda tubal faktörün, gelişmiş ülkelerde %30, gelişmekte olan ülkelerde ise %80'e varan oranlarda infertiliteye neden olduğu bilinmektedir (8,9). Persistan *C. trachomatis* enfeksiyonları tubal patoloji ile sonuçlanabilmektedir (8,18).

Chlamydia trachomatis, kültür yanında moleküler ve serolojik yöntemlerle de tespit edilebilmektedir. Ancak Hastalıkları Önleme Merkezi (Centers for Disease Control: CDC) tarafından önerilen yöntem, idrar veya üretral/endoservikal örneklerle uygulanabilen nükleik asit amplifikasyon (NAA) testleridir (16). Asemptomatik klamidyal enfeksiyonların saptanmasında NAA testlerinin konvansiyonel yöntemlerden daha etkin olduğu bildirilmektedir (16,19). Ancak NAA testlerinin oldukça yüksek maliyete sahip olması, gerek tanı gerekse tarama amacıyla az gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde kullanımını sınırlamaktadır. Farklı toplumlarda ve toplumların farklı risk gruplarında, asemptomatik enfeksiyonların tarama programlarının belirlenmesi için maliyet uygunluk analiz çalışmalarının yapılması önerilmektedir (19).

PZR tekniğinin diğer tekniklere göre *C. trachomatis* tanısında belirgin olarak yüksek duyarlılık ve özgüllüğünün olduğu ancak oranların çalışmalar arasında farklılıklar gösterdiği de gözlenmektedir. Wiesenfeld ve ark.'nın (20) yaptığı çalışmada PZR duyarlılığı %43, özgüllüğü ise %100 olarak bulunmuştur. Skulnick ve ark.'nın (21) 993 hasta üzerinde yaptıkları bir çalışmada PZR tekniğinin duyarlılığı %61, özgüllüğü ise %100 olarak bildirilmiştir. Diğer

yandan 184 hastanın yer aldığı bir çalışmada ise PZR duyarlılığı %85, özgüllüğü %100 olarak bulunmuştur (22).

Asemptomatik hastalarda *C. trachomatis* endoservikte kolonize olabilmektedir. Herhangi bir uterin girişim yolu ile (HSG, laparoskopi, RIA takılması) asendan yolla üst genital sisteme yayılabilmektedir. Böyle bir durumda endoservikal PZR örnekleme negatif sonuç verse de, hasta *C. trachomatis* varlığı açısından pozitif olabilmektedir (12). Tan ve ark. (23) 1182 asemptomatik kadının endoservikal smear örneğinde PZR yöntemi ile %4,1 oranında *C. trachomatis* saptamışlardır. Yine PZR yöntemi ile George ve ark. (24) endoservikal smear örneklerinin %27,5'inde *C. trachomatis* tespit etmişlerdir. Levidiotou ve ark. ise 16.834 endoservikal smear örneğini inceledikleri çalışmalarında 8000 asemptomatik kadının %4.1'inde, 8834 asemptomatik kadının %2.9'sinde PZR yöntemi ile pozitif sonuçlar almışlardır (25).

C. trachomatis'in izolasyonu diğer enfeksiyon ajanlarına göre daha zor ve zahmetlidir. Altın standart olarak önerilen hücre kültürü yönteminin özgüllüğünün mükemmel ancak duyarlılığının %40-60 gibi düşük oranlarda olması, günümüzde duyarlılık ve özgüllükleri yüksek olan NAA testlerini ön plana çıkarmıştır(3,4,26). Ancak bu yöntemler, yüksek maliyet, özel laboratuvar donanımı ve deneyimli personel gereksinimi gibi nedenlerden dolayı ülkemiz gibi gelişmekte olan ülkelerde rutin uygulama ve tarama için yaygınlaşmamıştır.

Bizim çalışmamızda, sadece endoservikal sürüntü örnekleri *C. trachomatis* varlığı açısından araştırılmıştır. İnfertil hastalarda çoğul vücut bölgesinden örnekleme (serviks, üretra, vajina, fimbriya ve Douglas boşluğu) sadece endoservikal örnekleme göre *C. trachomatis*'in saptanmasında duyarlılığı arttırmadığı bildirilmektedir (20,27). Tubal patoloji ile IgG, IgA ve cHSp60 IgG seropozitifliği arasındaki ilişki doğrulanmış olmasına rağmen infertil hastaların rutin tanılarda araştırılmalarında bu parametrelerin değerli klinik bir bilgi de eklenmediği belirtilmiştir (27). Bu nedenlerle rutin *C. trachomatis* DNA'sı araştırılırken servikal örnekleme ile sınırlı kalınması yeterli görülmüştür.

Sonuç olarak bu çalışmada, infertil hasta grubunda endoservikal *C. trachomatis* varlığı araştırılmış ve tubal patoloji durumları ile ilişkisi ortaya konulmuştur. İnfertil hastalarda *C. trachomatis* PZR sonuçla-

rınının tubal tıkanıklığı saptamada duyarlılığının düşük ancak özgüllüğün yüksek olduğu sonucuna varılmıştır. Genital örneklerde *C. trachomatis*'in PZR yöntemiyle saptanması, tanı ve tedavide, yardımcı ve yol gösterici olarak değerlendirilmiştir. Ancak testin maliyet etkinliğinin geniş çalışmalarla desteklenmesi gerekliliği sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Guaschino S, De Seta F. Update on *Chlamydia trachomatis*. N Engl J Med 2000;900: 293-300.
2. Mardh PA. Tubal factor infertility, with special regard to chlamydial salpingitis. Curr Opin Infect Dis. 2004;17(1):49-52..
3. Watson EJ, Templeton A, Russell I , et al. The accuracy and efficacy of screening tests for Chlamydia trachomatis: a systematic review. J Med Microbiol 2002; 51 :1021-31
4. Nelson HD, Helfand M. Screening for chlamydial infection. Am J Prev Med 2001;20 (3S), 95-107.
5. Land JA, Evers JL. Chlamydia infection and subfertility. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol. 2002;16(6):901-12. .
6. Paavonen J, Eggert-Kruse W. *Chlamydia trachomatis*: impact on human reproduction. Hum Reprod Update 1999; 5:433-47
7. Wallin KL, Winklund F, Luostarinen T, et al. A population-based prospective study of *Chlamydia trachomatis* infection and cervical carcinoma. Int J Cancer 2002; 101:371-4
8. Hull MG, Glazener CM, Kelly NJ, Conway DI, Foster PA, Hinton RA, Coulson C, Lambert PA, Watt EM, Desai KM. Population study of causes, treatment, and outcome of infertility. Br Med J (Clin Res Ed). 1985;14;291(6510):1693-7.
9. World Health Organization. Infections, pregnancies, and infertility: perspectives on prevention. World Health Organization. Fertil and Steril 1987;47:964-8
10. Ness RB, Goodman MT, Shen C, Brunham RC. Serologic evidence of past infection with *Chlamydia trachomatis* in relation to ovarian cancer. J Infect Dis 2003;187:1147-51
11. Judson FN. Epidemiology and control of nongonococcal urethritis and genital Chlamydia infections: a review. Sex Transm Dis 1981;8:117-26
12. Akande VA, Hunt LP, Cahill DJ, Caul EO, Ford WC, Jenkins JM. Tubal damage in infertile women: prediction using chlamydia serology. Hum Reprod. 2003;18(9):1841-7.
13. Ağaçfidan A. *Chlamydia* infeksiyonlarının laboratuvar tanısı. Flora 1997; 2 (1): 27-34
14. Chan EL. Laboratory testing for *Chlamydia trachomatis* urogenital infections. J Fam Plan Reprod Health Care 2002; 28:153-4
15. Black CM. Current methods of laboratory diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections. Clinical Microbiology Reviews. 1997;10: 160- 84.
16. Johnson RE, Newhall WJ Rapp JR, et al. Screening tests to detect *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* infections-2002. MMWR Recomm Rep 2002; 51 (RR-15):1-38
17. Honey E, Templeton A. Prevention of pelvic inflammatory disease by the control of *C. trachomatis* infection. Int J Gynecol Obstet. 2002; 78: 257- 61.
18. 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
19. Van Valkengoed IG, Morre SA, van den Brule AJ, et al. Follow-up, treatment and reinfection rates among asymptomatic *Chlamydia trachomatis* cases in general practice. Br J Gen Pract 2002; 52:623-7
20. Wiesenfeld HC, Uhrin M, Dixon BW, Sweet RL. Diagnosis of male *Chlamydia trachomatis* urethritis by polymerase chain reaction. Sex Transm Dis, 1994; 21: 268- 71
21. Skulnick M, Chua R, Simor AE, Low DE, Khosid HE, Fraser S, Lyons E, Legere EA, Kitching DA. Use of the polymerase chain reaction for the detection of *Chlamydia trachomatis* from endocervical and urine specimens in an asymptomatic low-prevalence population of women. Diagn Microbiol Infect Dis 1994; 20: 195- 201
22. Domeika M, Bassiri M, Mårdh PA. Diagnosis of genital *Chlamydia trachomatis* infections in asymptomatic males by testing urine by PCR. J Clin Microbiol 1994, 32: 2350- 2
23. Tan HH, Chan R. Use of polymerase chain reaction on pooled cervical swabs to detect *Chlamydia trachomatis* infections in female workers in Singapore. Singapore Med J. 2005; 46: 215-8
24. George JA, Panchatcharam TS, Paramasivam R, Balasubramanian S, Chakrapani V, Murugan G. Evaluation of diagnostic efficacy of PCR methods for *Chlamydia trachomatis* infection in genital and urine specimens of symptomatic men and women in India. Jpn J Infect Dis. 2003;56(3):88-92.
25. Levidiotu S, 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 Microbiol Infect Dis. 2005; 24: 207- 13.
26. Kohl KS, Markowitz LE, Koumans EH. Developments in the screening for Chlamydia trachomatis: a review. Obstet Gynecol Clin North Am. 2003;30(4):637-58. Review.
27. Dietrich W, Rath M, Stanek G, Apfalter P, Huber J. Multiple site sampling does not increase the sensitivity of *Chlamydia trachomatis* detection in infertility patients. Fertil Steril. 2008 Nov 4 [Epub ahead of print]