



**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА**



Александра Арсовић

**ИМУНОПАТОГЕНЕТСКИ МЕХАНИЗМИ ПЕРЗИСТЕНЦИЈЕ  
ХЛАМИДИЈА У ГЕНИТАЛНОМ ТРАКТУ ЖЕНА**

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

Ментор: Проф. др Дејан Баскић

Крагујевац 2016.

# САДРЖАЈ

1.	УВОД.....	5
1.1.	Основне карактеристике <i>C. Trachomatis</i> .....	6
1.1.1.	Морфологија <i>C. trachomatis</i> .....	6
1.1.2.	Развојни циклус <i>C. trachomatis</i> .....	8
1.1.3.	Перзистентна хламидијална инфекција .....	10
1.1.3.1.	Откриће перзистенције <i>C. trachomatis</i> у <i>in vitro</i> условима .....	10
1.1.3.2.	Постојање и консеквенце хламидија аберантног фенотипа РТ у <i>in vivo</i> условима .....	14
1.2.	Патогеност <i>C. trachomatis</i> , болести и компликације .....	17
1.2.1.	Фактори вируленције .....	17
1.2.1.1.	Главни протеин спољашње мембране .....	17
1.2.1.2.	Полиморфни мембрански протеини .....	18
1.2.1.3.	<i>C. trachomatis</i> стрес протеин од 60 kDa .....	19
1.2.1.4.	Секрециони систем тип III .....	20
1.2.1.5.	Порински Б протеин .....	21
1.2.1.6.	Хламидијални протеаза/протеазом налик фактор активности .....	21
1.2.1.7.	Зона пластичности .....	21
1.2.2.	Класификација <i>C. trachomatis</i> и подела на биотипове и серотипове .....	23
1.2.3.	Трансмисија, болести и секвеле хламидијалне инфекције .....	23
1.3.	Патогенеза инфекција изазваних <i>C. trachomatis</i> .....	26
1.3.1.	Природни ток хламидијалне инфекције .....	26
1.3.2.	(Протективни) имунски одговор на хламидијалну инфекцију .....	32
1.3.3.	Патогенеза секвела .....	39
1.3.3.1.	Перзистентна хламидијална инфекција .....	39
2.	ЦИЉ РАДА .....	43
3.	МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ .....	44
3.1.	Испитанице .....	44
3.2.	Методе .....	44
3.2.1.	Узимање биолошких узорака .....	44

3.2.2. Одређивање серумског нивоа антитела на хламидијалне антигене .....	45
3.2.2.1. Одређивање серумског нивоа антитела на хламидијални MOMP антиген .....	45
3.2.2.2. Одређивање серумског нивоа антитела на хламидијални HSP60 антиген .....	46
3.2.2.3. Анализа серолошког статуса хламидијалне инфекције .....	46
3.2.3. Мерење концентрације цитокина у серуму испитаника методом проточне цитометрије .....	47
3.2.3.1. Принцип извођења теста .....	47
3.2.3.2. Поступак извођења теста .....	47
3.2.4. Анализа популација моноклеарних ћелија периферне крви методом проточне цитометрије .....	49
3.2.4.1. Бојење мембранских маркера .....	49
3.2.4.2. Интрацелуларно бојење Foxp3 транскрипционог фактора .....	51
3.2.4.3. Очитавање резултата на проточном цитометру .....	51
3.3. Статистичка анализа .....	52
4. РЕЗУЛТАТИ .....	53
4.1. Учесталост хламидијалне инфекције у студијској популацији .....	53
4.2. Серумски ниво анти–хламидијалних антитела у студијској популацији .....	55
4.3. Серумски ниво анти–хламидијалних антитела код субфертилних пацијенткиња са различитим статусом хламидијалне инфекције .....	58
4.4. Серумски ниво анти–хламидијалних антитела код пацијенткиња са тубарним фактором инфертилитета .....	60
4.5. Серумски ниво анти–хламидијалних антитела код пацијенткиња са спонтаним побачајима .....	62
4.6. Серумски ниво анти–хламидијалних антитела код субфертилних пацијенткиња са перзистентном инфекцијом .....	64
4.7. Серумски ниво анти–хламидијалних антитела код субфертилних пацијенткиња са ранијом инфекцијом .....	68
4.8. Серумски ниво цитокина у студијској популацији .....	70

4.9 Серумски ниво цитокина код субфертилних пацијенткиња са различитим статусом хламидијалне инфекције.....	76
4.10. Серумски ниво цитокина код серонегативних испитаница .....	84
4.11. Серумски ниво цитокина код испитаница са перзистентном хламидијалном инфекцијом.....	84
4.12. Цитокински профил .....	85
4.13. Анализа субпопулација мононуклеарних леукоцита методом проточне цитометрије код субфертилних испитаница са тубарним фактором инфертилитета и спонтаним побачајима .....	87
4.14. Анализа субпопулација мононуклеарних леукоцита методом проточне цитометрије код субфертилних испитаница са различитим серолошким статусом хламидијалне инфекције .....	95
5. ДИСКУСИЈА .....	104
6. ЗАКЉУЧЦИ.....	115
7. ЛИТЕРАТУРА .....	117

# 1. УВОД

Генитална хламидијална инфекција је најчешћа полно преносива бактеријска инфекција широм света и упркос нашим сазнањима о њој кроз векове, остаје најчешћа генитална бактеријска инфекција у свету, а њен узрочник *Chlamydia trachomatis* (*C. trachomatis*) један од најенигматичнијих патогена познатих медицинској науци. Цилиндричне епителне ћелије ендоцервикса су мета гениталних серотипова *C. trachomatis*, у којима она започиње свој јединствени, бифазни инфективни процес, који се одликује интермитентним стадијумима између инфективног елементарног тела и неинфективног ретикуларног тела. Код жена, инфекција *C. trachomatis* има јединствени клинички аспект. У доњем гениталном тракту инфекција најчешће протиче асимптоматски (70 – 90%), и сходно томе недијагностикована и нелечена. Док се са једне стране код великог броја инфицираних жена инфекција завршава спонтаном резолуцијом, са друге стране у значајном проценту инфицираних жена (20% – 40%) инфекција се шири у горњи генитални тракт где упркос активацији имунолошких механизма одбране доводи до перзистентне инфекције и развоја пелвичне инфламаторне болести која потенцијално резултира различитим степенима тубарног оштећења и тешким компликацијама везаним за репродуктивно здравље жена.

## 1.1. Основне карактеристике *C. Trachomatis*

### 1.1.1. Морфологија *C. trachomatis*

*C. trachomatis* је сићушна, кокоидна, непокретна, Грам негативна, облигатно интрацелуларна бактерија, која не може да расте на вештачким хранљивим подлогама (1).

Ћелијски зид је сличан ћелијском зиду Грам негативних бактерија. Састоји се од двослојне спољашње мембране и унутрашње мембране, али му недостаје пептидогликан у периплазматском простору (2). Међутим, генетска истраживања откривају да геном *C. trachomatis* кодира протеине који формирају структуру сличну пептидогликану, укључујући пеницилин везујуће протеине. Прецизније речено *C. trachomatis* не поседује пептидогликан конвенционалне структуре (3). Ово је велика контардикторност, обзиром на многобројна предходна сазнања о дејству пеницилина на развојни циклус хламидија (4) и сазнања да хламидије поседују функционалне ензиме за синтезу пептидогликана. Из ових разлога овај феномен се назива „хламидијална аномалија“ или ти још „хламидијски пептидогликански парадокс“ (5).

Спољашња мембрана садржи липиде који имају поларизовану организацију. Спољашњи листић садржи липополисахарид (LPS), а унутрашњи листић фосфолипиде. Липополисахарид је специфичан за род и сличан је липополисахариду осталих Грам негативних бактерија. Својствено му је да због преминације дуголанчаних масних киселина на липиду А показује редуковану ендотоксичну активност (6). У спољашњој мембрани се налази и главни протеин спољашње мембране (енг. Major Outer Membrane Protein – MOMP), тежине од око 40kDa, површински изложен услед чега има карактеристике имунодоминантног антигена. Цистеином богати протеини спољашње мембране (енг. outer membrane protein OMP2 (OmcB), OMP3 (OmcA)) утичу на осмотску стабилност због мреже дисулфидних веза којима су повезани са MOMP–ом и другим протеинима ћелијског зида (7) .

*C. trachomatis* одликује истовремено постојање обе нуклеинске киселине (DNK и RNK) као и присуство рибозома. Циркуларни геном *C. trachomatis* садржи 1.042.519 базних парова, што по величини одговара четвртини генома бактерије *Escherichia coli*. Садржи и конзервиран криптични плазмид величине око 7.500 базних парова (8). Не

може синтетисати АТФ већ преко ADP/АТФ транслоказе користи АТФ створен у ћелији домаћина, што је разлог немогућности раста на вештачким подлогама. Због ове особине хламидије називамо „енергетским паразитима“ (9).

Појављује се у два морфолошки различита облика, која представљају еволутивне форме адаптације хламидија на екстрацелуларне и интрацелуларне услове живота, као елементарно или основно тело (ЕТ) и ретикуларно или мрежасто тело (РТ) (10).

ЕТ је екстрацелуларна форма *C. trachomatis* прилагођена ванћелијском преживљавању бактерије. Облика је ланцете, а величине је 250–350  $\mu\text{m}$ . Оно је инфективна, транспортна форма бактерије, одговорна за везивање хламидија за ћелију домаћина и успостављање инфекције. Такође, метаболички је инактивно, па из ових разлога многи аутори ЕТ поистовећују са спором гљивица. Ћелијски зид ЕТ је масиван и веома ригидан. Ригидност му омогућавају бројни дисулфидни мостићи између протеина који чине комплекс спољашње мембране. Такође ова мрежа дисулфидних веза доприноси осмотској стабилности ЕТ, а самим тим и отпорности на екстрацелуларне факторе. Услед кондензације нуклеинских киселина, нуклеоид је компактан и јасно се препознаје на електронској микроскопији. Поседује подједнаке количине бактеријске DNK и RNK.

РТ је прилагођено интраћелијском преживљавању и умножавању бактерије, услед чега не опстаје изван ћелије. Овалног је облика и двоструко је веће од ЕТ (500 – 1000 $\mu\text{m}$ ). Представља неинфективну, али метаболички активну форму бактерије. Насупрот ћелијском зиду ЕТ, ћелијски зид РТ је танак, нема чврстину и високо је пермеабилан. У супротности са високо кондензованом нуклеинским киселинама ЕТ, у РТ нуклеинске киселине су дифузне и влакнасте. Садржи три пута више молекула RNK у односу на DNK (11–13).

### 1.1.2. Развојни циклус *C. trachomatis*

*C. trachomatis* има бифазни развојни циклус, који почиње након контакта инфективне форме ове бактерије, елементарног тела (ЕТ) са ћелијом домаћина. ЕТ служи за ширење и транспорт бактерије, метаболички је инактивно, има ћелијски зид који му омогућава да перзистира и ван ћелије и одговорно је за везивање и улазак у ћелију домаћина. Епителне ћелије урогениталног тракта, посебно цилиндричне епителне ћелије и ћелије прелазног епитела ендоцервикса су таргет ћелије за гениталне серотипове *C. trachomatis*. Рецептори на ћелијама домаћина су: естрогенски рецептори, хепарин сулфатни рецептори, рецептори за манозу и рецептори за манозу–6–фосфат (14). За велики број хламидијалних молекула се сматра да обављају улогу адhezина. Ту спадају: МОМР (15), глукозаминогликан (енг. glycosaminoglycan – GAG) (16), полиморфни мембрански протеин Д (енг. polymorphic membrane protein D – PmpD) (17), протеин богат цистеином – ОмсВ (18).

Показано је да одмах након везивања адhezина за рецептор на ћелији, ЕТ путем секретивног система тип III у ћелијску мембрану еукариотске ћелије екпортује транслоцирајући актин регрутујући фосфопротеин (енг. Translocated Actin–Recruiting Phosphoprotein – TARP). TARP се рапидно фосфорилише, а фосфорилизација заузврат доводи до регрутације актина на месту интернализације ЕТ (19). ЕТ улазу у ћелију посредством ендофагоцитозе, пиноцитозе или ендцитозе посредоване рецепторима, а брза модификација насцентних везикула које садрже ЕТ не дозвољава новонасталој везикули да уђе у ендцитно/лизозомални пут (20), што омогућава интрацелуларни опстанак и репликацију. За рану модификацију насцентне везикуле одговорна је група протеина, обједињена под називом протеини инклузионе мембране (енг. inclusion membrane (Inc) proteins) (21). У даљем току ова новонастала везикула системом интермедијарних филамената цитоскелета мигрира ка перинуклеарном региону, где се налази у непосредној близини Голџијевог апарата (22). Након доспећа у ову ћелијску нишу, инклузија отпочиње да се фузионише са различитим везикулама еукариотске ћелије како би обезбедила есенцијалне факторе за даљи развој. Спаја се са везикулама које садрже сфинголипиде (23), холестерол (24) и глицеролфосфолипиде (25). Истовремено са процесом интернализације и модификације инклузије, у ЕТ се дешавају многе промене. Пре свега долази до редукције дисулфидних веза, услед чега ЕТ почиње да губи ригидност (26), затим долази до декондензације хромозома и иницијације



транскрипционе активности генома (27). Такође, ЕТ почиње да секретује гликоген, што индукује његову транзицију у вегетативну, метаболички активну и неинфективну форму, звану ретикуларно тело. РТ почиње да се дели бинарном деобом свака 2 – 3h, услед чега долази до експанзије инклузија које могу садржати од 100–1000 РТ (28). По завршетку деобе, РТ се поново претварају у ЕТ, која се након тога из ћелије ослобађају или процесом егзоцитозе или лизом инфицираних ћелија, што на карају омогућава започињање новог инфективног циклуса. Алтернативно постоји и могућност истискивања хламидија из ћелије, процесом који је завистан од полимеризације актина и миозина и у којем ћелија домаћина остаје интактна (29)

Иако јединствен за све хламидије, овај *in vitro* окарактерисан развојни циклус, у зависности од врсте, варира у времену (од 48h до 72h па до 96h,) и броју инклузија у ћелији домаћина (од једне за *C. trachomatis* до неколико за *C. pneumoniae* или *C. psittaci*). Стадијуми овог развојног циклуса су такође уочени и у *in vivo* условима у ткивним узорцима сакупљеним од пацијената и од експериментално инфицираних животиња (30).

Под одређеним условима, у једном тренутку може доћи до алтерције нормалног интрацелуларног развојног циклуса хламидија, при чему он улази у алтернативни пут у којем долази до стварања аберантних, нерепликативних али вијабилних перзистентних форми, за које се сматра да су одговорне за успостављање и прогресију перзистентне хламидијалне инфекције.

### 1.1.3. Перзистентна хламидијална инфекција

#### 1.1.3.1. Откриће перзистенције *C. trachomatis* у *in vitro* условима

Историјски, откриће *C. trachomatis* је асоцирано са појавом постгонококног уретритиса или цервицитиса. Наиме, раних шездесетих и седамдесетих година прошлог века, пре него што је *Neisseria gonorrhoeae* постала пеницилин резистентна, пацијенти са гонококним уретритисом или цервицитисом су успешно третирани пеницилином. Међутим, након почетног побољшања које би код ових пацијената било евидентно у првим данима после терапије, уобичајено 2-3 месеца касније, код неких од третираних пацијената би се поново јавили симптоми тзв. постгонококног уретритиса или цервицитиса и управо код таквих пацијената је и изолована *C. trachomatis* (31, 32).

Са друге стране, примена пеницилина је била одговорна и за откриће алтернативног интрацелуларног развојног циклуса хламидија, које карактерише стварања аберантних, нерепликативних али вијабилних перзистентних форми, одговорних за успостављање перзистентне хламидијалне инфекције.

*Пеницилин.* Наиме, *in vitro* експеримент у којима су L929 ћелије инфициране *C. psittaci* изложене дејству пеницилина, један час након инфекције, је показао да у тим условима долази до трансформација ЕТ у РТ, али изостаје комплетирање развојног циклуса и стварање нових инфективних ЕТ. Електронском фотомикрографијом откривено је да РТ наставља да расте, али не подлеже бинарној фисији при чему се ствара увећано, морфолошки аберантно РТ. Након што се пеницилин уклони настаје период успореног интерног и екстерног пупљења РТ које се затим враћа на нормалну величину, подлеже ћелијској деоби и сазрева у инфективно ЕТ (33). Овај први налаз постојања перзистентне форме хламидија су потврдиле и друге студије. Показано је да се у аберантном РТ одиграва континуирана репликација генома и синтеза информационих РНК уз одсуство ћелијске деоба. Такође показано је и да *C. psittaci* култивисана у HeLa ћелијама, у *in vitro* условима, у присуству пеницилина и антисерума, у току 6–9 месеци одржава виабилну, перзистентну инфекцију, која је након уклањања антибиотика и антитела реверзибилна и наставља се акутном инфекцијом са опорављеним инфективним ЕТ (34).

Открића многих других истраживача, у различитим експерименталним условима, као и са различитим врстама хламидија, довела су до успостављања генерално прихваћеног става да хламидије под одређеним *in vitro* условима могу прећи у стадијум перзистенције, дефинисан као постојање „вијабилних, али некултивабилних хламидија“ што морфолошки подразумева постојање „увећаног, аберантног РТ које не подлеже деоби“ али је „реверзибилно“ (35).

Истовремено или убрзо након открића перзистенције индуковане пеницилином, пуно додатних студија је показало да перзистенција хламидија може настати и у неким другим експерименталним условима, а као последица дејства неких других индуктера. У те индукторе спадају: IFN- $\gamma$ , недостатак хранљивих материја и аминокиселина, недостатак гвожђа, различити стадијуми ћелијске матурације и диференцијације и херпес симплекс вирусна инфекција.

*IFN- $\gamma$  и недостатак аминокиселина.* Обзиром да су хламидије облигатне интрацелуларне бактерије, снабдевање солубилним нутријентима из цитоплазме ћелије домаћина је есенцијално за продуктивни хламидијални раст. Показано је да у *in vitro* условима, смањење аминокиселинског садржаја медијума за 10% доводи до појаве аберантних РТ у хламидијалним инклузијама већ у првих 48 сати од инфекције, при чему је за повратак на продуктивну инфекцију и сазревање РТ у ЕТ неопходно додавање макар једне од две есенцијалне аминокиселине, цистеина или изолеуцина (36).

Врло брзо након раних студија о утицају пеницилина на развојни циклус хламидија откривен је и инхибиторни ефекат имунских медијатора на раст хламидија у инфицираним ћелијама, а најзначајнији међу њима, показано је, је био IFN- $\gamma$  (37, 38). Показано је да IFN- $\gamma$  испољава снажне ефекте на хумане ћелије, при чему те промене заузврат модулишу и интрацелуларни раст хламидија (39). Наиме, IFN- $\gamma$  у хуманим епителним ћелијама индукује идукује индолеамин-2,3-диоксигеназу (од енг. indoleamine-2,3-dioxygenase – IDO), ензим који катализује деградацију триптофана, аминокиселине есенцијалне како за еукариотску ћелију тако и за хламидије. У одсуству триптофана, хламидије не могу да комплетирају развојни циклус и умиру. Међутим, такође је показано да додавање егзогеног индола, у присуству IFN- $\gamma$ , у неким случајевима резултира враћањем хламидија у нормални развојни циклус. Ово је карактеристично једино за гениталне сојеве хламидија зато што генитални серотипови поседују функционални ген за триптофан синтетазу (*trp*), који им омогућава да

конвертују индол, секретован од стране локалне вагиналне флоре, у триптофан, што дозвољава овим хламидијама да избегну убијање од стране  $IFN-\gamma$  и успостављање перзистентне инфекције (40). Недуго затим, Beatty и сарадници су показали да излагање ћелија инфицираних *C. trachomatis* физиолошким концентрацијама  $IFN-\gamma$  резултира стварањем увећаног, аберантног РТ (41). Интересантно је да, иако је ово измењено РТ дефицијентно у структурним компонентама као што су главни протеин спољашње мембране и липополисахарид, оно у условима перзистенције почиње да секретује хламидијални стрес протеин од 60 kDa (енг. *C. trachomatis* Heat Shock Protein 60 kDa – cHSP60), антиген асоциран са хроничном инфламацијом Фалопијевих туба која доводи до пелвичне инфламаторне болести, ектопичне трудноће и инфертилитета (42).

Комплетна анализа транскриптома *C. trachomatis* серотипа Д у условима перзистенцију у HeLa ћелијама изложеним  $IFN-\gamma$ , показала је усходну регулацију многих гена укључених у активни метаболички процес аберантног РТ, укључујући протеине значајне за рекомбинацију и преправљање ДНК, транслацију протеина, коришћење фосфолипида. Поред тога, обсервирана је и усходна регулација гена одговорних за одговор на стрес, као и нисходна регулација гена који су укључени у протеолизу, транспорт пептида, ћелијску деобу, редиференцијацију РТ у ЕТ и паковање ДНК елементарног тела. Интерпретација аутора је да је хламидијални одговор на  $IFN-\gamma$  и недостатак хранљивих материја еволуирао као координисани (придружени) одговор у контроли транзиције између класичног ЕТ–РТ–ЕТ активног раста и аберантног стадијума РТ који представља један алтернативни животни стил коришћен од стране хламидија да избегну имунски одговор домаћина (27).

*Недостатак гвожђа.* Све прокариоте исказују апсолутну потребу за гвожђем које им је неопходно за раст, размножавање и преживљавање. Интрацелуларне бактерије захтевају гвожђе ради уласка и репликације у ћелијама сисара, а хламидије ту нису изузетак. Додавање десферала, хелатора гвожђа медијуму у коме се налазе епителне ћелије ендометријума инфициране серотипом Е *C. trachomatis* доводи до перзистентне инфекције, појавом малих инклузија које садрже увећана, аберантна РТ са растреситом и набораном спољашњом мембраном. Враћање на продуктивну инфекцију, у смислу поновне појаве ЕТ постиже се уклањањем десферала и додавањем трансферина zasiћеног гвожђем (43). Обзиром да је инфекција *C. trachomatis* најчешћа код младих жена, код којих концентрација гвожђа значајно варира у зависности од фазе

менструалног циклуса, могуће је предвидети хроничну хламидијалну инфекцију као резултат наизменичних епизода перзистентне инфекције тј. појаве аберантног фенотипа РТ и продуктивне инфекције.

*Различити стадијуми диференцијације ћелије домаћина.* Раних осамдесетих година је показано да инфекција хуманих моноцита са *C. psittaci* доводи до формирања увећаног абнормалног РТ, да би сазревањем моноцита у макрофаге започела продуктивна хламидијална инфекција са наставком нормалног циклуса репликације и формирањем нових ЕТ (44). На основу овог и сличних експеримената претпостављено је да да у недиферентованим епителним ћелијама базалних делова енометријума хламидије преживљавају у перзистентном, аберантном фенотипу РТ, али обзиром да епителне ћелијекоје мигрирају у више слојеве епитела који облаже жлезде, полако долази до успостављања продуктивне форме инфекције, како епителне ћелије сазревају и досежу и насељавају мукозну површину (45). Ова претпоставка има делимичну подршку у студији Гусева и сарадника (46) у којој је коришћено репродуктивно ткиво свиња које је у *ex vivo* условима инфицирано анималном *C. suis*. Унутар примарно инфицираних жлезданих епителних ћелија, ова бактерија продукује аберантни тип инклузија и само неколико инфективних хламидијалних ЕТ, али прати нормалан развојни циклус у боље диферентованим (луминалним) епителним ћелијама. Продуктивна репликација у луминалним епителним ћелијама оштећује епител и служи као извор инфективних ЕТ, док форме аберантног РТ у жлезданим ћелијама служе као резервар инфекције.

*Херпес симплекс вирусна инфекција.* Инфекција HeLa ћелија са HSV-2, након инокулације *C. trachomatis* резултира појавом аберантних РТ (47). Међутим, новији подаци сугеришу да коинфекција истих ћелија хламидијом и HSV-2, није неопходна да покрене хламидијалну перзистенцију. Прост контакт епителних ћелија инфицираних хламидијом са инактивисаним вирионом или са површинским антигеном фиксираних ћелија инфицираних појединачно са HSV активира целуларни одговор доводећи до хламидијалне перзистенције са повећаном продукцијом cHSP60. Интересантно је да евентуална деградација дефективног вириона од стране епителних ћелија резултира преокретом хламидијане перзистенције у продуктивну хламидијалну инфекцију (48). Обзиром да постоје бројни докази о HSV-2 инфекцији ендоцервикалних епителних ћелија, постоје многобројни начини да *C. trachomatis* инфициране ћелије дођу у контакт са одређеним вирусним лигандима, чак и у одсуству коинфекције. Прво, зато што се у току HSV инфекција продукује 50-200 дефектних вирусних партикула, при чему је

целуларна коинфекција са дефектним вирионима вероватно чешћа него коинфекција. Друго, вирусни гликопротеини ослобођени из инфициране ћелије могу индуковати перзистентну инфекцију интерагујући са рецепторима на ћелијама инфицираним хламидијама. Треће, контакт између ћелија инфицираних *C. trachomatis* и вирусних гликопротеина на површини суседних HSV инфицираних ћелија такође може довести до истог ефекта.

Међутим остаје отворено питање да ли се аберантна перзистенција РТ *C. trachomatis* може десити и да ли се дешава и у *in vivo* условима и ако се дешава, до којих последица доводи? Као и питање да ли су сва хламидијална РТ иста?

Екстензивне компаративне геномске, транскриптомске и протеомске анализе су недавно примењене на раст *C. trachomatis*, *C. pneumonia* и *C. psittaci* под нормалним, насупрот аберантним тј. перзистентним условима индукованим пеницилином, *IFN- $\gamma$*  или недостатком гвожђа. Иако су у различитим моделима перзистенције фенотипски критеријуми остали слични у смислу морфолошки увећаног, аберантног РТ које не полеже деоби, али је вијабилно и некултивабилно, транскрипциони профил показује значајну разлику како у усходној тако и нисходној регулацији гена између различитих модела. На пример, са једне стране је показано да *IFN- $\gamma$*  индуковано аберантно РТ *C. trachomatis* редукује продукцију МОМР, а повећава продукцију *cHSP60*, док је са друге стране у сличним експерименталним условима описана усходна регулација *ompA* гена који кодира МОМР (49). Према томе, тренутни консензус је да се транскрипциони одговор хламидија разликује у зависности стимулуса који индукује перзистенцију и да сваки од њих вероватно генерише различити ћелиски одговор.

#### 1.1.3.2. Постојање и консеквенце хламидија аберантног фенотипа РТ у *in vivo* условима

Клинички ентитети који се могу приписати перзистентној *in vivo* инфекцији са веома ниским нивоом продукције ЕТ или без продукције ЕТ могу укључити: **1.** асимтоматски уретритис код мушкараца и цервицитис код жена; **2.** тиху пелвичну инфламаторну болест код жена; **3.** реактивацију или реизолацију истог генотипа након недељу или месец дана упркос деманту реекспозитуре код позитивних индивидуа третираних антибиотцима са очигледном резолуцијом инфекције; **4.** негативан резултат културе код индивидуа са високим титром антитела.

Иако многи истраживачи сугеришу да се подмукла природа хламидијалне инфекције и хроничних инфламаторних консеквенци може приписати фенотипски аберантној хламидији, колективни подаци су још увек посредни и тема је и даље контраверзна (50). Основне препреке у решавању овог проблема су чињеница да инфекције узроковане аберантним фенотипом РТ нису детектибилне културом, да детекција присуства хламидијалне ДНК и/или антигена у ткивним узорцима може бити резултат одложеног чишћења након успешне ерадикације вијабилног микроорганизма, да ултраструктурни докази абнормалног плеоморфног РТ у макрофагима ткива инфицираних пацијената указују на постојање, али нису потврда постојања *in vivo* јер у изолацији нису доказани, те да висок титар антитела на хламидијални HSP60 антиген у групи индивидуа са високим ризиком инфекције није обавезно и синоним за истовремену хроничну инфекцију.

Како детектовати постојање аберантног фенотипа РТ у *in vivo* условима је једно од кључних питања? Једна могућност је да се скупљају хламидија позитивни ендоцервикални и ендометријални биоптати, са следственим прегледом таквих узорка на присуство морфолошки аберантних или нормалних инклузија и предузети обимну и брижљиву анализу хламидијалних инклузија методама као што су електронска микроскопија, конфокална микроскопија, и молекуларне студије изолованих инклузија, при чему би се ови подаци морали ставити у контекст клиничког налаза. Неинвазивни приступ, као што је коришћење циточеткице, за сакупљање микроорганизма и ћелија из гениталног тракта, у смислу праћења промена Т ћелијског репертора у току хламидијалне инфекције, може исто обезбедити важне информације о карактеристикама хламидијалног раста и доказима *in vivo* перзистенције (51).

За све предходно наведене индукторе аберантног фенотипа хламидија у *in vitro* условима може да се предпостави да функционишу као индуктори и у *in vivo* условима. Наиме, пеницилин, амоксицилин и ампицилин, се широко користе у клиничкој пракси, а потврђено је да је аберантни фенотип РТ индукован пеницилином, због успореног метаболизма, много отпорнији на дејство азитромицина (52).

Коначно, друго кључно питање које се односи на потенцијалне консеквенце аберантног фенотипа РТ хламидија у *in vivo* условима је природа имунског одговора покренутог од стране епителних ћелија инфицираних оваквим аберантним фенотипом и да ли стање аберантног РТ хламидије доводи до продужене, хроничне инфекције која доводи до имуно–посредованих секвела? Будући експерименти требају да буду дизајнирани тако да одговоре пре свега на питање који се различити хемокински

сигнали покрећу у акутно или аберантно инфицираним ендочервикалним или ендометријалним ћелијама изложеним пеницилину, *IFN- $\gamma$* , или у недостатку гвожђа и да ли су ти сигнали антиинфламаторни или проинфламаторни.



## 1.2. Патогеност *C. trachomatis*, болести и компликације

### 1.2.1. Фактори вируленције

#### 1.2.1.1. Главни протеин спољашње мембране

МОМР је најдоминантнији протеин спољашњег мембранског комплекса (енг. Outer Membrane Complex – OMP) *C. trachomatis*, чинећи 60% укупне масе овог комплекса. (53). Молекулска тежина МОМР–а је око 40 kDa, са малим варијацијама у величини између серотипова (54). Сугерише се да МОМР функционише као порински протеин (55) и да учествује у везивању ЕТ за ћелију домаћина (еукариотску ћелију) (56). *ompA* ген који кодира МОМР протеин кодира девет различитих региона. Пет од њих су високо конзервирани међу серотиповима *C. trachomatis*, док су преостала четири домена позната као варијабилни домени (енг. variable domain – VD) обележени као VD 1 – VD 4. Варијабилни домени су површински експримирани, јако су имуногени и поседују серотип специфичне епитопе (8). Ген *ompA* или *omp1* се састоји од 1182 базних парова и кодира 394 аминокиселинских протеина. Упоредивањем *omp1* гена и МОМР протеина међу серотиповима *C. trachomatis*, утврђено је да су гени и протеини у 84 – 97% случајева идентични како на нуклеотидном тако и на аминокиселинском нивоу. Верује се да одговор неутралишућих антитела на МОМР врши селективни притисак и доводи до антигенских варијација показаних међу серотиповима, а да оне настају како би дозволиле опстанак *C. trachomatis* у имунизованој популацији. У прилог овој хипотези говори студија у којој су сојеви *C. trachomatis* изоловане из цервикса проститутки из Кеније показали знатне варијације DNK секвенци унутар *omp1* локуса. Већина варијација је настала услед тачкастих мутације, нуклеотидних супституција или делеција, али и рекомбинација. На овај начин се у имунизованој популацији одржава константна учесталост инфекције појавом узастопних таласа алелских варијација (57).

Бројне студије су документовале да је *ompA* ген под утицајем два типа еволутивног притиска, селективним имунским и антибиотским притиском (58, 59). Ови притисци доводе до разноликости *omp1* гена, што доводи до минималних промена у протеинима,

чиме се нарушава интеракција ових антигена са претходно синтетисаним антителима и дозвољава мутираном соју да избегне имунски надзор. Ову предпоставку подржала је *in vitro* студија у којој је показано да излагање неутралишућим антителима превенира реинфекцију референтним сојем, док блиско сродан *omp1* варијетет настао услед тачкастих мутација проузрокованих селективним имунским притиском избегава неутрализацију (60).

#### 1.2.1.2. Полиморфни мембрански протеини

Полиморфни мембрански протеини (енг. Polymorphic Membrane Proteins – Pmp) хламидија представљају фамилију протеина својствену само хламидијама, те самим тим имају важну улогу како у њиховој биологији тако и у патогенези обољења која изазивају (61). Међу врстама у роду хламидија постоје бројне варијације како у броју гена који кодирају ове протеине, тако и у њиховој експресији у току инфективног процеса. Комплетном анализом генома *C. trachomatis* откривено је девет *pmp* гена (*pmpA* – *pmpI*) који кодирају ове протеине. На нивоу генома, *pmp* гени чине око 14% кодирајћег капацитета *C. trachomatis*, што нам поново наговештава критичну улогу ових протеина (8). Међутим, прецизна улога ових хламидија – специфичних протеина није позната. Са једне стране потврђено је да су *pmpD* и *pmpH* површински експримирани протеини спољашње мембране, а са друге стране се сматра да су ауотранспортни протеини односно да чине секретциони систем тип V (62). У том смислу намеће се питање да ли су *pmp* молекули ауотранспортни протеини или интегрални протини спољашње мембране? Са једне стране, *pmp* протини су молекулске тежине од 90 kDa до 187 kDa, што надмашује уобичајену величину интегралних протеина спољашње мембране (*Proteobacteria* 30 kDa до 90 kDa), али одговара величини ауотранспортних протеина која се креће од 50 kDa до 300 kDa. Међутим, са друге стране једно не искључује друго, јер је показано да је површинска експресија неопходна за све ауотранспортне протеине, те да је транслокациона јединица (ауотранспортни домен;  $\beta$  – домен) интегрални мембрански протеин, а у неким случајевима када се путујући домен не одваја од  $\beta$ -домена, цео ауотранспортни молекул остаје на површини и егзистира као интегрални протеин спољашње мембране (63).

### 1.2.1.3. *C. trachomatis* стрес протеин од 60 kDa

Хламидијални HSP60, за који је у *in vitro* условима показано да се продукује у случајевима перзистентне хламидијалне инфекције, може индуковати антиген специфични имунски одговор, по типу реакције касне преосетљивости или молекулске мимикрије и овим имуно-патолошким механизмима довести до настанка болести. Серумска и мукозна антитела на сHSP60 доказана су код жена са пелвичном инфламаторном болешћу (ПИБ) (64–67), тубарним фактором инфертилитета (ТФИ) (68), перихепатитисом (69), и цервикалним карциномом (70). У студији која је упоређивала жена са ТФИ и жене са инфертилитетом друге етиологије, показано је да је код жена са ТФИ пролиферативни одговор мононуклеарних ћелија периферне крви на сHSP60 знатно виши у односу на пролиферативни одговор на ЕТ (71). Такође, показано је да код жена са ПИБ и ТФИ, Т лимфоцити ткива ендометријума и Фалопијевих туба одговарају на стимулацију сHSP60 (72). У студијама које су користиле анималне моделе, доказана је улогу сHSP60 у патогенези патолошког одговора по типу реакције касне преосетљивости у Фалопијевим тубама (73)

Такође је доказана и улога сHSP60 у реинфекцијама. Наиме, утврђено је да код жена које имају ПИБ и реинфекцију истим или другим серотипом *C. trachomatis*, Т лимфоцити продукују нижи ниво IFN- $\gamma$  након стимулације сHSP60 у односу на жене са примарном хламидијалном инфекцијом (74). У прилог овоме говори и студија у којој се протективни имунитет повезује са повећаним нивоом IFN- $\gamma$  након стимулације мононуклеарних ћелија периферне крви сHSP60 (75). Поред свега наведеног, постоје и подаци који сугеришу да аутоимунски механизми могу имати улогу у настанку обољења изазваних сHSP60. Наиме, сHSP60 показује висок степен хомологије са хуманим HSP60kDa и у недавној студији идентификовани су Т ћелијски епитопи са 100% хомологије између ова два протеина (76). Слично је показано и на мишијем моделу инфекције где се снажан Т ћелијски пролиферативни одговор и висок титар антитела на мишији HSP60kDa покреће након истовремене имунизације мишева са сHSP60kDa и мишијим HSP60 (77). Насупрот томе, имунизација само сHSP60 не изазива исти ефекат.

#### 1.2.1.4. Секрециони систем тип III

Секрециони систем тип III (Type III secretion system – TTSS) је комплетан аранжман структура које испоручују ефекторне протеине патогена након њиховог контакта са ћелијом домаћина (78). За бројне површинске протрузије на површини ET и PT, чије постојање је утврђено електронском микроскопијом се претпоставља да могу претстављати TTSS (79).

Путем TTSS, ET секретује протеин оговоран за рану интеракцију хламидије и ћелије домаћина, тј. TARP протеин (80), који се убацује у ћелију домаћина доводећи до везивања и ремоделације актина и реаранжирања цитоскелета на месту интернализације ET, што олакшава инвазију ћелије (81). Битна одлика ових TARP протеина је да се структурно разликују како унутар врсте тако и међу врстама хламидија (82), а постојање ових структурних разлика се блиско доводи увезу са инвазивним карактеристикама *C. trachomatis* (83).

Поред TARP, који је есенцијалан за инвазију еукариотске ћелије, TTSS секретује и друге ефекторске протеине. Међу њима су протеини инклузионе мембране (енг. inclusion membrane (Inc) proteins). Inc протеини су најпре идентификовани код *C. psittaci* (41), а потом и код *C. trachomatis* (84). Потврђено је да је IncA протеин *C. trachomatis* експримиран на површини инклузионе мембране као и да учествује у хомотипској фузији хламидијалних инклузија (85). У студијама које су пратиле инфекцију код пацијената инфицираних IncA негативним *C. trachomatis* сојем потврђено је да је овај генотип асоциран са смањеном инфетивношћу бактерије (86, 87). Поред IncA протеина, у инклузионој мембрани хламидија потврђено је присуство и IncD, IncE, IncF и IncG протеина, а транскрипција њихових гена (*inc D, E, F, и G*) започиње у првих 2 сата након интернализације ET, што јасно указује на то да и они учествују у модификацији насцентне инклузије (88). Иако су студије *inc* гена како тако проучене, студије на Inc протеинима, а посебно о њиховој улози у патогенези хламидијалне инфекције тек су у зачетку.

#### 1.2.1.5. Порински Б протеин

Порински Б протеин (Por B) је површински експримиран молекул спољашње мембране сличан МОМР—у, који функционише као порински молекул. Поред тога што функционише као порински молекул, имунореактивни антигени овог протеина покрећу снажан хуморални имунски одговор (89).

#### 1.2.1.6. Хламидијални протеаза/протеазом налик фактор активности

Хламидијални протеаза/протеазом налик фактор активности (енг. Chlamydial protease/proteasome — like activity factor – CPAF) се секретује у цитосол еукариотске ћелије зависисним транспортом (енг. Sec – dependent transport) (90). CPAF цепа интермедијарне филаменте чиме омогућава експанзију инклузује али и стабилност инклузије кроз време (91). У току транспорта инклузије, неопходно је да хламидија поред одржавања интегритета инклузије, осигура да не дође до ране смрти еукариотске ћелије. Наиме рана апоптоза домаћинске ћелије оштећује и развојни циклус хламидије, те изостаје ослобађање виабилних ЕТ за следећи нови инфективни процес (92). CPAF је управо тај ефекторни протеин који разграђује ВН—3 протеин из Вс1—2 фамилије који је одговоран за детекцију стресних сигнала у ћелији и покретање апоптозе (93).

#### 1.2.1.7. Зона пластичности

Као што је, обзиром на стриктну интрацелуларну природу хламидија, било изненађујуће откриће интрагеномских и интрагеномских рекомбинација, тако је био изненађујућ и налаз региона високе хетерогености, који је назван зона пластичности, сходно термину који се користи и код других патогених бактерија а односи се на регионе генома у којима се одиграва рапидно геномско реаранжирање (94). Гени унутар ове зоне кодирају протеине који доприносе вируленцији патогена а у које спадају: адезини, токсини, инвазини, систем за преузимање гвожђа и други. На пример, многи сојеви *C. trachomatis* немају комплетан ген за синтезу токсина и у студијама у *in vitro* условима је показана појачана цитотоксичност сојева *C. trachomatis* који садрже комплетан ген (95).

Веома важан налаз је да се у пластичној зони *C. trachomatis* налази парцијални оперон за триптофан синтетазу *trpRBA*, кога немају *C. muridarum* и *C. abortus*. Ово условљава да након индиректне потрошње триптофана, активацијом IDO ензима од стране IFN —  $\gamma$  урогенитални серотипови *C. trachomatis* услед поседовања функционалне триптофан синтазе (за разлику од окуларних серотипова који је немају), могу да користе индол који произоде микроорганизми доњег гениталног тракта за биосинтезу триптофана и наставе са интрацелуларним развојом (40). Управо ове функционалне разлике у оперону међу серотиповима дају различиту осетљивост на дејство IFN —  $\gamma$ , што уједно може утицати на ткивни тропизам серотипова *C. trachomatis* (96). Још једно важно откриће налази се у зони пластичности, а односи се на геномска острва у којима се налазе гени резистенције на тетрациклин. Откриће се односи на *C. suis* врсти која је сродна *C. trachomatis* (97).

Збирно речено, подаци нас наводе да MOMP и Pmp протеина имају улогу у адаптацији хламидија у ћелијама домаћина путем селективних мутација и рекомбинација њихових гена. Такође MOMP, неки Pmp протеини, PgpB и TARP су фактори вируленције који одређују ткивни тропизам и патогенезу ране инфекције. Парцијални оперон за биосинтезу триптофана такође одређује ткивни тропизам и учествује у развоју перзистентне инфекције. Хламидијални HSP60 је фактор вируленције који покреће штетне ефекте имунског одговора у току перзистентне инфекције, док је CPAF критичан за одржавање хламидијалне инклузије у току развојног циклуса.

### 1.2.2. Класификација *C. trachomatis* и подела на биотипове и серотипове

По тренутно важећој класификацији врста *C. trachomatis* припада роду *Chlamydia*, породици *Chlamydiaceae*, реду *Chlamydiales*. *C. trachomatis* се на основу биолошких својстава дели на три биотипа: трахомни биотип, Лимфогранулома венерум (LGV) биотип и мишији биотип (98). За људе су значајни трахомни биотип и LGV биотип који се на основу антигенске грађе MOMP–а даље деле на 19 серотипова. MOMP који чини 60% спољашње мембране хламидија представља типски специфичан антиген који одређује врсту и серотип. Кодирањем је *ompA* геном и садржи четири варијабилна сегмента (VS1–VS4) која су одговорна за постојање 19 серотипова са различитим клиничким манифестацијама инфекције (99). У тих 19 серотипова спадају: серотипови А, В, Ва и С који углавном инфицирају коњуктиву, серотипови D, Da, Е, F, G, H, I, Ia, J и K који инфицирају ћелије урогениталног тракта и серотипови L1, L2, L2a, L2b и L3 који врше инвазију субмукозе и лимфних чворова (100).

### 1.2.3. Трансмисија, болести и секвеле хламидијалне инфекције

*C. trachomatis* је стриктно интрацелуларна, Грам – негативна бактерија, која се преноси директним сексуалним контактом. Поражавајућа је чињеница, да генитална хламидијална инфекција код већине, како жена (70% – 90%), тако и мушкараца (50%), пролази асимптоматски и недијагностиковано (101). Обзиром на овако високу учесталост асимптоматских инфекција, особе које имају инфекцију, представљају значајан резервар за даље преношење. Са друге стране, код великог броја жена (45%) долази до спонтане резолуције инфекције, али се у исто време инфекција може асцендентно ширити у горњи репродуктивни тракт жена, где може прогредирати у перзистентну инфекцију (102). Такође, асимптоматска природа гениталне хламидијалне инфекције, заједно са недијагностикованом и нетретираном инфекцијом, представља ризик за појаву честих рекурентних инфекција. Реинфекције се одликују парцијалним имунским одговором, који је слабог интензитета, зато што је комплетан имунски одговор после иницијалне инфекције комплетан али краткотрајан. Такође, давање антибиотика може повећати ризик од реинфекција, зато што ограничава време у којем инфицирана особа може успоставити имунски одговор (103). Рекурентне и

перзистентне инфекције се доводи у везу са бројним репродуктивним компликацијама код жена као што су: пелвична инфламаторна болест, тубарни фактор инфертилитета, ектопична трудноћа, хронични пелвични бол и неповољни исходи трудноће (превремена руптура мембрана, превремени порођај, неонатална смрт, постпартални ендометритис, спонтани абортус, рекурентни абортуси, изостали абортус) (104).

Упркос фреквентном одсуству симптома у току акутне инфекције, код једне трећине жена се јављају локални знаци инфекције приликом прегледа. Два најчешћа знака гениталне *C. trachomatis* инфекције су: мукопурулентни цервикални исцедак и цервикална ектопија. Поред ових најчешћих знакова, примећени су и едем, конгестија и крварење цервикса (101).

Клиничке манифестације гениталне хламидијалне инфекције код жена, пре свега обухватају инфекције доњег гениталног тракта, које се најчешће испољавају појавом цервицитиса. Међутим, хламидијални цервицитис је веома често удружен са уретритисом и налаз леукоцитурије уз одсуство позитивне културе иде у прилог *C. trachomatis* генитоуринарне инфекције. Асцедентна инфекција са доњих партија гениталног тракта је веома честа, доводећи до инфекције горњег гениталног тракта које се манифестују ендометритисом, аднекситисом и пелвичном инфламаторном болешћу. На послетку и Fitz–Hugh–Curtis синдром, кога карактеришу перихепатичне адхезије, је асоциран са хламидијалном инфекцијом горњих партија гениталног тракта и чешће је повезан са хламидијалном у односу на гонококну инфекцију (105).

Инфекција уретре и доњег гениталног тракта се обично манифестују дизуријом и посткоиталним крварењем, док се инфекције горњег гениталног тракта могу манифестовати појавом ирегуларног крварења и абдоминалних болова и дискомфорта. Недијагностикована и нелечена хламидијална инфекција може довести до озбиљних репродуктивних компликација. Пре свега генитална *C. trachomatis* инфекција је битан узрочни агенс пелвичне инфламаторне болести која пак доводи до инфертилитета, ектопичне трудноће и хроничног пелвичног бола. Хронични пелвични бол се у више од 15% случајева доводи у везу са присуством перитонеалних адхезија. Више од две трећине тубарног фактора инфертилитета и једна трећина ектопичне трудноће може се преписати гениталној инфекцији изазваној *C. trachomatis* (106).

Поред тога генитална хламидијална инфекција у првом триместру трудноће, доводи се у везу и са спонтаним побачајима, изосталим побачајима и рекурентним (хабитуалним) побачајима. У патогенези ових неповољних исхода трудноће наводи се да оштећење ендометријума услед хламидијалне инфекције може утицати на губитак



плода. Такође се наводи, да се услед високог степена хомологије између хуманог HSP60 и cHSP60, имунски одговор покренут на cHSP60, може преусмерити на HSP који је експримиран на површини зигота (107 – 109). У другом и трећем триместру трудноће хламидијална инфекција може довести до: превремене рупуре плодових овојница, превременог порођаја, мале телесне масе на рођењу, неонаталне смрти и постпарталног ендометритиса ( 110 – 112).

Хламидијална инфекција у току порођаја се може пренети на одојче. Стопа трансмисије путем инфицираног вагиналног секрета је веома висока и износи од 50% – 70 % (113). Приближно 30 – 50 % одојчади инфицираних мајки развија коњуктивитис 5 до 10 дана након порођаја (114, 115). Најмање 50% одојчади са коњуктивитисом добије и назофарингеалну инфекцију, док се хламидијална пнеумонија развија у 30% ових случајева након 2–3 недеље инкубације. Уколико се овако стечена инфекција на рођењу не лечи она може перзистирати месецима па чак и годинама (116).

## 1.3. Патогенеза инфекција изазваних *C. trachomatis*

### 1.3.1. Природни ток хламидијалне инфекције

Генитална хламидијална инфекција је најчешћа полно преносива бактеријска инфекција широм света, са трендом раста сваке године. Повећан број пријављених случајева, можда пре одражава појачане мере скрининга, него право повећано оптерећење болешћу. У сваком случају, даљи покушаји превенције и контроле хламидијалне инфекције знатно су отежани ограниченим знањем о природном току хламидијалне инфекције. Природан ток хламидијалне инфекције укључује дужину трајања хламидијалне инфекције и факторе који утичу на исход инфекције као што су: спонтанa резолуција, перзистенција или развој компликација.

Кроз четири кључна питања резимирана су досадашња знања о трајању нетретиране, некомпиковане хламидијалне инфекције и факторима који су повезани са спонтаном резолуцијом хламидијалне инфекције.

Питање број 1: **Колико траје нетретирана, некомпикована хламидијална инфекција?** Већина студија која се бавила дужином трајања хламидијалне инфекције је проспективно или ретроспективно пратила инфекцију у веома кратком временском периоду између иницијалног скрининга и рескрининга код жена које нису добијале антибиотску терапију или су добијале антибиотску терапију са slabим антихламидијалним ефектом. Интервал праћења се кретао од неколико недеља до неколико месеци. У овим студијама стопа спонтане резолуције хламидијалне инфекције кретала се између 11% – 44% (117–123).

Такође постоје студије које су пратиле природни ток гениталне хламидијалне инфекције у интервалу дужем од годину дана. МекКормак и сарадници су потврдили да је 16–17 месеци након иницијалног скрининга, 57% жена још уве било инфицирано (124). Молано и сарадници наводе да је у периоду праћења дужем од 5 година до спонтане резолуције дошло код 54% жена након годину дана, код 83% жена након две године, код 91% жена након 3 године и код 95% жена након 4 године (125). Сличне резултате наводи и студија Мора и сарадника који су потврдили да је до спонтане резолуције дошло код 45% жена након једне године при чему ни једна жена није имала симптоме пелвичне инфламаторне болести (102). Закључак студија које су пратиле

дужину трајања нетретиране, некомплицоване гениталне хламидијалне инфекције је да до спонтане резолуције долази са временом и да половина инфекција спонтано прође у око годину дана након иницијалног тестирања.

Међутим све студије су ограничене пре свега из разлога што се не зна када су жене заправо иницијално инфициране, тј. када су стекле примарну инфекцију, што ограничава тачну процену трајања хламидијалне инфекције. Потом, ни у једној студији није урађена типизација сојева, нити приликом иницијалног, нити приликом поновљеног тестирања, како би се осигурао одговор на питање да ли је инфекција која је детектована све време испитивања, инфекција истим или другим сојем. На крају, испитивања су спровођена у популацији жена у којој је иначе висока преваленца хламидијалне инфекције.

Питање број 2: **Који клинички фактори утичу на резолуцију нетретиране, некомплицоване гениталне хламидијалне инфекције код људи?** У одсуству антибиотске терапије, до спонтане резолуције хламидијалне инфекције може доћи посредством имунског одговора домаћина. Један од фактора који је асоциран са спонтаном резолуцијом хламидијалне инфекције, је што дужи интервал између иницијалног тестирања и ретестирања, што јасно упућује на то да имунски одговор доводи до елиминације инфекције са временом.

Постоји претпоставка да предходна хламидијална инфекција може обезбедити протективни имунитет за наредну хламидијалну инфекцију. Старији узраст, који може представљати сурогат за предходну хламидијалну инфекцију, у смислу веће могуће изложености *C. trachomatis* са годинама, испитиван је и повезан са бржом резолуцијом хламидијалне инфекције у две студије (117, 122). Две студије су такође пратиле да ли историја претходне гениталне хламидијалне инфекције повећава дужину трајања инфекције. У једној од њих је показана већа стопа спонтане резолуције међу испитаницима са предходном (24%) у односу на испитанике без предходне хламидијалне инфекције (13%) (118), док у другој студији разлика између испитиваних група није показана (117). Међутим обе студије су лимитиране, и то пре свега што је детекција предходне хламидијалне инфекције вршена само на основу клиничке евиденције. Потом, ни у једној од ове две студије није извршена серолошка потврда предходне хламидијалне инфекције, број испитиваних особа је био мали, а интервал праћена испитаника је био кратак у обе студије.

Такође, испитивана је и асоцијација између полова и спонтане резолуције хламидијалне инфекције. Резултати студија које су се бавиле овом проблематиком су

били контрадикторни. У једној студији је показано да до спонтане резолуције чешће долази код мушкараца (36%), него код жена (16%), док је у другој студији показано супротно, односно да до спонтане резолуције чешће долази код жена у односу на мушкараце (23% vs. 6%) (118). У једној студији је испитивана повезаност бактеријске вагинозе и резолуције хламидијалне инфекције, а резултати су показали да да нема повезаности између ове две појаве (122). Молано и сарадници са друге стране наводе да код жена које користе оралне контрацептиве брже долази до резолуције хламидијалне инфекције (125).

Закључак је да су наша сазнања о клиничким факторима који могу да утичу на трајање нетретиране, некомплицоване хламидијалне инфекције, веома оскудна. Предходна хламидијална инфекција може да да изврстан степен протективног имунитета и да на тај начин скрати време трајања субсеквентне инфекције. Студије које би се убудуће бавиле утицајем предходне хламидијалне инфекције на трајање субсеквентне инфекције би обавезно требале да уведу серолошке тестове на *C. trachomatis*, како би прецизније утврдиле предходну изложеност. Такође, узорковање би требало да се обавља у краћим временским размацима а предлаже се и увођење дневника сексуалних активности код учесника који су приликом почетног тестирања били негативни на *C. trachomatis*, али су под високим ризиком за стицање сексуално преносивих обољења.

Питање број 3: **Који се тип имунског одговора активира у току нетретиране, некомплицоване гениталне хламидијалне инфекције и које генетске детерминанте домаћина могу да модулишу имунски одговор?** Јако битно за разумевање трајања гениталне хламидијалне инфекције код људи је знање о периферном системском и мукозном локалном имунском одговору који олакшава елиминацију *C. trachomatis* и генетске детерминанте које модулишу овај имунски одговор. Кључна сазнања из студија о хуманом имунском одговору у току активне гениталне хламидијалне инфекције су.

1. детектована серумска и генитална мукозна антитела, (углавном IgA и IgG) на специфичне протеине *C. trachomatis* и на ЕТ *C. trachomatis* (126–129).
2. детектован повећан ниво цитокина у гениталној мукози (126,129,130)
3. број ПМН леукоцита у узорцима цервиковагиналног лаважа није стално повећан (131).
4. повећање цервикалних Т лимфоцита, али не и Б лимфоцита у цервиксу испитаница (132)

5. и периферни и локални лимфопрولیферативни одговор мононуклеарних ћелија на антигене *C. trachomatis* (126, 128)

У студији о имунском одговору код проститутки које су под високим ризиком од хламидијалне инфекције Коен и сарадници налазе да лимфопрولیферативни одговор мононуклеарних ћелија периферне крви на ЕТ *C. trachomatis* и на сHSP60 мерен на почетку корелира са протекцијом од инцидентне хламидијалне инфекције, али ни цервикална ни серумска антитела на ЕТ и сHSP60 *C. trachomatis* нису повезана са смањењем инцидентне хламидијалне инфекције (133). У студији Агравала и сарадника је праћена разлика у имунском одговору између учесница са примарном и рекурентном гениталном хламидијалном инфекцијом (примарну од рекурентне хламидијалне инфекције су диференцирали на основу присуства и одсуства серумског IgG на *C. trachomatis*). У студији је потврђено да је лимфопрولیферативни одговор мононуклеарних ћелија цервикса на сHSP10kDa виши у рекурентној инфекцији, док је на МOMP виши у току примарне инфекције. Такође је у студији доказано да је ниво IFN— $\gamma$  виши код жена са рекурентном хламидијалном инфекцијом (126).

Главна ограничење студија које су процењивале имунски одговор домаћина у некомплицованој гениталној хламидијалној инфекцији је недостатак идентификације других потенцијалних патогена који би могли индуковати имунски одговор који није специфичан за *C. trachomatis*.

Разумевање имунског одговора домаћина код нетретиране, некомплицоване гениталне хламидијалне инфекције је важно као и разумевање генетских детерминанти које би могле да модулишу имунски одговор. Често је тешко повезати специфичну генетску детерминанту за специфичан имунски одговор и две студије које су пратиле повезаност генетских детерминанти и некомплицоване гениталне хламидијалне инфекције су примарно биле фокусиране на то како генетске детерминанте утичу на ризик од стицања хламидијалне инфекције (134) или од реинфекције хламидијом (135) него на имунски одговор на инфекцију. Ове две студије су пратиле податке код 485 адолесценткиња. Генетске варијације које су одређиване укључивале су варијације MHC молекула I и II класе и 16 нуклеотидних полиморфизама за 7 цитокинских гена. Тестирање је вршено сваких 6 месеци тестом амплификације нуклеинске киселине — *C. trachomatis* ланчаном реакцијом лигазе (енг. ligase chain reaction (LCR)). Гејслер и сарадници су доказали да су DQB1\*06 и B\*44—Cw\*04 повезани са инцидентном гениталном хламидијалном инфекцијом (дефинисана као нова хламидијална инфекција код учесница које су биле негативне на почетку истраживања) (134). Са друге стране,

Ванг и сарадници су показали да варијација у промотеру гена за IL–10 има заштитну улогу од реинфекције хламидијом и да жене без ове генетске варијације имају висок ниво ендоцервикалног IL–10 у време стицања хламидијалне инфекције. У овој студији је такође потврђено да је DQB1\*06 асоциран са рекурентном хламидијалном инфекцијом (135).

Генерално речено постоји само неколико студија о имунском одговору код људи у току некомплицоване гениталне хламидијалне инфекције. Ове студије су пратиле имунски одговор у току активне хламидијалне инфекције, али нису утврдиле који специфичан имунски одговор утиче на резолуцију инфекције а који доводи до перзистенције. Постоји такође неколико студија које су процењивале улогу имуногенетских детеминати на исход некомплицоване гениталне хламидијалне инфекције. Будуће студије би требале да се фокусирају пре свега на потенцијалне патогене који би у исто време могли да утичу на имунски одговор; на различите популације испитаница и на откривање већег броја генетских детерминанти које би могле да модулишу имунски одговор.

Питање број 4: **Које биолошке особине *C. trachomatis* утичу на резолуцију нетретиране, некомплицоване гениталне хламидијалне инфекције код људи?** Примарна биолошка карактеристика *C. trachomatis* која се доводи у везу са резолуцијом некомплицоване гениталне хламидијалне инфекције је OmpA протеин, који представља обилан, високо имуноген протеин експримиран на површини бактеријске ћелије. Три студије које су користиле *ompA* генотипизацију, утврђивале су однос OmpA генотипа *C. trachomatis* са резолуцијом некомплицоване гениталне хламидијалне инфекције или са перзистентном инфекцијом. Студија Молана и сарадника показала је да код испитаница инфицираних *C. trachomatis* серотипом Б и Ц хламидијална инфекција траје дуже (125). Мор и сарадници су насупрот томе известили да код испитаница инфицираних *C. trachomatis* серотипом Е хламидијална инфекција може трајати и годину дана дуже у односу на испитанице инфициране другим серотиповима (102). На крају, Дин и сарадници, у току од две године праћења, налазе испитанице са више од три узастопне, некомплицоване гениталне хламидијалне инфекције изазване истим OmpA генотипом што сугерише на постојање перзистенције иако реинфекција од нетретираног партнера није искључена (136).

Гомес и сарадници су пратили везу OmpA генотипа са осталим биолошким карактеристикама *C. trachomatis* као што је инфективно оптерећење хламидијом (квантитативна мера која подразумева број микроорганизама у односу на број

еукариотских ћелија) и како генотип корелира са исходом гениталне хламидијалне инфекције. У овој студији је потврђено да је инфективно оптерећење хламидијом није повезано са OmpA генотипом *C. trachomatis*, али да је мање у свакој субсеквентној епизоди хламидијалне инфекције (137).

И у овом случају, када су у питању биолошке карактеристике *C. trachomatis* које би могле да утичу на исход некомплицоване хламидијалне инфекције, можемо рећи да је наше знање ограничено, а генерални закључак ових студија може бити да се код људи не развија комплетан протективни имунски одговор на специфичан OmpA генотип *C. trachomatis*, али се развија парцијални имунски одговор што је потврђено смањеним инфективним оптерећењем хламидијом са сваком субсеквентном хламидијалном инфекцијом.

### 1.3.2. (Протективни) имунски одговор на хламидијалну инфекцију

Важна питања везана за гениталну инфекцију изазвану *C. trachomatis* су питања везана за протективни имунитет после прекежане инфекције и то:

- Да ли се протективни имунитет на гениталну хламидијалну инфекцију развија
- Које му време треба да се развије
- Колико траје након инфекције
- Који су његови ефекторски механизми
- Као и да ли антибиотски третман може утицати на његов развој

У свим експерименталним анималним моделима гениталне хламидијалне инфекције, постоје снажни и директни докази о постојању протективног имунитета. Поред тога на анималним моделима окарактерисан је и обим тј. степен ове имуности и доказано је да постоје два нивоа имуности и то:

- Комплетна имуност, у којој организам не може бити изолован или детектован на месту реинокулације.
- Парцијална имуност, у којој организам може бити изолован или детектован на месту реинокулације али у знатно мањем броју и/или у којој је време излучивања микроорганизама скраћено у односу на примарну инфекцију.

Дакле, комплетан имунитет у потпуности превенира реинфекцију, док у току парцијалног имунитета, може доћи до реинфицирање, али је тада инфекција обично скраћена и мањег је интензитета него примарна инфекција. Имунитет на реинфекцију је комплетан за веома кратко време.

Експериментални докази су чврсти. Потврђено је да су BALB/с мишеви инфицирани *C. muridarum*, у потпуности резистентни на реинфекцију 42 до 60 дана од почетка примарне гениталне инфекције или 3 недеље након резолуције исте. Код неких мишева до реинфекције долази 100 дана након претходног излагања узрочнику, док код свих мишева до реинфекције долази 150 дана након примарног излагања узрочнику (138, 139).

Такође, показано је а су женке морског прасета инфициране *C. caviae* комплетно имуне на реинфекцију 30 дана након примарне инфекције или 1 до 2 недеље након



резолуције, што је у студији потврђено немогућношћу изолације хламидија из цервикса. Након поновног излагања 30 дана од примарне инфекције, мали број животиња је био поново инфициран, да би 77 дана након примарне инфекције све животиње биле реинфициране након поновног излагања. (140).

Парцијални протективни имунитет је са друге стране присутан у много дужем временском периоду. Доказано је да када се мишеви поново изложе узрочнику 200 дана након примарне инфекције, инфекција има скраћен ток и мали број хламидија се може доказати (139). Претпостављајући да мишеви живе око две године овај период представља око 25% њиховог животног века. Студија на морском прасету је пак показала да реинокулација узрочника након више од две године од примарне инфекције доводи до инфекције, али је пик инфекције код свих животиња смањен упоређујући са примарном инфекцијом (141). Овај период представља чак више од 50% животног века заморчића.

Анималне студије нам јасно указују да само једна инфекција може покренути дуготрајан имунитет, који је по свом карактеру парцијалан, док је комплетан имунитет присутан у веома кратком периоду. Осим тога, иако на испитиваним моделима протективни имунитет обезбеђује одређени степен заштите у односу на узрочник, он не може да заштити од развоја компликација у горњем гениталном тракту, за које је потврђено да се могу развити и као последица примарне инфекције и као последица реинокулације (142).

Док са анималних модела имамо директне доказе о постојању протективног имунитета, до данас из етички неприхватљивих разлога, људи нису инфицирани *S. trachomatis* у експерименталне сврхе, те стога нису ни рађене студије на људима. Ипак, ограничен број студија о природном току гениталне хламидијалне инфекције, снажно подржава концепт да се имунитет код људи развија и да је способан да доведе до спонтане резолуције гениталне хламидијалне инфекције. Две студије у којима су укључене жене сугеришу спонтану резолуцију након 1 године код 45%–55% жена (102, 125 ) достижући до 94% након 4 године (125).

Остали докази о протективном имунитету код људи су већином индиректни и изведени из епидемиолошких студија. Једна од најзначајнијих епидемиолошких карактеристика гениталне хламидијалне инфекције је већа преваленца инфекције међу млађим особама, а у односу на старије особе. Највиша стопа гениталне хламидијалне инфекције забележена је код жена између 14 – 19 година и код мушкараца између 20 – 29 година (143). Овај инверзни однос између узраста и преваленце гениталне

хламидијалне инфекције, може одражавати постојање протективног имунитета који се развијао са годинама услед ранијих инфекција. У прилог овоме говори и инфективно оптерећење микроорганизмом које је такође обрнуто повезано са годинама, сугеришући да протективни имунитет може ограничавати репликацију хламидија код старијих особа. На овај закључак упућује студија у којој је доказано да број хламидијалних инклузија обрнуто корелира са годинама (144). Са друге стране висока преваленца гениталне хламидијалне инфекције код младих жена може бити повезана са периодом када је цервикална ектопија, такође фактор ризика за гениталну хламидијалну инфекцију, веома честа (145), али и са периодом високо ризичног сексуалног понашања и честих променена партнера (више од 2 партнера у току од 12 месеци).

Неколико студија показало је високу учесталост хламидијалне инфекције код особа које нису известиле историју сексуално преносивог обољења, сугеришући да су наивне особе подложније инфекцији услед недостатка специфичне имуности (146). Насупрот њима друге студије су потврдиле је да документована историја хламидијалне инфекције повезана са повећаним ризиком од субсеквентне инфекције (147) и да је анамнестички податак сексуално преносивог обољења такође ризико фактор за инцидентну инфекцију (148). Студија код жена које се баве проституцијом показала је, да је дужи период бављења проституцијом повезан са смањеним ризиком од инцидентне хламидијалне инфекције (149). Такође, показано је да жене које се мање од две године баве проституцијом имају већи ризик од инцидентне хламидијалне инфекције (133).

Још једна битна епидемиолошка карактеристика гениталне хламидијалне инфекције је да су реинфекције веома честе. Средње време рецидива хламидијалне инфекције је од 5 – 7 месеци, а ризик од инцидентне инфекције је већи међу млађим него међу старијим женама (150). Студија која је укључила проститутке указује да је јак епидемиолошки предиктор инцидентне инфекције, предходна хламидијална инфекција тј. потврђена хламидијална инфекција при првом прегледу (133). Све ово нас наводи на постојање протективног имунитета који је парцијалан. У прилог ове констатације говоре и студије које су процењивале поновљене инфекције коришћењем метода серотипизације или генотипизације како би дефинисале природу поновљених инфекција. Типизација сојева (и серотипизација и генотипизација) је од помоћи, када су серотипови или генотипови у две епизоде различити што потврђује да је реинфекција одговорна за поновљену епизоду инфекције. Типизација није пуно од помоћи, када је серотип или генотип у обе епизоде исти, зато што епизоде могу представљати

реинфекцију од нетретираног партнера или продукт неадекватне антибиотске терапије. У студији која се бавила проблемом поновљене инфекције 48 пацијента је имало поновљену инфекцију са одређивањем серотипа у обе епизоде инфекције, од тога 44,8% је имало реинфекцију са истим серотипом (151). Закључак је да је поновљена инфекција вероватно реинфекција истим серотипом, обзиром на то да су код пацијената културе биле негативне у периоду између инфекција. У студији која је спровођена међу женама које се баве проституцијом, 13 од 21 испитаница је имало реинфекцију која се десила у периоду од шест месеци и те реинфекције су биле изазване истим генотипом, док су само 2 од 19 испитаница које су имале реинфекцију која се десила у периоду дужем од шест месеци биле реинфициране истим генотипом (149). Аутори указују на могућност да је мања учесталост инфекције истим генотипом у периоду дужем од шест месеци одраз серотип специфичног имунитета. Још један доказ постојања протективне имуности је податак да код пацијенти са поновљеном инфекцијом имају нижи ниво елиминације хламидија, сугеришући да предходна изложеност хламидији може утицати на смањену репликацију као резултат стеченог али парцијалног имунитета (152).

Ова истраживања указују на то да се одређени степен протективног имунитета на реинфекцију развија код људи у току времена. Протективни имунитет је парцијални и може га надвладати реинфекција. У мери у којој су подаци доступни, постоји мало убедљивих доказа да је имунитет серотип или генотип специфичан. Трајање и јачина парцијалног протективног имунитета код људи је недовољно јасна. Проспективне студије које укључују проститутке и пацијенте са трахомом сугеришу да је Th1 тип имунског одговора укључујући CD4<sup>+</sup> T- лимфоците и IFN- $\gamma$  важна компонента стеченог имунитета код људи. Иако дефинитивне студије на људима нису доступне, слика хуманог протективног имунитета која се појављује у литератури корелира добро са карактеристикама и механизмима парцијалног имунитета дефинисаног на анималном моделу мишева и морског прасета. Краткотрајан комплетан имунитет је запажен рано након резолуције инфекције на анималним моделима али није показан у хуманим студијама.

Ипак скорашња студија нас оставља без дилеме, пружајући снажне и директне доказе да се у току гениталне хламидијалне инфекције развија протективни имунитет (153). Наиме, ова студија је прва потврдила повезаност спонтане резолуције гениталне хламидијалне инфекције код људи са смањеним ризиком од реинфекције. Пре свега у студији је потврђено да је до спонтане резолуције дошло код 22% пацијенткиња, док је насупрот томе 78% пацијенткиња још увек имало инфекцију приликом контролног

прегледа. Затим потврђено је да до реинфекције долази веома често, али да су оне знатно чешће код пацијенткиња које су имале дуготрајну хламидијалну инфекцију, без обзира на давање антибиотика и то у 19,9% случајева у односу на пацијенткиње код којих је дошло до спонтане резолуције (4,5%). Овај висок проценат реинфекција након терапије сугерише да или неке особе не развију протективну имуност или трајање инфекције и време давање антибиотске терапије могу модификовати резистенцију на следствену инфекцију. У овом тренутку се намећу два питања:

1. да ли трајање предходне инфекције детерминише подложност реинфекцији?
2. да ли заустављање инфекције, давањем антибиотске терапије зауставља развој протективног имунитета?

У студији на мишијем моделу гениталне хламидијалне инфекције јасно је показано да антибиотски третман дат пре него што се имунски одговор у потпуности развије, спречава развој протективног имунитета (154). Изгледа да се исти феномен дешава и код људи, па тако у студијама које су проучавале хламидија специфични одговор ПМН леукоцита (155) и ендоцервикалних Т лимфоцита (51) је потврђено да до њиховог смањења долази 3-4 недеље након давања антибиотског третмана. Сада остаје главна непознаница, а то је колико дуго људи требају да буду инфицирани пре него што се развије протективни имунитет?

Налаз једне епидемиолошке студије нам сугерише да је третман инфекције повезан са повећаном стопом реинфекције и аутори изводе хипотезу да антибиотска терапија укида развој протективног имунитета. У овој студији је забележено да стопа хламидијалне инфекције опада након иницијалног скрининга и субсеквентног давања терапије, али онда поново нагло расте након неколико година (156). Претпоставка је да скрининг и рана антибиотска терапија смањују трајање инфекције, редукују имунски одговор и тако повећавају подложност реинфекцији у целој популацији. Такође, скорашња хумана епидемиолошка студија је известила високу стопу гениталне хламидијалне реинфекција након увођења скрининг програма за контролу и превенцију хламидијалних инфекција (157). У овој студији се наглашава да она настаје због прераног давања антибиотика, што не доводи до потпуног развоја имунског одговора и самим тим повећава подложност реинфекцији. Збирно ове студије подржавају хипотезу "ухапшеног имунитета" (158). Ипак, неопходно је нагласити да се антибиотски третман,

без обзира на повећану преваленцу гениталне хламидијалне инфекције и све већи број реинфекција, показао као неопходан у смањивању инциденце компликација насталих услед гениталне хламидијалне инфекције (159).

На крају, важна питања у вези протективног имунског одговора на која је остало да се одговори су: који су то ефекторски механизми укључени у елиминацију хламидија, да ли се у току инфекције покрећу урођени и/или стечени имунски одговор, те који од њих је повезан са протективним имунитетом.

*Локални ћелијски и цитокински одговор на инфекцију C. trachomatis.* Неколико студија указује на важност имунског одговора на месту инфекције. Показано је да се у ендocerвикалном секрету испитаница може детектовати IFN- $\gamma$ , те да је ниво овог цитокина виши код инфицираних испитаница у односу на неинфициране испитанице али да ниво овог цитокина у плазми не корелира са инфекцијом. Подаци из ове студије нам јасно указује на важност Th1 цитокина на месту инфекције (160). У другој студији показано је да испитанице са рекурентном инфекцијом имају знатно виши ниво IFN- $\gamma$  у ендocerвикцу у односу на испитанице са примарном инфекцијом (161). Поред IFN- $\gamma$ , у ендocerвиксу испитаница инфицираних *C. trachomatis* показан је и значајан ниво IL-12 и IL-10 (162). Интересантан је податак из студије Ванга и сарадника која је анализирала узорке ендocerвикалних секрета, прикупљаних сваких 6 месеци код 396 адолесенткиња. У студији је показано да код инфицираних испитаница постоји висок ниво IL-12, али низак ниво IL-2. У додатку, у студији је показано да се код 96 испитаница које су добиле хламидијалну инфекцију између две консекутивне посете, концентрација IL-2 смањује, али се након резолуције хламидијалне инфекције поново повећава код значајног броја испитаница. Насупрот IL-2, концентрација IL-12 се у одговору на нову хламидијалну инфекцију значајно повећава да би се са резолуцијом инфекције смањивала (130).

У студији која је методом проточне цитометрије одређивала фенотип ендocerвикалних ћелија показано је да је CD4+, CD8+ и CD83+ ћелије, чешће присутне код инфицираних испитаница у односу на неинфициране, али да нема разлике у присутности CD19+ позитивних ћелија међу испитаницама (132). Такође у студији која је методом проточне цитометрије процењивала промене у фенотипу ендocerвикалних ћелија код жена у току инфекције *C. trachomatis* и након резолуције укључивањем антибиотске терапије, утврђено је да у току инфекције долази до акумулације

неуτροфила, али и CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита, док након антибиотског третмана долази до значајне редукције Т лимфоцита, посебно месец дана након терапије (51).

*Локални и периферни (системски) одговор антитела на инфекцију C. trachomatis.* Показано је да присуство антитела, углавном IgA класе, обрнуто корелира са количином *C. trachomatis* изоловане у култури ендоцервикалних узорака, док висока стопа серумских IgG антитела није повезана са годинама или са редукованом изолацијом *C. trachomatis* (163). Такође је утврђено да је продукција IFN –  $\gamma$  од стране ПМН леукоцита у одговору на cHSP60 високо повезана са протекцијом од инцидентне хламидијалне инфекције. Са друге стране, присуство ендоцервикалних IgG и IgA антитела како на ЕТ тако и на cHSP60 није повезано са протекцијом од секвела. Такође ни серумска IgG антитела нису асоцирана са смањеним ризиком од инцидентне хламидијалне инфекције (133).

Закључак који се може донети на основу лимитираног броја студија које се односе на системски и локални хуморални имунитет је да антитела како у цервиксу тако и у серуму не корелирају са протективним имунитетом, али су свакако маркер предходне инфекције. Са друге стране, антитела на cHSP60 или висок титар на протеине ЕТ корелирају са секвелама. Главно неразјашњено питање је колико дуго серумска IgG антитела перзистирају након једне епизоде инфекције и да ли би њихов нестанак могао представљати маркер за повећану подложност инфекцији.

*Периферни ћелијски одговор на инфекцију C. trachomatis.* Свега неколико студија је показало и дефинисало постојање МОМР епитопа који се Т лимфоцитима презентују у склопу МНС молекула I и II класе, што јасно указује да у току хламидијалне инфекције долази до акивације како CD4<sup>+</sup>, тако и CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита (164–166).

### 1.3.3. Патогенеза секвела

#### 1.3.3.1. Перзистентна хламидијална инфекција

Као што је већ напоменуто, код жена инфекција *C. trachomatis* у доњем гениталном тракту најчешће протиче асимптоматски (101). У великом броју случајева инфекција се завршава спонтаном резолуцијом након годину дана (102), али у једном проценту оболелих (20 % – 40 %) инфекција се асцедентно шири на горњи генитални тракт, где се развија хронична инфекција са следственим компликацијама (106). Компликације настају због оштећења ткива које је последица хроничне инфламације, а хронична инфламација је последица или честих реинфекција или развоја перзистентне инфекције.

Фактори који утичу на исход инфекције у смислу да ли ће доћи до спонтане резолуције или ће се развити хронична инфламација су са једне стране везани за домаћина, а са друге стране за патогена.

Када говоримо о факторима домаћина ту пре свега мислимо на тип имунског одговора који ће се развити у току гениталне хламидијалне инфекције и од стране домаћина одредити исход инфекције. О типу имунског одговора у току гениталне хламидијалне инфекције, постоје бројне непознанице услед чега неколико хипотеза покушава да објасни имуно–патогенетске механизме ове инфекције.

**Целуларна** хипотеза подразумева да инфламаторни одговор иницирају епителне ћелије инфициране хламидијама (167). Инфициране епителне ћелије продукују проинфламаторне хемокине (CXCL1, CXCL8, CXCL1, GM-CSF) који привлаче леукоците на место инфламације и цитокине (TNF, IL-1, IL-6, IL-12, IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ ) који индукују и појачавају инфламаторни одговор (168). У даљем току медијатори инфламације (citoкини, фактори раста, металопроотеиназе, еластазе, колагеназе, фактори згрушавања крви), које продукују како инфициране епителне ћелије, тако и инфилтришуће имунске ћелије директно индукују оштећење ткива. Услед понављаних инфекција или услед перзистентне инфекције дуготрајна продукција инфламаторних медијатора доводи до целуларне пролиферације, ремоделовања ткива и стварања ожиљка са следственим компликацијама. (169)

**Имунобиолошка** хипотеза указује да на исход инфекције у највећој мери утиче тип специфичног имунског одговора који се развија у контакту са хламидијама (57).

Поларизација у правцу Th1 имунског одговора, уз активацију CD4+ лимфоцита, који продукују IFN- $\gamma$  и активацију макрофага доводи до елиминације узрочника и престанка инфекције (170). Међутим, са друге стране, интензиван Th1 имунски одговор се окривљује и за настанак колатералног оштећења ткива по типу реакције касне преосетљивости у случају перзистентних и поновљених инфекција (171). Хламидијални HSP60 је један од најпотентнијих антигена одговоран за реакцију касне преосетљивости. На анималним моделима је доказано да директана инокулација овог антигена појачава инфламаторни одговор коњуктиве (172). Насупрот томе, активација Т регулаторних ћелија које продукују IL-10 у раној фази инфекције може довести до инхибиције протективног имунског одговора (173). Резултат овог типа имунског одговора је пре свега немогућност елиминације хламидија, са следственим развојом перзистентне инфекције и хроничног инфламаторног оштећења ткива. Још једна могућност је да CD4+ лимфоцити диферентују у правцу Th17 подтипа за који је карактеристична продукција проинфламаторних цитокина, који активирају неутрофиле, али не и продукција IFN- $\gamma$  који је одговоран за активацију макрофага и протективан имунски одговор (174). На тај начин Th17 имунски одговор може проузроковати имуно-патолошку инфламацију уз оштећење ткива, а без активације протективног Th1 имунског одговора одговорног за елиминацију интрацелуларних хламидија (175).

Са друге стране, када говоримо о факторима патогена који утичу на исход инфекције, говоримо о врсти и карактеристикама антигена хламидија на које имунски систем одговара и о механизмима помоћу којих хламидије избегавају имунски одговор.

Имунодоминантни антиген хламидија, који пре свега утиче на исход инфекције је главни протеин спољашње мембране. Постоји мали број студија које указују повезаност појединих гениталних серотипова или *ompA* варијетета са клиничком презентацијом или тежином инфекције. Ипак у једној студији је доказано да је стопа спонтане резолуције најнижа код испитаница инфицираних серотипом B, D и E, а потом и серотиповима H, I, J и K (125). Са друге стране током перзистентне инфекције хламидије заустављају синтезу структурних и функционалних протеина као што је MOMP, али започињу синтезу хламидијалних стрес протеина, cHSP60kDa и cHSP10kDa који представљају главне маркере перзистентне инфекције (176, 177). При томе, доказана је висока корелација анти-cHSP60/cHSP10 антитела у серуму и цервикалном испирку са степеном тубарног оштећења (178).

Када говоримо о механизмима којима хламидије избегавају имунски одговор, оне то чине тако што својим антигенима могу индуковати диференцијацију толерогених,



плазмацитоидних дендритских ћелија (pDC). У даљем току pDC могу довести до активације cHSP60 специфичних IL-10 продукујућих Т регулаторних ћелија (173), које својим супресивним дејством могу довести до инхибиције протективног имунског одговора (Th1) и следственог развоја перзистентне инфекције праћене колатералним оштећењем околног ткива. Предоминација pDC у мукози жена са тубарним фактором инфертилитета је потврђена у неколико студија које су се бавиле овим проблемом (179, 180).

На појаву секвела код неких жена значајно утиче и број инфекција током живота. На појаву реинфекција утичу: сероваријабилност хламидија, природно кратак протективни имунитет и употреба антибиотика која прекида успостављање имунитета услед скраћивања времена трајања инфекције. Многи индиректни докази говоре у прилог овој чињеници. Пре свега, на анималним моделима показано је да је Т ћелијски одговор на поновну инфекцију знатно јачи и бржи и у већој мери повезан са оштећењем ткива и фиброзом него што је то случај са примарном инфекцијом (181). Такође, епидемиолошке студије показују да је кумулативни ризик за настанак секвела директно пропорционалан броју инфекција *C. trachomatis* (182).

На крају, али наравно не најмање битно, развој перзистенције је можда и најзначајнија способност хламидија да избегну имунски одговор. У *in vitro* условима је показано да различити стимулуси (IFN- $\gamma$ , пеницилин, недостатак гвожђа, недостатак хранљивих материја, матурација или диференцијација ћелија домаћина) могу довести до инхибиције репликације ретикуларних тела при чему настају велике, аберантне, нерепликативне, перзистентне интрацелуларне форме хламидија (183). Претпоставка је да Th1 имунски одговор кога карактерише активација CD4<sup>+</sup> лимфоцита и следствена продукција IFN- $\gamma$  инудукује индолеамин-2,3-диоксигеназу, која заузврат доводи до разградње и деплеције целуларног триптофана. Деплеција триптофана доводи или до смрти хламидија или их уводи у перзистентну интрацелуларну форму која остаје вијабилна (184). У даљем току, услед инхибиције репликације и нестанка елементарних тела, имунски и инфламаторни одговор се гасе, ниво IFN- $\gamma$  пада испод ефективних концентрација, а перзистентна форма поново прелази у репликативни облик ретикуларног тела уз настанак елементарних тела што је јак стимулус за поновну активацију инфламације и имунског одговора (185). Ови наизменични циклуси репликације хламидија и активације имунског одговора доводе до перзистентног присуства хламидија у епителу гениталног тракта и настанка хроничне инфламације.

**Сумарно,** за настанак патолошког оштећења репродуктивног тракта током хламидијалне инфекције код жена неопходне су две компоненте: усходна инфекција јајовода и имунопатолошки одговор на инфекцију. Снажан протективни имунски одговор може са једне стране да доведе до брзе резолуције инфекције на нивоу цервикса, и тиме смањи могућности асцендентне инфекције јајовода и последичних компликација. Са друге стране, такав снажан имунски одговор, током перзистентних и понављаних инфекција може имати карактер имунопатолошког одговора на нивоу туба и сматра се у највећој мери одговорним за настанак компликација, а управо то чини суштину имунолошке парадигме патогенезе хламидијалне инфекције. Наиме, претпоставља се да се имунски одговор (Th1) појачава са сваком реинфекцијом или током перзистенције хламидија. У таквој ситуацији, ексцесиван имунски одговор доводи до имунопатолошког оштећења ткива, што за собом повлачи активацију регулаторних механизма (Th2/Tregs/IL-10) који превенирају даље оштећење ткива, али истовремено супримирају имунски одговор, што парадоксално на крају доводи до даље перзистенције хламидија и затварања овог зачараног круга.

## 2. ЦИЉ РАДА

Основни циљ нашег истраживања био је да се утврде имуно–патогенетски механизми који се налазе у основи хламидијалне инфекције тј., да се испитају функционалне и фенотипске карактеристике имунског одговора испитаница са хламидијалном инфекцијом, као и евентуална повезаност ових параметара са нивоом перзистенције хламидијалне инфекције.

С тим у вези, примарни циљеви наше студије били су:

1. Утврђивање присуства *C. trachomatis* у цервикалном брису испитаница.
2. Одређивање титара антитела (IgM, IgA и IgG) специфичних за МOMP и IgG специфичних за cHSP60 у серуму испитаница.
3. Испитивање профила секретованих цитокина (Th1/Th2/Th9/Th17/Th22) у периферној крви испитаница.
4. Утврђивање присуства и фенотипа Т-лимфоцита (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg, IL-10 Treg, TR1, IFN- $\gamma$ /IL-10 Th1), као и присуства и фенотипа дендритичних ћелија (pDC, mDC) у периферној крви испитаница.

## **3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ**

### **3.1. Испитанице**

У истраживање је била укључена група од 117 испитаница. Испитанице су биле узраста од 20 до 40 година. Од 117 испитаница, 20 је чинило контролну групу фертилних жена, у првом триместру трудноће, док је преосталих 97 чинило групу субфертилних испитаница. У групи субфертилних испитаница, 38 пацијенткиња је имала потврђен тубарни фактор инфертилитета, док су групу од 59 пацијенткиња, чиниле пацијенткиње са спонтаним побачајима. Пацијенткиње су у студију укључиване из укупне популације пацијенткиња које су се у периоду од јула месеца 2011 до децембра месеца 2013 лечиле на Гинеколошко–акушерској клиници, Клиничког центра у Крагујевцу. Дијагноза тубарног фактора инфертилитета постављана је хистеросалпингографским или лапароскопским налазом, док је дијагноза спонтаног побачаја постављана клиничким прегледом и ултразвучним налазом. У истраживање је била укључена и контролна група од 20 здравих трудница у првом триместру трудноће.

### **3.2. Методе**

#### **3.2.1. Узимање биолошких узорака**

Узорци серума потребни за квантификацију антитела на хламидијалне антигене и одређивање концентрације цитокина прикупљени су узимањем 5ml периферне крви у епрувету без антикоагуланса и центрифугирањем на 800g, 10 минута на собној температури. Узорци су чувани на  $-20^{\circ}\text{C}$  до извођења теста. Узорци периферне крви (5ml) прикупљени у епрувету са антикоагулансом ( $\text{K}_3\text{EDTA}$ ) коришћени су за фенотипизацију мононуклеарних ћелија.

### 3.2.2. Одређивање серумског нивоа антитела на хламидијалне антигене

Код свих испитаница серумски ниво IgM, IgA и IgG антитела специфичних за MOMP одређиван је помоћу EUROIMMUN комерцијалног ELISA кита (Lubec, Germany). Такође, код свих испитаница, серумски ниво IgG антитела специфичних за хламидијални HSP60 одређиван је помоћу MEDAC комерцијалног ELISA кита (Wedel, Germany).

#### 3.2.2.1. Одређивање серумског нивоа антитела на хламидијални MOMP антиген

Одређивање серумског нивоа IgM, IgA и IgG антитела специфичних за MOMP антиген *C. trachomatis*, вршено је након разређивања узорака у односу 1:101 са дилуционим пуфером за узорке. Сто микролитара тако припремљеног узорка се додаје у микротитрациону плочу чији су бунарчићи обложени пурификованим MOMP антигеном *C. trachomatis*. Плоча се након тога инкубира 30 минута на собној температури (18°C – 25°C), а потом испере три пута са 450 µl пуфера за испирање. Потом се додаје 100 µl ензим коњугата (анти – хумана IgM, IgA или IgG антитела обележена пероксидазом), и плоча се поново инкубира 30 минута на собној температури (18°C – 25°C). Поступак испирања са 450 µl пуфера за испирање се понавља три пута. Након тога се додаје по 100 µl солуције хромогеног субстрата (TMB – tetramethylbenzidine) и плоча се поново инкубира, у мраку, током 15 минута, на собној температури (18°C – 25°C). На крају, реакција се зауставља додавањем по 100 µl стоп солуције. Након тога квантификација антитела се врши мерењем интензитета боје узорака у спектрофотометру употребом филтера од 450nm. Резултати су интерпретирани семиквантитативно, као S/Co вредност, а у складу са препорукама произвођача. S/Co вредност представља количник вредности оптичке густине узорка (S – sample) и вредности граничне (*cut-off*) вредности теста. Узорци су били негативни када је S/Co вредност била < 0.8; гранични кад је S/Co вредност  $\geq 0.8$  до < 1.1; и позитивни када је S/Co вредност  $\geq 1.1$ .

### 3.2.2.2. Одређивање серумског нивоа антитела на хламидијални HSP60 антиген

Одређивање серумског нивоа IgG антитела специфичних за хламидијални стрес протеин од 60 kDa вршено је након разређивања узорака у односу 1:50 са дилуционим пуфером за узорке. Педесет микролитара разблаженог узорка се додаје у микротитрациону плочу чији су бунарчићи обложени рекомбинованим HSP60 антигеном *C. trachomatis*. Након тога следи инкубације узорка на 37°C у трајању од 60 минута. По завршеној инкубацији, бунарчићи микротитрационе плоче се испирају три пута са по 200 µl пуфера за испирање. У бунарчиће микротитрационе плоче се потом додаје по 50 µl ензим коњугата (анти – хумана IgG антитела обележена пероксидазом; HRP – horseradish peroxidase), и плоча се поново инкубира 60 минута на 37°C. Поступак испирања са 200 µl пуфера за испирање се такође понавља три пута. Потом се се додаје по 50 µl раствора хромогеног субстрата (*TMB* – tetramethylbenzidine) и плоча се поново инкубира у мраку, на 37 °C током 30 минута. На крају, додавањем по 100 µl стоп солуције, реакција се зауставља, а квантификација антитела врши се мерењем интензитета боје узорка у спектрофотометру употребом филтера од 450nm. Резултате смо такође интерпретирани семиквантитативно, као S/Co вредност, а у складу са препорукама произвођача. Узорци су били негативни када је S/Co вредност била < 0.9; гранични кад је S/Co вредност > 0.9 до < 1.1; и позитивни када је S/Co вредност  $\geq 1.1$ .

### 3.2.2.3. Анализа серолошког статуса хламидијалне инфекције

Испитанице које су биле IgA и/или IgG позитивне на MOMP антиген, уз истовремену серопозитивност на cHSP60 антиген, дефинисали смо као испитанице са перзистентном хламидијалном инфекцијом. Испитанице које су биле IgA и/или IgG позитивне на MOMP антиген, без истовремене серопозитивност на cHSP60 антиген, дефинисали смо као испитанице са ранијом хламидијалном инфекцијом (серопозитивне). Испитанице које су биле негативне на сва три маркера хламидијалне инфекције, дефинисали смо као испитанице без серолошких доказа хламидијалне инфекције (серонегативне).

### 3.2.3. Мерење концентрације цитокина у серуму испитаника методом проточне цитометрије

#### 3.2.3.1. Принцип извођења теста

За мерење концентрације цитокина у серуму пацијената и здравих испитаника користили смо *FlowCytomix Human Th1/Th2/Th9/Th17/Th22 13plex Kit*, eBioscience (Cat. No. BMS817FF) који омогућава квантитативну детекцију INF- $\gamma$ , IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A, IL-22 и TNF- $\alpha$  методом проточне цитометрије. FlowCytomix детекциони систем се заснива на коришћењу две групе флуоресцентних куглица микроскопске величине (4 $\mu$ m и 5 $\mu$ m), при чему унутар сваке групе постоје подгрупе куглица које се разликују по интензитету флуоресценције. За екситацију флуоресцентне боје може се користити аргонски, хелијум-неон или UV ласер, а емисија се мери на 690nm. Комбинација две величине и више интензитета флуоресценције омогућава разликовање до 20 сетова куглица на једном флуоресцентном каналу. Куглице из сваког сета су обложене антителима специфичним за молекуле које желимо да детектујемо. Мешавина куглица се инкубира са узорцима (серум, крв, супернатанти културе ћелија) и молекули из узорака се везују за специфична антитела на куглицама. Додаје се мешавина секундарних антитела коњугованих са биотином која се специфично везују за молекуле везане антителима за куглице. Додаје се стрептавидин-фикоеритрин који се везује за биотин-коњугат и емитује флуоресцентни сигнал. Јачина флуоресцентног сигнала зависи од количине испитиваног молекула у узорку. FlowCytomix сет садржи и протеине стандарда који омогућавају прављење стандардне криве помоћу које се израчунава количина испитиваног молекула у узорку. Овако формиран систем омогућује брзо и лако мерење већег броја анализата истовремено и из малог узорка (25 $\mu$ l). За обраду резултата користили смо *FlowCytomix Pro 3.0 Software* (eBioscience, Cat. No. BMS8402FF).

#### 3.2.3.2. Поступак извођења теста

Мешавина куглица се припрема тако што се одређена количина сваког сета куглица ресуспендује у дилуционом пуферу (Reagent Dilution Buffer - RDB). Волумен зависи од броја узорака, при чему се узима у обзир и количина потребна за слепу пробу

и стандарде. Суспензија се центрифугира 5 минута на 3000g. Течност се пажљиво уклони, дода се иста количина дилуционог пуфера и вортексује око 5 секунди. За стандардну криву прави се мешавина стандарда у пуферу тако да разблажење сваког у финалној суспензији буде 1:20, а затим се праве серијска разблажења мешавине (укупно 7 разблажења). Мешавина биотин-коњугата (специфична антитета за које је везан биотин) припрема се тако што се одређена количина сваког биотин-коњугата ресуспендује у дилуционом пуферу (волумен зависи од броја узорака) тако да разблажење сваког у финалној суспензији буде 1:20. Стрептавидин-фикоеритрин раствор се прави тако што се концентровани стрептавидин-фикоеритрин разблажи у пуферу. У обележене епрувете се сипа по 25µl мешавине стандарда (епрувете 1-7 за 7 различитих разблажења), пуфера (за слепу пробу), првог разблажења мешавине стандарда (за подешавање проточног цитометра) и узорака. У сваку епрувету, укључујући и слепу пробу, дода се по 25µl припремљене мешавине куглица и 25µl мешавине биотин-коњугата. Узорци се добро промешају и инкубирају 2 сата на собној температури, заштићени од светла. По завршеној инкубацији у сваку епрувету се дода по 1 ml пуфера и центрифугира 5 минута на 200g. Одбаци се супернатант тако да у свакој епрувети остане по 100µl течности, а затим се овај корак понови још једном. Затим се у сваку епрувету сипа по 50µl стрептавидин-фикоеритрин раствора, добро промеша и инкубира 1 сат на собној температури, заштићено од светла. По завршеној инкубацији у сваку епрувету се дода по 1 ml пуфера и центрифугира 5 минута на 200g. Одбаци се супернатант тако да у свакој епрувети остане по 100µl течности, а затим се овај корак понови још једном. На крају се у сваку епрувету сипа по 500µl пуфера и до анализирања на проточном цитометру чува на 2-8°C заштићено од светла, највише 24 сата.



### **3.2.4. Анализа популација моноклеарних ћелија периферне крви методом проточне цитометрије**

Применом проточне цитометрије одредили смо релативну, односно процентуалну заступљеност моноклеарних и полиморфонуклеарних ћелија у периферној крви. Одређивали смо проценат и број Б лимфоцита, различитих субпопулација Т лимфоцита, моноцита и дендритских ћелија. Такође испитиван је и функционални фенотип субпопулација Т лимфоцита и дендритских ћелија. Узорци периферне крви пацијената анализирани су коришћењем проточне цитометрије са пет боја.

#### **3.2.4.1. Бојење мембранских маркера**

Овом методом одређивана је експресија молекула који се експримирају на површини ћелијске мембране и то: CD3, CD4, CD8, CD14, CD19, CD57, CD11c, CD123 и HLA-DR. У те сврхе примењена су моноклонска антитела специфична за ове антигене, коњугована са различитим флуоресцентним бојама (**Табела 1**). Процедура бојења површинских маркера је изведена тако што је у 100  $\mu$ l пуне крви додавана одговарајућа количина коњугованих моноклонских антитела. Ћелије су такође инкубирани и са одговарајућим изотипским контролама. Бојење изотипским контролама помаже да се разграничи специфично од неспецифичног бојења. Затим је пуна крв са антителима краткотрајно вортексована и инкубирана у мраку на +4°C у трајању од 25 минута. Након тога у узорке је додато 400 $\mu$ l PBS-а и узорци су анализирани на проточном цитометру.

<b>Име антитела</b>	<b>Произвођач</b>	<b>Кат.број</b>
Anti-CD3-ECD	Invitrogen	MHCD0417
Anti-CD4-PE	Beckman Coulter	IM0449U
Anti-CD4-ECD	Invitrogen	MHCD0417
Anti-CD8-FITC	Beckman Coulter	IM0451U
Anti-CD19-PC5	Beckman Coulter	IM2470U
Anti-CD19-FITC	Beckman Coulter	IM1284U
Anti-CD14-PC5	Beckman Coulter	IM2640U
Anti-CD14-FITC	Beckman Coulter	IM0645U
Anti-CD57-FITC	Beckman Coulter	IM0466U
Anti-HLA-PE	Beckman Coulter	IM0464U
Anti-FoxP3-APC	eBioscience	17-4777
Anti-FoxP3-FITC	eBioscience	11-4777-42
Anti-CD123-PE-Cy7	eBioscience	25-1239-42
Anti-CD11c-PerCP	R&D Systems	FAB1777C
Anti-HLA DR-ECD	Invitrogen	MHLDR17
IgG1 mouse-FITC	Beckman Coulter	IM0639
IgG1 mouse-PE	Beckman Coulter	IM0670
IgG1 mouse-ECD	Beckman Coulter	IM2714
IgG1 mouse-PC5	Beckman Coulter	IM2663
IgG1 mouse-PC7	Beckman Coulter	737662

**Табела 1.** Панел антитела коришћених за проточну цитометрију

### 3.2.4.2. Интрацелуларно бојење Foxp3 транскрипционог фактора

Први корак у овој процедури је бојење мембранског CD4 маркера: у 100µl суспензије мононуклеарних ћелија ( $2 \times 10^5$ ) изолованих из периферне крви, додаје се 10µl CD4-PE антитела, а затим се суспензија инкубира 25 минута у мраку на +4°C. За фиксацију и пермеабилizацију ћелијске мембране коришћен је пуферски сет (Foxp3-Transcription Factor Staining Buffer Set, eBioscience, Cat. No. 00-5523-00). По завршетку инкубације са CD4-PE антителом додаје се 1ml фиксатора (Fixation/Permeabilisation Buffer), јако вортексује и инкубира 40 минута на собној температури у мраку. Затим се додаје 2ml пермеабилizатора (Permeabilisation Buffer) и центрифугира 5 минута на 400g. Талог се ресуспендује у 100µl пермеабилizатора и, без вортексовања, инкубира 15 минута на собној температури у мраку. Након тога се додаје 5µl Foxp3-FITC антитела, благо вортексује и инкубира 30 минута на собној температури у мраку. По завршетку инкубације ћелије се оперу у 4ml PBS-а. Ћелијски талог се ресуспендује у 400µl PBS-а и анализира на проточном цитометру.

### 3.2.4.3 Очитавање резултата на проточном цитометру

Проточна цитометрија је технологија која мери и анализира карактеристике ћелија приликом њиховог протока кроз апарат. Честице се мере и анализирају у односу на релативну величину, релативну густину и релативни интензитет флуоресценције. У припреми за проточну цитометрију ћелије се инкубирају са једном или више врста флуорохромом обележених антитела која су специфична за мембранске или цитоплазматске молекуле. Детекцијом флуоресценције на појединачним ћелијама у суспензији може се одредити број ћелија које експримирају одређене молекуле, а количина антитела везаних за сваку појединачну ћелију одговара нивоу експресије испитиваног молекула. Резултати се приказују као проценат ћелија за која су се везала специфична, флуорохромом обележена антитела, што нам даје информацију о релативној заступљености појединих ћелијских популација, и/или као интензитет флуоресценције који омогућава процену експресије молекула.

### 3.3. Статистичка анализа

Након укључивања у студију испитанице су разврставане у подгрупе на два начина. На основу клиничког узрока субфертилитета испитанице су сврстане у две групе: пацијенткиње са потврђеним тубарним фактором инфертилитета и пацијенткиње са спонтаним побачајима. Трећу, контролну групу, чинило је 20 здравих трудница у првом триместру трудноће. На основу серолошког статуса хламидијалне инфекције испитанице су подељене у три групе: серонегативне пацијенткиње, серопозитивне пацијенткиње и пацијенткиње са перзистентном инфекцијом. За приказивање категоријских варијабли коришћене су апсолутне вредности и њихова процентуална заступљеност у групама, а разлике у учесталости унутар релевантних подгрупа утврђене су  $\chi^2$  или Фишовим тестом. За представљање континуираних нумеричких вредности, распоређених према типу нормалности, употребљена је средња вредност и стандардна девијација, а значајности разлике између аритметичких средина утврђене су Студентовим Т тестом за независне узорке. Вредности које нису распоређене према типу нормалности представљене су медијаном и интерквартилном разликом, а значајност је одређена непараметријским Вилкоксон или Ман-Витни У тестом. Међусобна повезаност посматраних варијабли и јачина везе испитивана је тестовима линеарне регресије и корелације (одређивањем Пирсон/Спирман коефицијената). Сензитивност и специфичност концентрације анти-хламидијалних антитела у дискриминацији клиничких исхода при различитим границама одлучивања (cut-off) одређиване су применом тзв. ROC анализе. Статистичка значајност одређивана је на нивоу  $p < 0,05$  коришћењем статистичког софтвера SPSS (верзија 19).

## 4. РЕЗУЛТАТИ

### 4.1. Учесталост хламидијалне инфекције у студијској популацији

ЕЛИСА тестом, а према упутствима произвођача, одређивано је присуство анти-хламидијалних антитела у серуму испитаница. Анализирано је присуство серумских IgM, IgA и IgG специфичних за MOMP као и IgG специфичног за хламидијални HSP60kDa. Од укупног броја испитаница које су укључене у студију, групу са субфертилитетом чинило је 97 пацијенткиња, док је контролну групу чинило 20 здравих испитаница. У групи жена са субфертилитетом, утврдили смо висок степен серопозитивности на хламидијалне антигене и то у 54.6% (53/97) случајева, при чему је перзистентна хламидијална инфекција потврђена код 24.7% (24/97), док је ранија инфекција потврђена код 29.9% (29/97) жена. Насупрот испитиваној групи, у контролној групи жена утврдили смо веома низак степен серопозитивности и то само у 5.0% (1/20) случајева, при чему је код те испитанице потврђена перзистентна инфекција. Сходно томе, проценат серонегативних испитаница је био значајно виши у контролној групи жена где је одсуство хламидијалне инфекције утврђено у 95.0% (19/20) испитаница, док је у групи испитаница са субфертилитетом тај број знатно нижи и износи 45.4% (44/97) (Табела 2).

		Субфертилне пацијенткиње n(%) n = 97	Контролна група n(%) n = 20
Перзистентна инфекција IgA- и/или IgG- cHS P60-	IgA-	2	0
	IgG-	9	0
	IgA- и IgG-	13	1
	Укупно са перзистентном инфекцијом (%)	24 (24.7)	1 (5.0)
Ранија инфекција IgA- и/или IgG- cHS P60-	IgA-	4	0
	IgG-	15	0
	IgA- и IgG-	10	0
	Укупно са ранијом инфекцијом (%)	29 (29.9)	0 (0)
	Укупно серопозитивних (%)	53 (54.6)	1 (5.0)
Серонегативне IgA- и/или IgG- cHS P60-	Укупно серонегативних (%)	44 (45.4)	19 (95.0)

Табела 2. Учесталост хламидијалне инфекције у студијској популацији

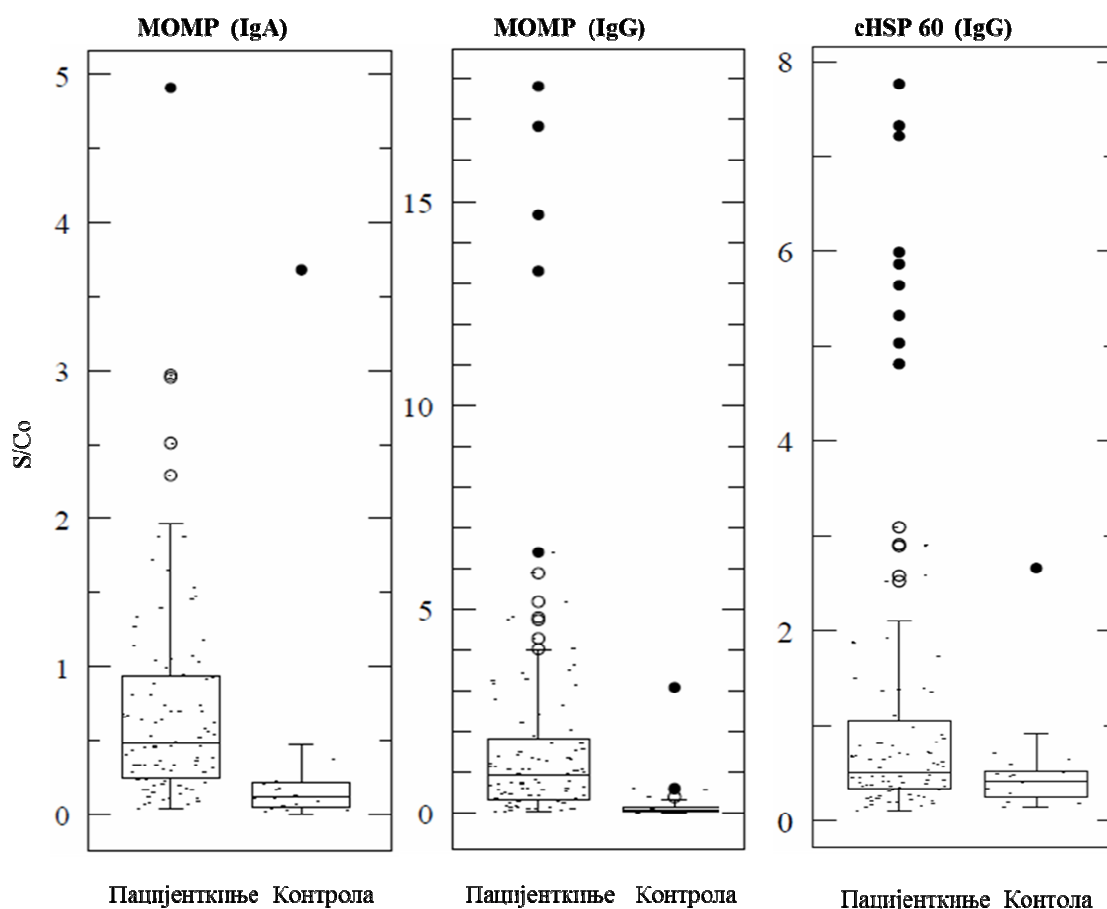
Анализирајући субфертилне пацијенткиње, утврдили смо да је у обе испитиване подгрупе, са тубарним фактором инфертилитета (ТФИ) и спонтаним побачајима (СП), проценат серопозитивних испитаница виши него у групи контролних испитаница. Неочекивано, присуство антитела на хламидијалне антигене смо у већем проценту утврдили код жена са спонтаним побачајима (61.0%; 36/59), док је тај број био нижи у групи жена са тубарним фактором инфертилитета (44.7%; 17/38). Сходно томе, проценат серонегативних жена био је виши у групи испитаница са тубарним фактором инфертилитета (55.3%; 21/38) него код испитаница са спонтаним побачајима (39.0%; 23/59). Међутим, када у испитиваним групама упоредимо учесталост перзистентне или раније инфекције, јасно је уочљиво да је перзистентна инфекција значајно чешћа у групи жена са тубарним фактором инфертилитета него у групи жена са спонтаним побачајима (ТФИ: 36.8% vs. СП: 16.9%). У прилог овом налазу говори и чињеница да је IgA серопозитивност као маркер активне инфекције, чешћа у групи жена са перзистентном хламидијаном инфекцијом и ТФИ (85.7%; 12/14) у односу на исту групу жена са спонтаним побачајима (30.0%; 3/10). Са друге стране, серолошки докази раније инфекције су знатно чешће били присутни у групи жена са спонтаним побачајима (44.1%; 26/59), него у групи жена са ТФИ (7.9%; 3/38) (**Табела 3**).

		Тубарни фактор инфертилитета n (%) n = 38	Спонтани побачаји n (%) n = 59
Перзистентна инфекција IgA+ и/или IgG+; cHSP60+	IgA+	1	1
	IgG+	2	7
	IgA+ и IgG+	11	2
	<b>Укупно са перзистентном инфекцијом (%)</b>	<b>14 (36.8)</b>	<b>10 (16.9)</b>
Ранија инфекција IgA+ и/или IgG+; cHSP60-	IgA+	0	4
	IgG+	1	14
	IgA+ и IgG+	2	8
	<b>Укупно са ранијом инфекцијом (%)</b>	<b>3 (7.9)</b>	<b>26 (44.1)</b>
	<b>Укупно серопозитивних (%)</b>	<b>17 (44.7)</b>	<b>36 (61.0)</b>
Серонегативне IgA- и/или IgG-; cHSP60-	<b>Укупно серонегативних (%)</b>	<b>21 (55.3)</b>	<b>23 (39.0)</b>

**Табела 3.** Учесталост хламидијалне инфекције у групи субфертилних испитаница

## 4.2. Серумски ниво анти–хламидијалних антитела у студијској популацији

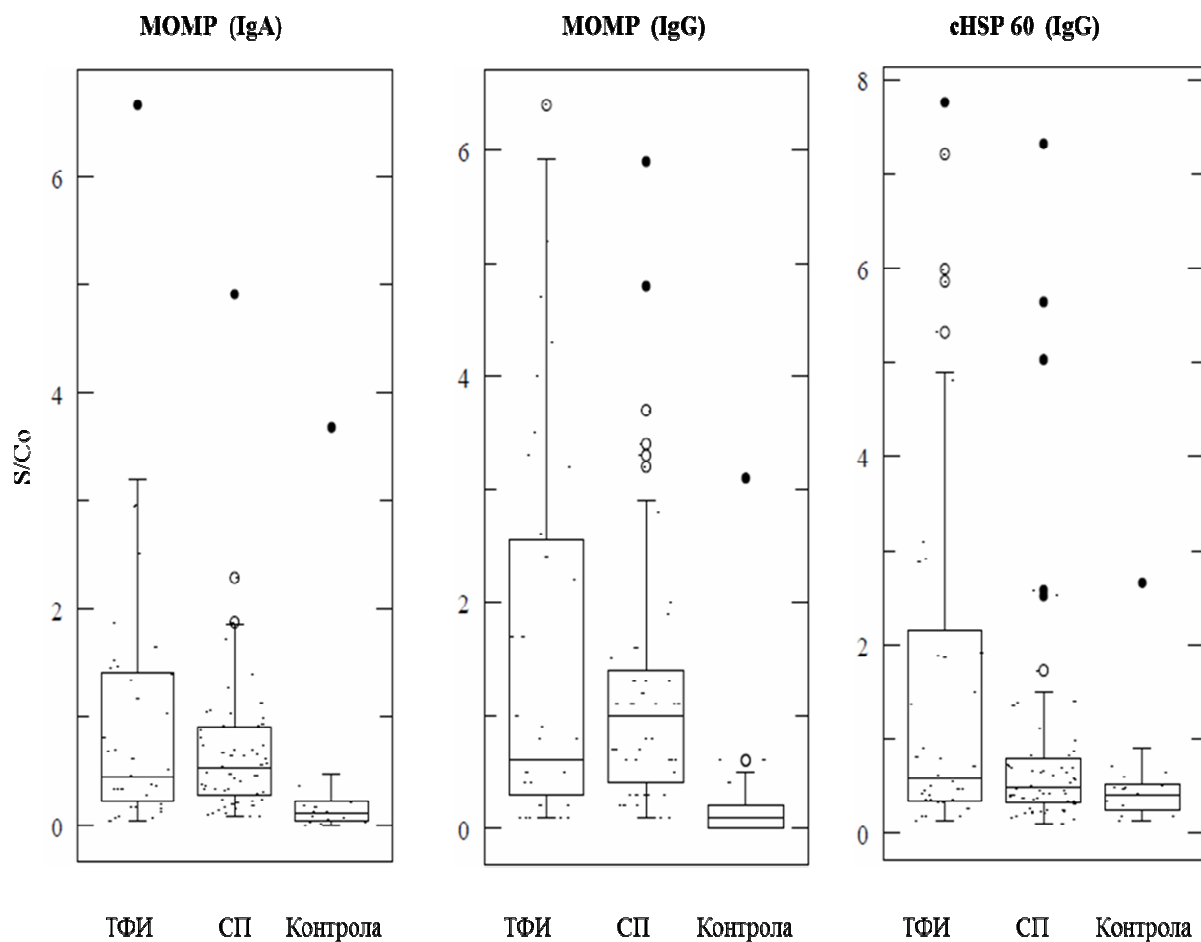
Упоредјујући интензитет серолошког одговора на хламидијалну инфекцију, утврдили смо да је серумски ниво свих детектованих антитела значајно виши у групи жена са субфертилитетом у односу на контролну групу жена. Тако је серумски ниво IgA на хламидијалне MOMP антигене значајно виши у групи субфертилних жена (медијана S/Co: 0.49; интервал: 0.04 – 11.66) у односу на контролну групу (медијана S/Co: 0.12; интервал: 0.00 – 3.68). Такође, показали смо да је серумски ниво IgG на хламидијални MOMP антиген значајно виши у групи жена са субфертилитетом (медијана S/Co: 0.93; интервал: 0.05 – 17.82) него у контролној групи (медијана S/Co: 0.06; интервал: 0.00 – 3.08). На крају, утврдили смо да је и серумски ниво IgG на cHSP60 у групи субфертилних пацијенткиња (медијана S/Co: 0.50; интервал: 0.10 – 7.76) виши у односу на контролну групу (медијана S/Co: 0.41; ранг: 0.14 – 2.66) (Графикон 1)



**Графикон 1.** Серумски ниво анти–MOMP (IgA и IgG) и анти–cHSP60 (IgG) антитела у групи пацијенткиња са субфертилитетом и контролној групи

Анализа интензитета серолошког одговора на хламидијалну инфекцију је показала, да је серумски ниво свих детектованих антитела, у односу на контролну групу жена, значајно виши у групи жена са ТФИ и СП, при чему није показана статистички значајна разлика између жена са ТФИ и СП. Наиме, највиши ниво серумског IgA на хламидијални МOMP антиген је забележен у групи пацијенткиња са спонтаним побачајима (медијана S/Co: 0.53; интервал: 0.08 – 4.91) и тубарним фактором инфертилитета (медијана S/Co: 0.46; интервал: 0.04 – 11.66), док је у контролној групи ниво серумског IgA био значајно нижи (медијана S/Co: 0.12; ранг или интервал: 0.00 – 3.68). Слично, серумски ниво IgG специфичног за хламидијални МOMP антиген је, у поређењу са контролном групом жена (медијана S/Co: 0.06 интервал 0.00 – 3.08), био значајно виши, како у групи пацијенткиња са тубарним фактором инфертилитета (медијана S/Co: 0.69 интервал 0.05 – 17.82), тако и у групи испитаница са спонтаним побачајима (медијана S/Co: 1.04 интервал 0.05 – 14.67) код којих су забележене највеће вредности. Сличне резултате смо добили анализом серумског нивоа IgG на cHSP60 антиген који је такође био значајно виши у групи субфертилних пацијенткиња, при чему су највеће вредности забележене код испитаница са тубарним фактором инфертилитета (медијана S/Co: 0.59 интервал 0.14 – 7.76) и спонтаним побачајима (медијана S/Co: 0.48 интервал 0.10 – 7.32), а најниже у контролној групи (медијана S/Co: 0.41 интервал 0.14 - 2.66) (**Графикон 2**).



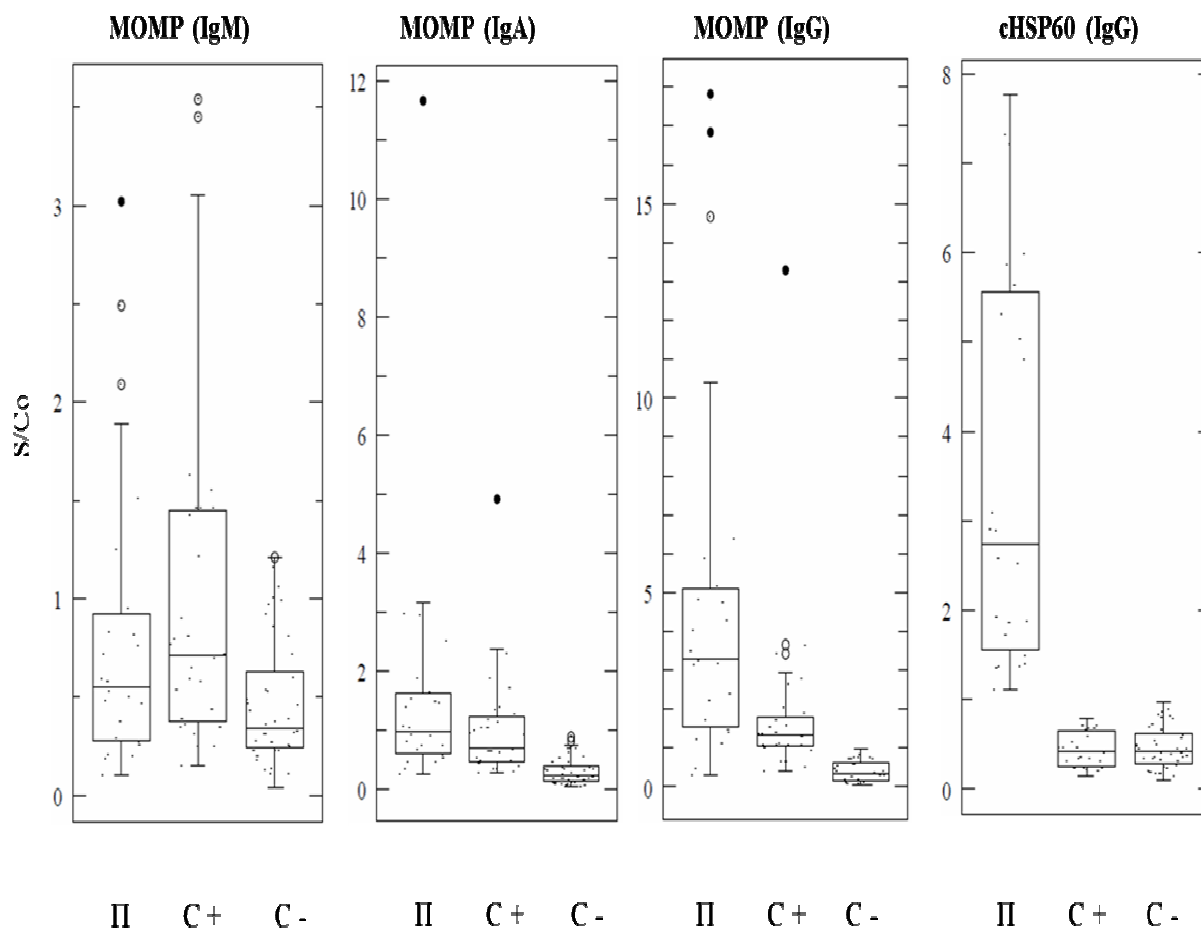


**Графикон 2.** Серумски ниво анти–MOMP (IgA и IgG) и анти–cHSP60 (IgG) антитела у групи пацијенткиња са тубарним фактором инфертилитета (ТФИ), спонтаним побачајима (СП) и контролној групи

### 4.3. Серумски ниво анти–хламидијалних антитела код субфертилних пацијенткиња са различитим статусом хламидијалне инфекције

Обзиром на висок ниво анти–хламидијалних антитела код субфертилних пацијенткиња, као и високу учесталост хламидијалне инфекције у овој групи испитаница, у даљем току смо поредили интензитет серолошког одговора на хламидијалну инфекцију између серогрупа пацијенткиња са субфертилитетом, дефинисаним на начин који је детаљно описан у поглављу материјал и методе. Утврдили смо да је серумски ниво свих детектованих антитела, изузев IgM на хламидијални МOMP антиген, значајно виши у групи пацијенткиња са перзистентном хламидијалном инфекцијом него у групи серонегативних и пацијенткиња са ранијом хламидијалном инфекцијом.

Резултати наше анализе су показали да је серумски ниво IgM на хламидијални МOMP антиген виши у групи серопозитивних жена са ранијом хламидијалном инфекцијом (медијана S/Co: 0.71 интервал 0.15 – 3.54) и то како у односу на пацијенткиње са перзистентном инфекцијом (медијана S/Co: 0.55 интервал 0.10 – 3.02), тако и у односу на серонегативне испитанице (медијана S/Co: 0.34 интервал 0.04 – 1.21). Насупрот томе, серумски ниво IgA на хламидијални МOMP антиген је био највиши у серуму пацијенткиња са перзистентном инфекцијом (медијана S/Co: 0.98 интервал 0.24 – 11.66), док су те вредности биле ниже у групи серопозитивних испитаница са ранијом хламидијалном инфекцијом (медијана S/Co: 0.70 интервал 0.28 – 4.91), а најнижи ниво ових антитела је детектован код серонегативних пацијенткиња без серолошких доказа хламидијалне инфекције (медијана S/Co: 0.24 интервал 0.04 – 0.88). Слично томе, и серумски ниво IgG специфичних за хламидијални МOMP антиген је, у односу на серопозитивне пацијенткиње са ранијом хламидијалном инфекцијом (медијана S/Co: 1.32 интервал 0.41 – 13.29), а поготову у односу на серонегативне испитанице (медијана S/Co: 0.33 интервал 0.05 – 0.97), био значајно виши у групи испитаница са перзистентном инфекцијом (медијана S/Co: 3.27 интервал 0.29 – 17.82). Очекивано, највиши ниво серумског IgG на хламидијални HSP60 антиген забележен је у групи испитаница са перзистенцијом (медијана S/Co: 2.74 интервал 1.11 - 7.76), док су те вредности у у групи серонегативних (медијана S/Co: 0.42 интервал 0.10 – 0.98) и серопозитивних пацијенткиња са ранијом инфекцијом (медијана S/Co: 0.43 интервал 0.15 – 0.79) биле значајно ниже (**Графикон 3**).

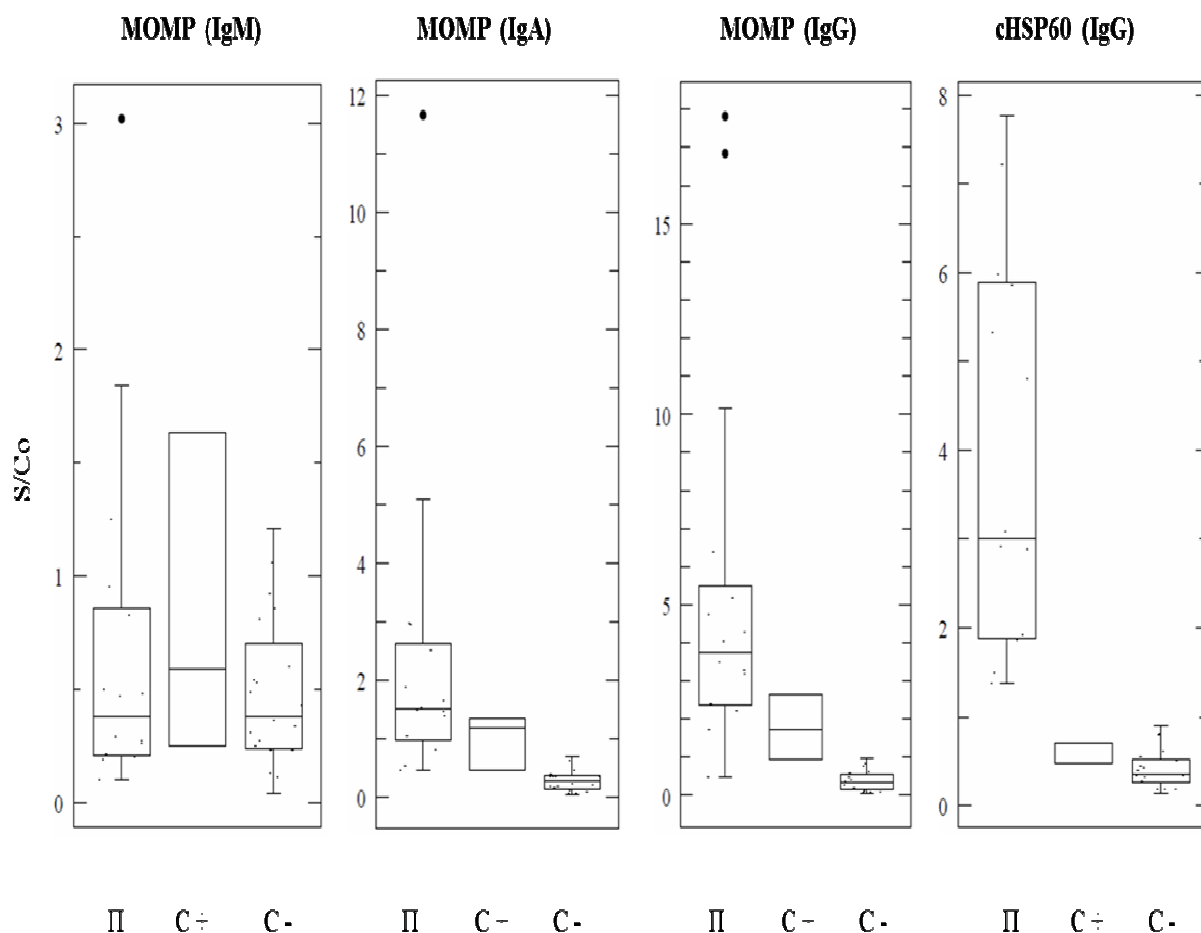


**Графикон 3.** Серумски ниво анти–MOMP (IgM, IgA и IgG) и анти–cHSP60 (IgG) антитела код серопозитивних пацијенткиња са перзистентном (П) или ранијом (C+) инфекцијом и серонегативних пацијенткиња (C-)

#### 4.4. Серумски ниво анти–хламидијалних антитела код пацијенткиња са тубарним фактором инфертилитета

Након што смо из групе пацијенткиња са субфертилитетом издвојили пацијенткиње са тубарним фактором инфертилитета и упоредили интензитет серолошког одговора на хламидијалну инфекцију међу дефинисаним серогрупама, констатовали смо да ниво антитела у серуму има исти тренд као и цела испитивана група.

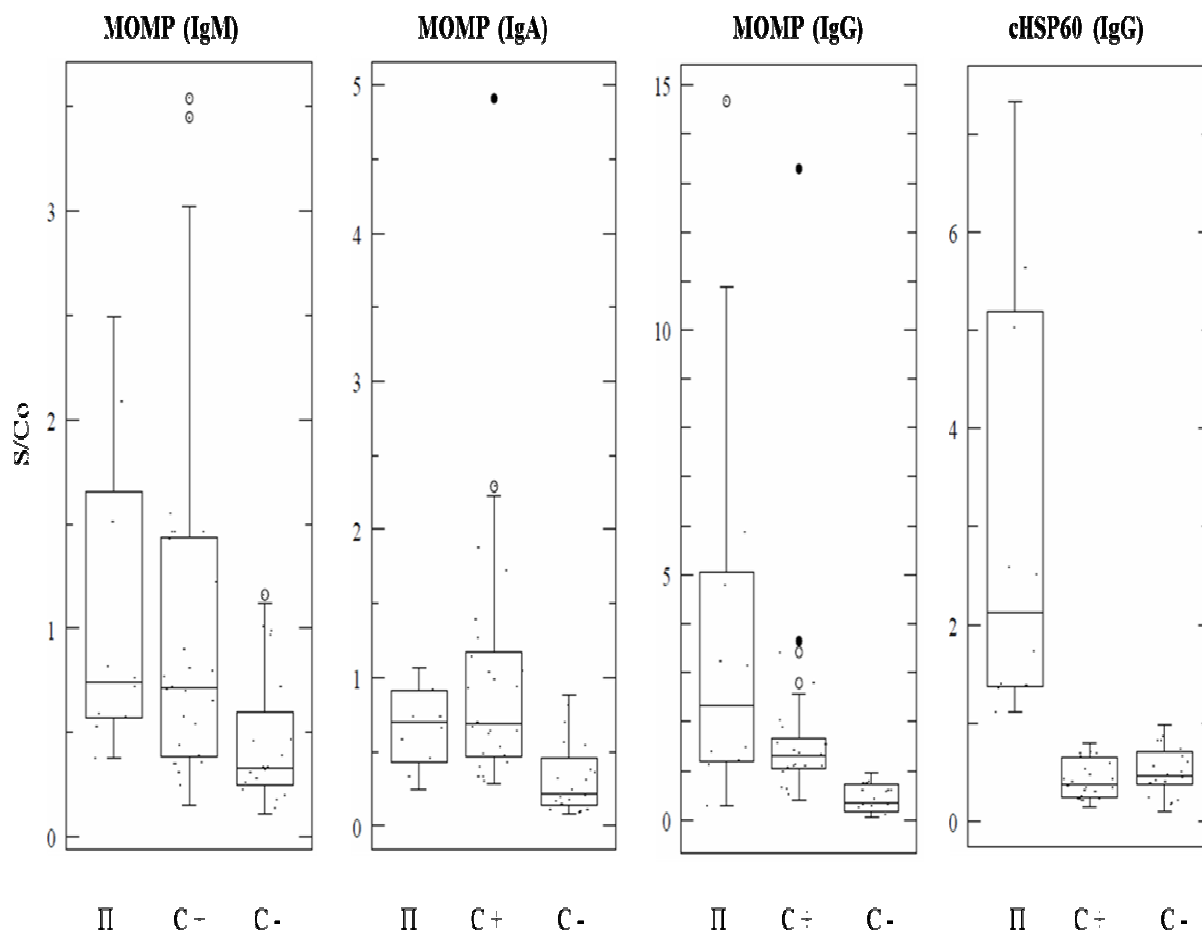
И у овом случају, серумски ниво IgM на хламидијални МOMP антиген је био највиши код серопозитивних пацијенткиња са ранијом хламидијалном инфекцијом (медијана S/Co: 0.59 интервал 0.25 – 1.63), док су те вредности биле ниже код испитаница са перзистентном инфекцијом (медијана S/Co: 0.38 интервал 0.10 – 3.02) и серонегативних пацијенткиња (медијана S/Co: 0.38 интервал 0.04 – 1.21). Супротно серумском нивоу IgM, највиши ниво IgA на хламидијални МOMP протеин смо забележили у серуму пацијенткиња са перзистентном инфекцијом (медијана S/Co: 1.50 интервал 0.45 – 11.66), нешто нижи у групи серопозитивних пацијенткиња са ранијом хламидијалном инфекцијом (медијана S/Co: 1.18 ранг или интервал 0.46 – 1.34) и најнижи у групи серонегативних пацијенткиња (медијана S/Co: 0.28 ранг или интервал 0.04 – 0.70). Разлике у нивоу серумског анти-МOMP IgG између дефинисаних серогрупа су још више изражене, па је тако ниво ових антитела био више од два пута већи у серуму испитаница са перзистентном инфекцијом (медијана S/Co: 3.76 ранг или интервал 0.47 – 17.82) него у серуму серопозитивних испитаница са ранијом инфекцијом (медијана S/Co: 1.72 интервал 0.93 – 2.64), а више од десет пута више у односу на групу серонегативних испитаница (медијана S/Co: 0.33 интервал 0.05 – 0.96). Очекивано, вредности серумског IgG на cHSP60 су биле јако високе у групи пацијенткиња са перзистентном инфекцијом (медијана S/Co: 3.00 интервал 1.37 - 7.76), док су те вредности биле значајно ниже код серопозитивних пацијенткиња са ранијом инфекцијом (медијана S/Co: 0.47 интервал 0.47 – 0.71) и серонегативних пацијенткиња (медијана S/Co: 0.36 интервал 0.14 – 0.90) (**Графикон 4**).



**Графикон 4.** Серумски ниво анти–MOMP (IgM, IgA и IgG) и анти–cHSP60 (IgG) антитела код серопозитивних пацијенткиња са перзистентном (П) или ранијом (C+) инфекцијом и серонегативних пацијенткиња (C-) са тубарним фактором инфертилитета.

#### 4.5. Серумски ниво анти–хламидијалних антитела код пацијенткиња са спонтаним побачајима

Насупрот резултатима добијеним у групи испитаница са ТФИ, констатовали смо да ниво антитела код пацијенткиња са спонтаним побачајима има нешто другачији тренд. Наиме, код пацијенткиња са спонтаним побачајима нема разлике у нивоу IgM на хламидијални МOMP антиген између серогрупе испитаница са перзистентном инфекцијом (медијана S/Co: 0.74 интервал 0.38 – 2.49) и серогрупе са ранијом хламидијалном инфекцијом (медијана S/Co: 0.72 интервал 0.15 – 3.54), али је разлика у односу на серонегативну групу жена јасно изражена (медијана S/Co: 0.33 интервал 0.11 – 1.16). Исти тренд је показан и за серумски ниво IgA, тако да нема разлике између испитаница са перзистентном инфекцијом (медијана S/Co: 0.70 интервал 0.24 – 1.07) и ранијом инфекцијом (медијана S/Co: 0.69 интервал 0.28 – 4.91), док обе групе имају виши ниво IgA у односу на групу серонегативних пацијенткиња (медијана S/Co: 0.22 интервал 0.08 – 0.88). Са друге стране, серумски ниво IgG на хламидијални МOMP антиген је, као и у групи испитаница са ТФИ, био значајно виши у серуму пацијенткиња са перзистентном инфекцијом (медијана S/Co: 2.32 интервал 0.29 – 14.67), готово два пута нижи код серопозитивних пацијенткиња са ранијом хламидијалном инфекцијом (медијана S/Co: 1.31 интервал 0.41 – 13.29) и најнижи у односу на серонегативне испитанице (медијана S/Co: 0.33 интервал 0.05 – 0.97). Очекивано, највиши ниво IgG на хламидијални HSP60, забележили смо код пацијенткиња са перзистентном инфекцијом (медијана S/Co: 2.13 интервал 1.11 – 7.32), док је ниво ових антитела код серопозитивних испитаница са ранијом инфекцијом (медијана S/Co: 0.38 интервал 0.15 – 0.79) и серонегативних испитаница (медијана S/Co: 0.46 интервал 0.10 – 0.98) био значајно нижи (**Графикон 5**).



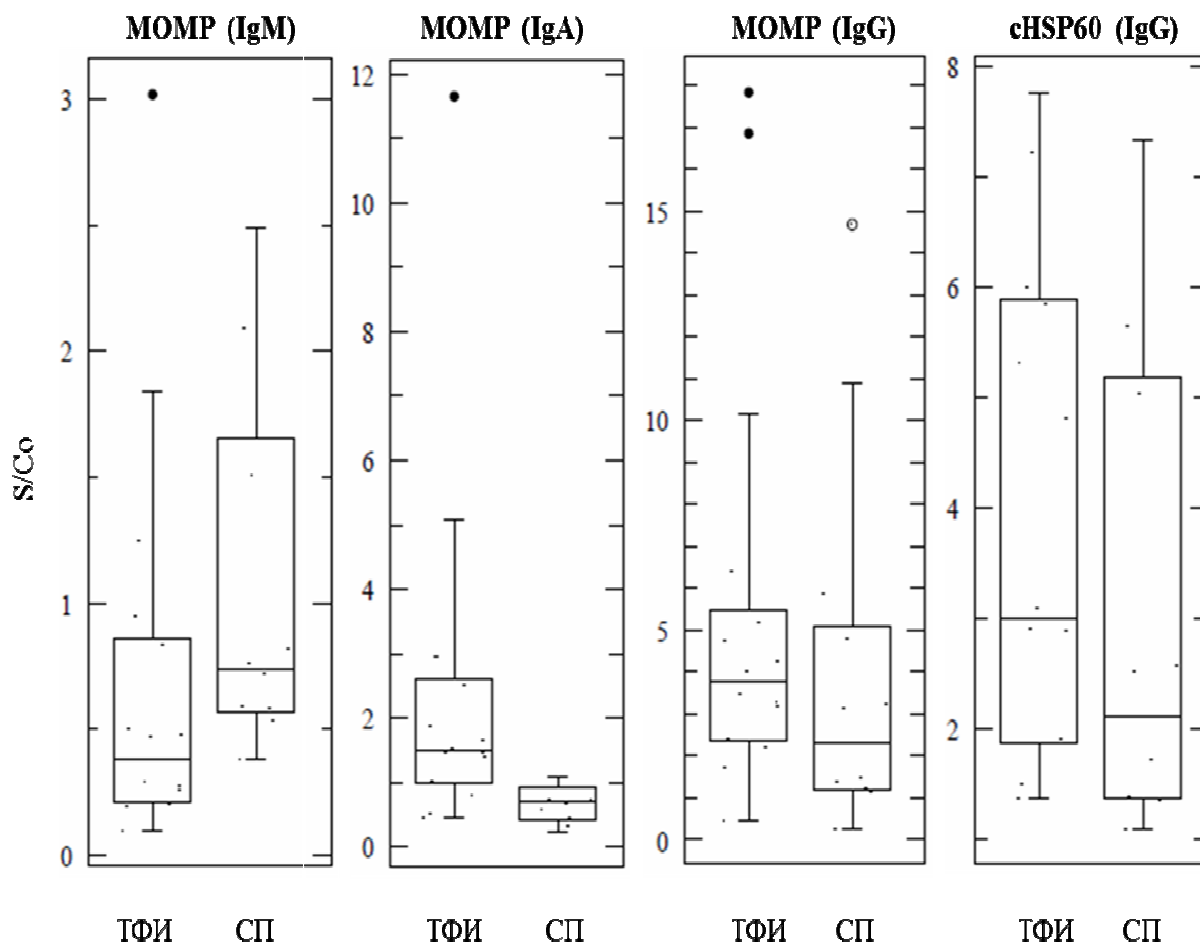
**Графикон 5.** Серумски ниво анти–MOMP (IgM, IgA и IgG) и анти–cHSP60 (IgG) антитела код серопозитивних пацијенткиња са перзистентном (П) или ранијом (С+) инфекцијом и серонегативних пацијенткиња (С-) са спонтаним побачајима.

#### **4.6. Серумски ниво анти–хламидијалних антитела код субфертилних пацијенткиња са перзистентном инфекцијом**

Предходни резултати јасно указују да је перзистентна хламидијална инфекција одговорна за висок ниво антихламидијалних антитела у групи субфертилних жена. Ипак, поређењем нивоа детектованих антитела код испитаница са перзистентном инфекцијом, уочава се јасна разлика између пацијенткиња са тубарним фактором инфертилитета и спонтаним побачајима .

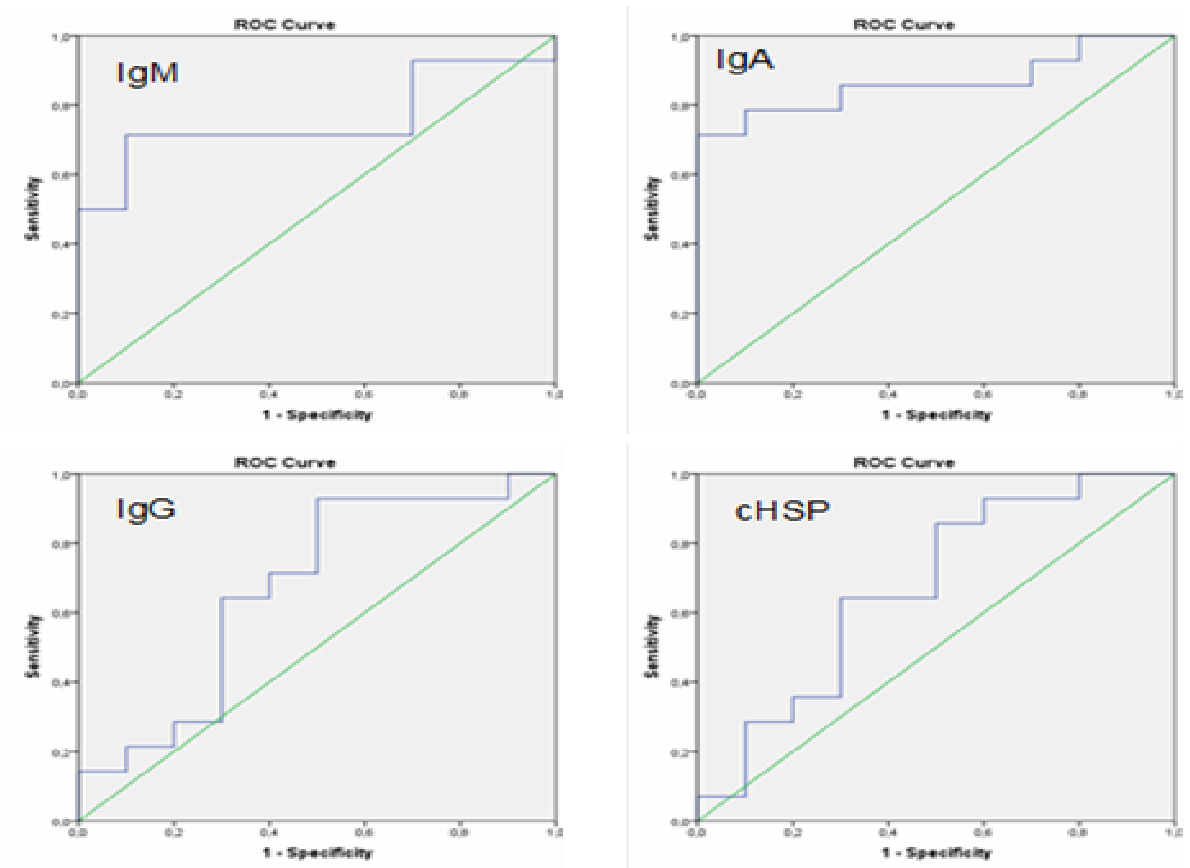
Насупрот осталим антителима, серумски ниво IgM је значајно виши у серуму пацијенткиња са спонтаним побачајима (медијана S/Co: 0.74 интервал 0.38 – 2.49), него код пацијенткиња са тубарним фактором инфертилитета (медијана S/Co: 0.38 интервал 0.10 – 3.02). Са друге стране, субфертилне жене са тубарним фактором инфертилитета (медијана S/Co: 1.50 интервал 0.45 - 11.66) има значајно повишен ниво IgA на MOMP антиген у односу на групу жена са спонтаним побачајима (медијана S/Co: 0.70 интервал 0.24 – 1.07). Такође, у поређењу са пацијенткињама са спонтаним побачајима (медијана S/Co: 2.32 ранг или интервал 0.29 – 14.67), пацијенткиње из групе са тубарним фактором инфертилитета (медијана S/Co: 3.76 ранг или интервал 0.47 – 17.82) имају повишен ниво IgG на хламидијални MOMP протеин. На послетку, веома је значајан податак да је и серумски ниво IgG на хламидијални HSP60 виши у серуму пацијенткиња са тубарним фактором инфертилитета (медијана S/Co: 3.00 ранг или интервал 1.37 – 7.76), у односу на пацијенткиње са спонтаним побачајима (медијана S/Co: 2.13 ранг или интервал 1.11 – 7.32) (**Графикон 6**).





**Графикон 6.** Серумски ниво анти-MOMP (IgM, IgA и IgG) и анти-cHSP60 (IgG) антитела код субфертилних пацијенткиња са перзистентном инфекцијом.

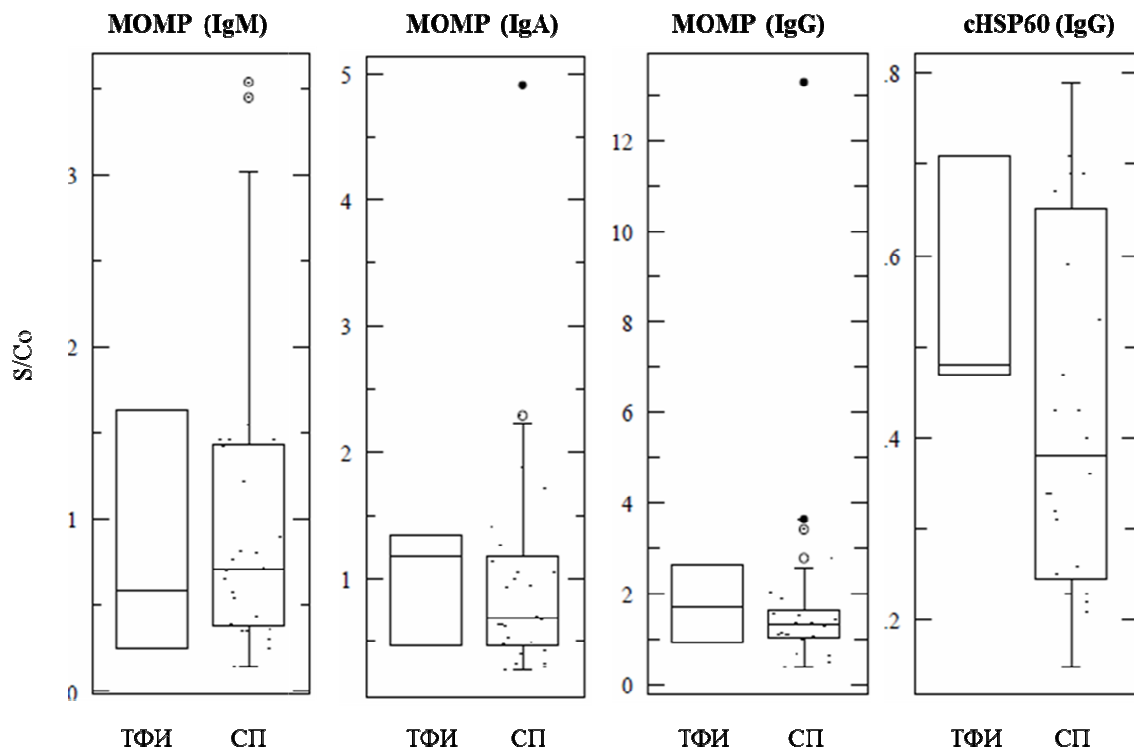
Сличне резултате смо добили када смо добијене податке упоредили користећи ROC анализу. Потврдили смо да је код пацијенткиња са перзистентном инфекцијом серумски ниво IgM значајно виши код пацијенткиња са спонтаним побачајима у поређењу са пацијенткињама са тубарним фактором инфертилитета. На основу дефинисане *cut – off* вредност ( $S/Co = 0.5150$ ) овим тестом је могуће разликовати субфертилне пацијенткиње са перзистентном инфекцијом и тубарним фактором инфертилитета од субфертилних пацијенткиња са перзистентном инфекцијом и спонтаним побачајима, при чему сензитивност износи 71, 4%, а специфичност 90% ( $p=0.035$ ;  $AUC = 0.757$ ). ROC анализа је, са друге стране, потврдила да је серумски ниво IgA антитела значајно виши код пацијенткиња са перзистентном инфекцијом које имају тубарни фактор инфертилитета. На основу карактеристика ROC криве и дефинисане *cut – off* вредности ( $S/Co = 0.9750$ ), показали смо да је на основу серумског нивоа IgA, уз високу сензитивност (78, 6%) и специфичност (90%) теста, могуће диферентовати пацијенткиње са перзистентном инфекцијом и ТФИ од пацијенткиње са перзистентном инфекцијом и СП ( $p = 0.003$ ,  $AUC = 0.864$ ). Истом методом смо показали да се на основу серумских вредности IgG ( $p = 0.160$ ,  $AUC 0.671$ ) и cHSP60 ( $p = 0.165$ ,  $AUC 0.670$ ) не могу разликовати подгрупе субфертилних пацијенткиња са перзистентном инфекцијом. Поредећи карактеристике ROC крива за серумски IgA и IgM, утврдили смо да је серумски ниво IgA супериоран у диференцијацији подгрупа субфертилних пацијенткиња са перзистентном инфекцијом. Наиме, користећи програм MedCalc 13.1 (MedCalc Software, Ostend, Belgium), показали смо да је AUC за вредности серумског IgA статистички значајно већа у односу на AUC за серумски IgM. Поред тога, серумски IgA уз исту специфичност, показује значајно вишу сензитивност у детекцији пацијенткиња са перзистентном инфекцијом и тубарним фактором инфертилитета (Графикон 7).



**Графикон 7.** ROC анализа серумског нивоа IgM, IgA и IgG на MOMP антиген и IgG на cHSP60 код субфертилних пацијенткиња са перзистентном инфекцијом

#### **4.7. Серумски ниво анти–хламидијалних антитела код субфертилних пацијенткиња са ранијом инфекцијом**

Слично налазу код пацијенткиња са перзистентном инфекцијом, анализа серумског нивоа анти–хламидијалних антитела код серопозитивних пацијенткиња са ранијом хламидијаном инфекцијом је показала да је ниво свих антитела, изузев IgM, виши у групи пацијенткиња са ТФИ у односу на СП групу, при чему су разлике између група мање изражене. Тако је серумски ниво IgM незнатно виши у пацијенткиња са спонтаним побачајима него код пацијенткиња са ТФИ (медијана S/Co: 0.72 интервал 0.15 - 3.54 vs медијана S/Co: 0.59 интервал 0.25 – 1.63). Насупрот томе, у односу на пацијенткиње са спонтаним побачајима, ниво IgA антитела је био значајно виши у групи испитаница са ТФИ (медијана S/Co: 1.18 интервал 0.46 - 1.34 vs медијана S/Co: 0.69 интервал 0.28 – 4.91). Такође у поређењу са пацијенткињама са спонтаним побачајима, пацијенткиње ТФИ групе имају повишен ниво IgG на МОМР протеин (медијана S/Co: 1.31 интервал 0.41 - 13.29 vs медијана S/Co: 1.72 интервал 0.93 – 2.64). и серумски ниво IgG на сHSP60 (медијана S/Co: 0.47 интервал 0.47 - 0.71 vs медијана S/Co: 0.38 интервал 0.15 – 0.79). Ипак, забележене разлике не достижу статистичку значајност неопходну за диференцијацију ТФИ и СП подгрупа субфертилних пацијенткиња са ранијом хламидијаном инфекцијом (**Графикон 8**).



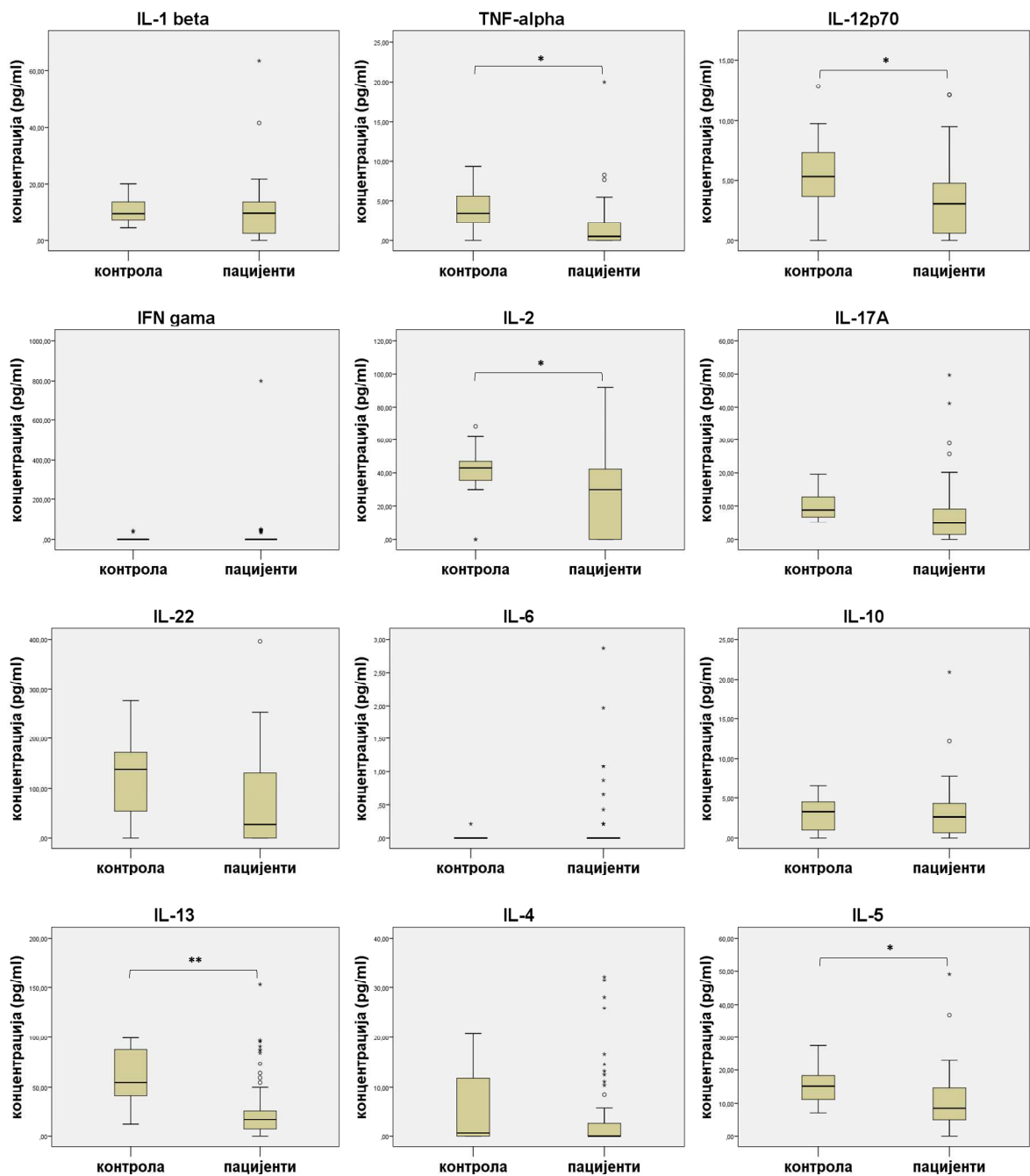
**Графикон 8.** Серумски ниво анти-MOMP (IgM, IgA и IgG) и анти-cHSP60 (IgG) антитела код субфертилних пацијенткиња са ранијом инфекцијом.

#### 4.8. Серумски ниво цитокина у студијској популацији

Методом проточне цитометрије, у студијској популацији жена, коју чине субфертилне испитанице и контролна група, одређивали смо серумску концентарцију Th1/Th2/Th17/Th9 цитокина. Испитујући ниво цитокинског одговора утврдили смо, да постоји разлика у концентрацији цитокина између субфертилних пацијенткиња и контролне групе. Упоштено говорећи, утврдили смо да су вредности испитиваних цитокина углавном више у групи контролних испитаница, изузев вредности IL-1 који је виши у групи субфертилних испитаница. Вредности серумског нивоа IL-9 су у највећем броју узорака биле испод границе осетљивости методе, те овај цитокин у даљем исраживању нисмо разматрали.

Измерене вредности серумске концентрације IL-1 показују нешто виши ниво код субфертилних испитаница, мада за утврђене вредности нисмо показали статистичку значајност (П: медијана 9.73; интервал: 0.00 – 63.39; К: медијана 9.56; интервал: 4.38 – 20.07 ) ( $p > 0.05$ ). Насупрот IL-1, ниво TNF- $\alpha$  је виши у контролној групи жена у поређењу са субфертилним пацијенткињама. Вредности TNF- $\alpha$  у контролној групи (медијана 3.44; интервал: 0.00 – 9.37) су чак шест пута веће него у групи субфертилних жена (медијана 0.50; интервал: 0.00 – 20.01) ( $p < 0.018$ ). Такође смо показали, да је серумски ниво IL-12 виши у контролној групи жена (медијана 5.31; интервал: 0.00 – 12.83). За утврђене вредности смо показали статистичку значајност ( $p < 0.013$ ), са тим што разлика у односу на субфертилне пацијенткиње (медијана 3.06; интервал: 0.00 – 12.13) није била изражена као код нивоа TNF- $\alpha$ . Сличан резултат смо добили упоређујући ниво IL-2. Серумски ниво IL-2 је значајно виши у контролној групи (медијана 42.95; интервал: 0.00 – 68.15) насупрот субфертилној групи пацијенткиња (медијана 30.05; интервал: 0.00 – 91.81) ( $p < 0.014$ ). Нивои IL-17 и IL-22 из групе Th17 цитокина, у контролној групи жена имају више вредности у односу на субфертилне жене. Вредности за IL-17 су у контролној групи жена (медијана 8.85; интервал: 5.18 – 19.60) незнатно повишене у поређењу са субфертилним испитаницама (медијана 5.18; интервал: 0.00 – 316.80), док су насупрот вредности за IL-22 пет пута мање код субфертилних испитаница (медијана 27.03; интервал: 0.00 – 396.29) у односу на контролну групу (медијана 137.83; интервал: 0.00 – 277.30). Интересантно је да ни у једном случају није показана статистички значајна разлика. Анализом вредности концентрације IL-10 у серуму испитиваних група, констатовали смо да вредности код

жена контролне групе (медијана 3.34; интервал: 0.00 – 6.58) нису значајно повишене у односу на испитанице субфертилне групе (медијана 2.71; интервал: 0.00 – 20.91). Са друге стране, ниво IL-13 показује статистички значајну разлику ( $p < 0.001$ ) упоређујући контролну групу (медијана 54.50; интервал: 11.88 – 99.19) са субфертилним испитаницама (медијана 16.84; интервал: 0.00 – 152.87). Слично, у серуму испитиваних група упоређујући серумски ниво IL-5 показали смо, да забележене вредности у разлици међу групама достижу статистичку значајност (П: медијана 8.55; интервал: 0.00 – 27.44 К: медијана 15.33; интервал: 0.00 – 49.11) ( $p < 0.027$ ). На концу, измерене вредности серумских нивоа за IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-4 и IL-9 не показују разлику између испитиваних група (**Графикон 9**).



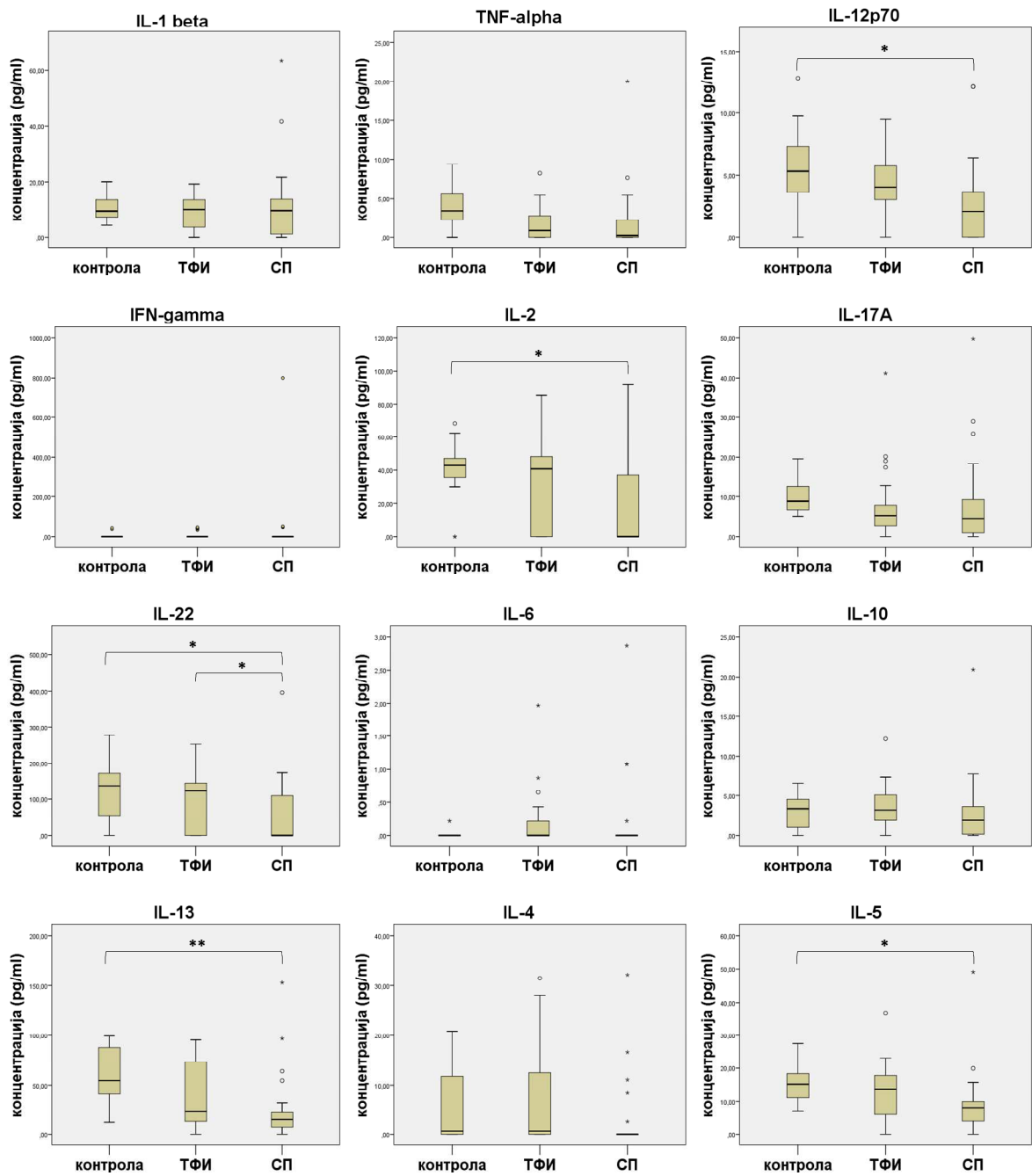
**Графикон 9.** Серумски ниво Th1/Th2/Th17 у групи пацијенткиња са субфертилитетом и контролној групи



Обзиром на утврђену разлику у нивоу цитокина између субфертилних пацијенткиња и контролне групе, у даљем току смо анализирали субфертилне пацијенткиње, делећи их на групу испитаница са тубарним фактором инфертилитета (ТФИ) и испитанице са спонтаним побачајима (СП). Ове две клиничке групе испитаница поредили смо са контролном групом жена. Генерално, упоређујући ниво цитокинског одговора на хламидијалну инфекцију утврдили смо, да серумски ниво свих детектованих цитокина, не показује статистички значајну разлику између жена са ТФИ и СП, али је код извесних цитокина показана статистички значајна разлика између пацијенткиња из групе пацијенткиња са СП у односу на контролну групу жена.

У групи испитаница са ТФИ (медијана 10.08; интервал 0.00 – 19.28), имали смо незнатно виши ниво IL–1, у односу на пацијенткиње са спонтаним побачајима (медијана 9.73; интервал 0.00 – 63.39) и жене контролне групе (медијана 9.56; интервал 4.38 – 20.07). Разлике су минималне, тако да ниво IL–1 није показао статистичку разлику међу групама. У супротности, концентрација TNF– $\alpha$  у серуму контролне групе (медијана 3.44; интервал 0.00 – 9.37) била је три пута већа него у серуму испитаница са спонтаним побачајима (медијана 0.25; интервал 0.00 – 20.01) и пацијенткињама са ТФИ (медијана 0.88; интервал 0.00 – 8.23), али статистичку разлику нисмо доказали. Значајну статистичку разлику показали смо за вредности серумског нивоа IL–12 ( $p < 0.05$ ) и IL–2 ( $p < 0.05$ ) поредећи испитанице са СП (IL–12: медијана 2.11; интервал 0.00 – 12.13; IL–2: медијана 0.00; интервал 0.00 – 91.81) и контролну групу (IL–12: медијана 5.31; интервал 0.00 – 12.93; IL–2: медијана 42.70; интервал 0.00 – 68.15). Са друге стране, за серумски ниво ових цитокина нисмо показали значајну статистичку разлику упоређујући пацијенткиње из ТФИ групе (IL–12: медијана 4.06; интервал 0.00 – 9.50); (IL–2: медијана 40.78; интервал 0.00 – 85.43) било са пацијенткињама са СП или са пацијенткињама контролне групе. Негде очекивано и серумска концентрација IL–17 у контролној групи жена (медијана 8.25; интервал 5.18 – 19.60) имала је благо повишен ниво у односу на вредности у серуму испитаница са СП (медијана 5.00; интервал 0.00 – 316.80) и ТФИ (медијана 5.37; интервал 0.00 – 41.15). Разлике у нивоу IL–22 између испитиваних група су много више изражене. Ниво IL–22 показује статистички значајну разлику између контролне групе (медијана 130.69; интервал 0.00 – 277.30) и пацијенткиња са спонтаним побачајима (медијана 0.00; интервал 0.00 – 396.29). Такође, поредећи пацијенткиње са тубарним фактором инфертилитета (медијана 123.63 интервал: 0.00 – 252.45) и пацијенткиње са спонтаним побачајима

показали смо статистички значајну разлику. Концентрација IL-10 у серуму контролне (медијана 3.24; интервал 0.00 – 6.58) и ТФИ групе (медијана 3.16; интервал 0.00 – 12.13) имала је изражено више вредности у поређењу са пацијенткињама са спонтаним побачајима (медијана 1.84; интервал 0.00 – 20.91), али статистичку разлику нисмо доказали. Насупрот IL-10, статистички значајно виши ниво ( $p < 0.01$ ) IL-13 смо доказали у серуму контролне групе жена (медијана 54.50; интервал 11.88 – 99.19) у односу на пацијенткиње са спонтаним побачајима (медијана 14.83; интервал 00.00 – 152.87) док статистички значајна разлика није показана у односу на пацијенткиње са ТФИ (медијана 23.62; интервал: 00.38 – 95.39). I у случају серумског нивоа IL-5 доказали смо да у контролној групи жена (медијана 14.83 интервал: 7.15 – 27.44) ниво IL-5 има виши ниво ( $p < 0.05$ ) у односу на групу пацијенткиња са спонтаним побачајима (медијана 7.16; интервал 0.00 – 49.11), али статистички значајну разлику такође нисмо показали у односу на пацијенткиње са ТФИ (медијана 13.84; интервал 0.00 – 36.71). Као и када смо анализирали субфертилне пацијенткиње са контролном групом, и у случају анализе двеју клиничких група са контролом, измерене вредности серумских нивоа за IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-4 и IL-9 нису показале разлику (**Графикон 10**).



**Графикон 10.** Серумски ниво Th1/Th2/Th17 у групи пацијенткиња са тубарним фактором инфертилитета (ТФИ), спонатаним побачајима (СП) и контролној групи (К).

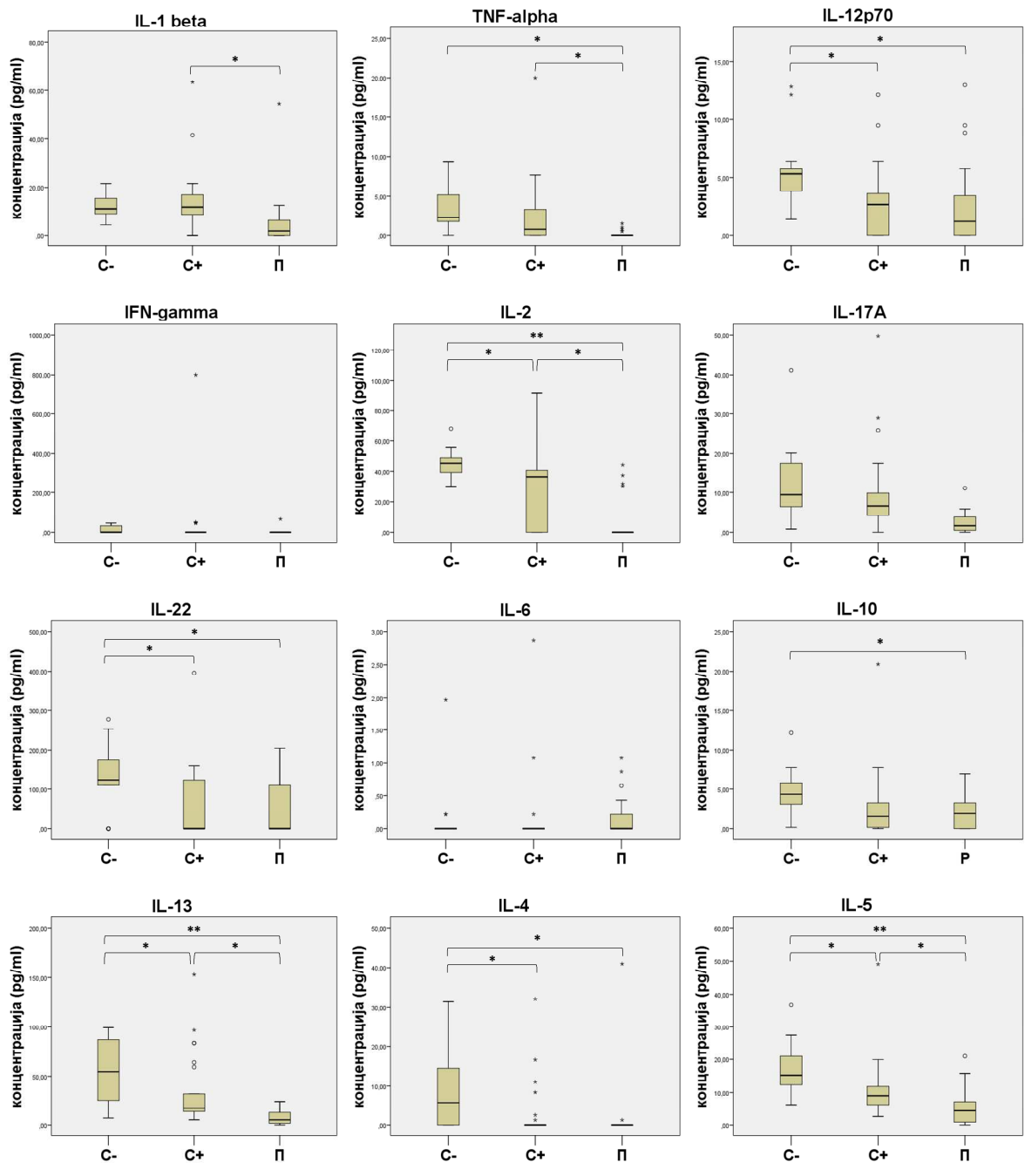
## 4.9 Серумски ниво цитокина код субфертилних пацијенткиња са различитим статусом хламидијалне инфекције

Након поделе студијске популације испитаница на основу серолошког статуса хламидијалне инфекције, упоређивали смо вредности серумске концентарције цитокина између пацијенткиња са перзистентном инфекцијом, серопозитивних пацијенткиња са ранијом инфекцијом и серонегативних испитаница. Анализом добијених података уочили смо интересантне разлике међу испитиваним групама.

Серумски ниво IL-1 показује статистички значајну разлику ( $p < 0.05$ ) између серопозитивних пацијенткиња са ранијом хламидијалном инфекцијом (медијана 11.83; интервал: 0.00 – 63.39) и пацијенткиња са перзистентном инфекцијом (медијана 1.84; интервал 0.00 – 54.43), док статистички значајна разлика није показана у односу на серонегативне испитанице (медијана 11.12; интервал: 4.38 – 21.65). Насупрот IL-1, значајно виши ниво ( $p < 0.05$ ) TNF- $\alpha$  у серуму смо доказали код серонегативних испитаница (медијана 2.27; интервал: 0.00 – 9.37) у односу на пацијенткиње са перзистентном хламидијалном инфекцијом (медијана 0.00; интервал 0.00 – 1.50 ). Такође смо утврдили значајну разлику ( $p < 0.05$ ) у нивоу TNF- $\alpha$  међу серопозитивним испитаницама са ранијом инфекцијом (медијана 0.75; интервал: 0.00 – 20.01) и испитаницама са перзистентном инфекцијом (медијана 0.00; интервал 0.00 – 1.50), док нема разлике између серонегативних испитаница (медијана 2.27; интервал: 0.00 – 9.37) и серопозитивних испитаница са ранијом инфекцијом (медијана 0.75; интервал: 0.00 – 20.01). Сличне резултате смо добили анализом нивоа IL-12p70. Ниво IL-12p70 код серонегативних пацијенткиња (медијана 5.31; интервал: 1.38 – 12.83) не само да показује значајно веће вредности у односу на пацијенткиње са перзистентном хламидијалном инфекцијом (медијана 1.20; интервал 0.00 – 12.97 ) ( $p < 0.05$ ), него и у односу на серопозитивне пацијенткиње са ранијом инфекцијом (медијана 2.68; интервал 0.00 – 12.13) ( $p < 0.05$ ). Такође смо показали да је у серуму серонегативних испитаница ниво IL-2 (медијана 45.22; интервал: 30.05 – 68.15) статистички значајно виши ( $p < 0.01$ ) у односу на пацијенткиње са перзистентном инфекцијом (медијана 0.00; интервал 0.00 – 44.21), али и значајно виши ( $p < 0.05$ ) у односу на серопозитивне пацијенткиње са ранијом инфекцијом (медијана 36.42; интервал 0.00 – 91.81). Негде очекивано, утврдили смо да у поређењу са пацијенткињама са перзистентном

инфекцијом (медијана 0.00; интервал 0.00 – 44.21), серопозитивне пацијенткиње са ранијом инфекцијом (медијана 36.42; интервал 0.00 – 91.81) имају такође значајно виши ниво ИЛ–2 у серуму ( $p < 0.05$ ). Даље, утврдили смо да код серонегативних испитаница серумски ниво ИЛ–17 (медијана 9.45 интервал: 0.81 – 41.15) има виши ниво, како у односу на групу серопозитивних пацијенткиња са ранијом инфекцијом (медијана 7.46; интервал 0.00 – 316.80), тако и у односу на групу испитаница са перзистентном хламидијалном инфекцијом (медијана 1.65; интервал 0.00 – 309.10). За утврђене вредности нисмо показали статистичку значајност. Исте резултате смо добили и за ниво ИЛ–22, са том разликом што су серумске концентрације ИЛ–22 достигле статистички значајне разлике између група. Наиме, забележене концентрације ИЛ–22 су биле статистички значајно више код серонегативних пацијенткиња (медијана 123.64; интервал: 0.00 – 277.3) ( $p < 0.05$ ) и то како у односу на пацијенткиње са перзистентном хламидијалном инфекцијом (медијана 0.00; интервал: 0.00 – 204.74), тако и у односу на серопозитивне пацијенткиње са ранијом инфекцијом (медијана 0.12; интервал: 0.00 – 396.29). У серуму испитиваних група ниво ИЛ–10 показује статистички значајну разлику ( $p < 0.05$ ) између серонегативних пацијенткиња (медијана 4.33; интервал: 0.16 – 12.13) и пацијенткиња са перзистентном инфекцијом (медијана 1.50; интервал 0.00 – 20.91), док статистички значајну разлику нисмо утврдили у односу на серопозитивне пацијенткиње са ранијом инфекцијом. Ниво ИЛ–13 у серуму серонегативних пацијенткиња (медијана 54.50; интервал: 7.15 – 99.19) показао је постојање статистичке разлике ( $p < 0.05$ ) у односу на серопозитивне пацијенткиње са ранијом инфекцијом (медијана 17.34; интервал 5.31 – 152.57). Исти ниво статистичке значајности ( $p < 0.05$ ) за концентрацију ИЛ–13 у серуму смо утврдили и између групе серопозитивних испитаница са ранијом хламидијалном инфекцијом (медијана 17.34; интервал 5.31 – 152.57) и групе испитаница са перзистентном инфекцијом (медијана 5.31; интервал 0.00 – 24.15). На крају, показали смо статистички значајну разлику ( $p < 0.01$ ) ИЛ–13 у серуму серонегативних пацијенткиња (медијана 54.50; интервал: 7.15 – 99.19) и пацијенткиња са доказаном перзистентном инфекцијом (медијана 5.31; интервал 0.00 – 24.15). И у случају серумског нивоа ИЛ–4 доказали смо да код серонегативних испитаница (медијана 5.75 интервал: 0.00 – 31.47) ниво ИЛ–4 има виши ниво ( $p < 0.05$ ), како у односу на групу серопозитивних пацијенткиња са ранијом инфекцијом (медијана 0.00; интервал 0.00 – 32.10), тако и у односу на групу испитаница са перзистентном хламидијалном инфекцијом (медијана 0.00; интервал 0.00 – 40.99) ( $p < 0.05$ ). Вредности

IL-5 прате тренд IL-13. Значајну статистичку разлику ( $p < 0.05$ ) утврдили смо између групе серопозитивних испитаница са ранијом хламидијалном инфекцијом (медијана 9.02; интервал 2.62 – 49.11) и групе испитаница са перзистентном инфекцијом (медијана 4.41; интервал 0.00 – 20.96), али и серонегативних испитаница (медијана 15.33; интервал: 6.23 – 36.71). Такође смо показали статистички значајно виши ниво ( $p < 0.01$ ) IL-5 у серуму серонегативних пацијенткиња (медијана 15.33; интервал: 6.23 – 36.71) у односу на пацијенткиње са потврђеном перзистентном инфекцијом (медијана 4.41; интервал 0.00 – 20.96). У серуму испитиваних група нисмо показали разлику за серумске концентрације IFN- $\gamma$ , IL-6 и IL-9 (**Графикон 11**).



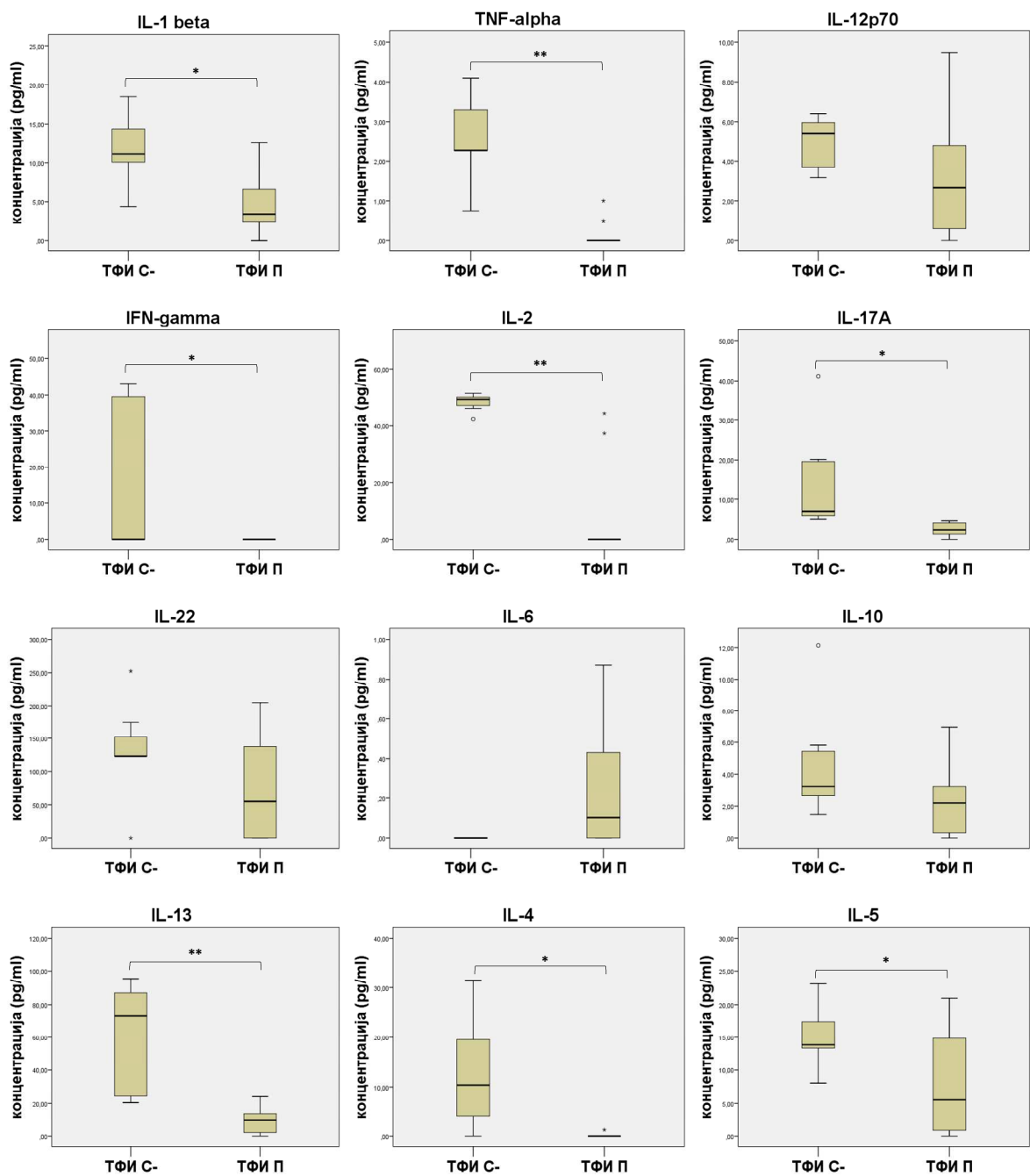
**Графикон 11.** Серумски ниво Th1/Th2/Th17 у групи серонегативних пацијенткиња (C-), серопозитивних пацијенткиња са ранијом инфекцијом (C+) и пацијенткиња са перзистентном инфекцијом (П).

Даљом анализом смо испитивали разлике у нивоу серумских цитокина између испитаница дефинисаних серогрупа, али различитог клиничког статуса. Обзиром да смо у групи испитаница са тубарним фактором инфертилитета имали само три серопозитивне пацијенткиње са ранијом инфекцијом, у даљем току анализе серопозитивне испитанице из обе групе нису разматране, а анализу смо спровели поредећи серонегативне испитанице и испитанице са перзистентном хламидијалном инфекцијом. Серумске вредности цитокина унутар ТФИ групе подељене на основу серолошког статуса хламидијалне инфекције, показују извесне сличности са студијском популацијом испитаница подељеном на исти начин.

Наиме, утврдили смо да ниво  $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{IL-2}$  и  $\text{IL-13}$  достиже веома значајну статистичку разлику ( $p < 0.01$ ) између серонегативних пацијенткиња ( $\text{TNF-}\alpha$ : медијана 2.27; интервал 0.75 – 4.10;  $\text{IL-2}$ : медијана 49.37; интервал 42.28 – 51.50;  $\text{IL-13}$ : медијана 72.95; интервал 20.44 – 95.39) и пацијенткиња са перзистентном инфекцијом ( $\text{TNF-}\alpha$ : медијана 0.00; интервал 0.00 – 1.00;  $\text{IL-2}$ : медијана 0.00; интервал 0.00 – 44.21;  $\text{IL-13}$ : медијана 9.64; интервал 0.00 – 24.15). Такође смо, слично резултатима добијеним у целокупној студијској популацији, за нивое  $\text{IL-4}$  и  $\text{IL-5}$  доказали да серонегативне испитанице ( $\text{IL-4}$ : медијана 10.39; интервал 0.00 – 31.47;  $\text{IL-5}$ : медијана 13.84; интервал 8.08 – 23.08) у односу на испитанице са перзистентном инфекцијом ( $\text{IL-4}$ : медијана 0.00; интервал 0.00 – 1.26;  $\text{IL-5}$ : медијана 5.55; интервал 0.00 – 20.96) имају статистички значајно веће вредности ( $p < 0.05$ ). У супротности са резултатима добијеним у целој студијској популацији, добили смо податак да серонегативне испитанице без серолошких доказа хламидијалне инфекције имају статички значајно веће нивое  $\text{IL-1}$ ,  $\text{IFN-}\gamma$  и  $\text{IL-17}$  ( $\text{IL-1}$ : медијана 11.12; интервал 4.38 – 18.51;  $\text{IFN-}\gamma$ : медијана 0.00; интервал 0.00 – 43.29;  $\text{IL-17}$ : медијана 7.07; интервал 5.18 – 41.15) у односу на испитанице са перзистентном инфекцијом ( $\text{IL-1}$ : медијана 3.42; интервал 0.00 – 12.55;  $\text{IFN-}\gamma$ : медијана 0.00; интервал 0.00 – 00.00;  $\text{IL-17}$ : медијана 2.34; интервал 0.00 – 4.81) ( $p < 0.05$ ).

Вредности нивоа за  $\text{IL-12}$ ,  $\text{IL-22}$ ,  $\text{IL-6}$  и  $\text{IL-10}$  показивале су веома сличан тренд као и у студијској популацији пацијенткиња, тј. биле су више у групи серонегативних пацијенткиња, али вредности нису достизале статистичку значајност. У серуму испитиваних група нисмо показали разлику за серумске концентрације  $\text{IL-9}$  (**Графикон 12**).

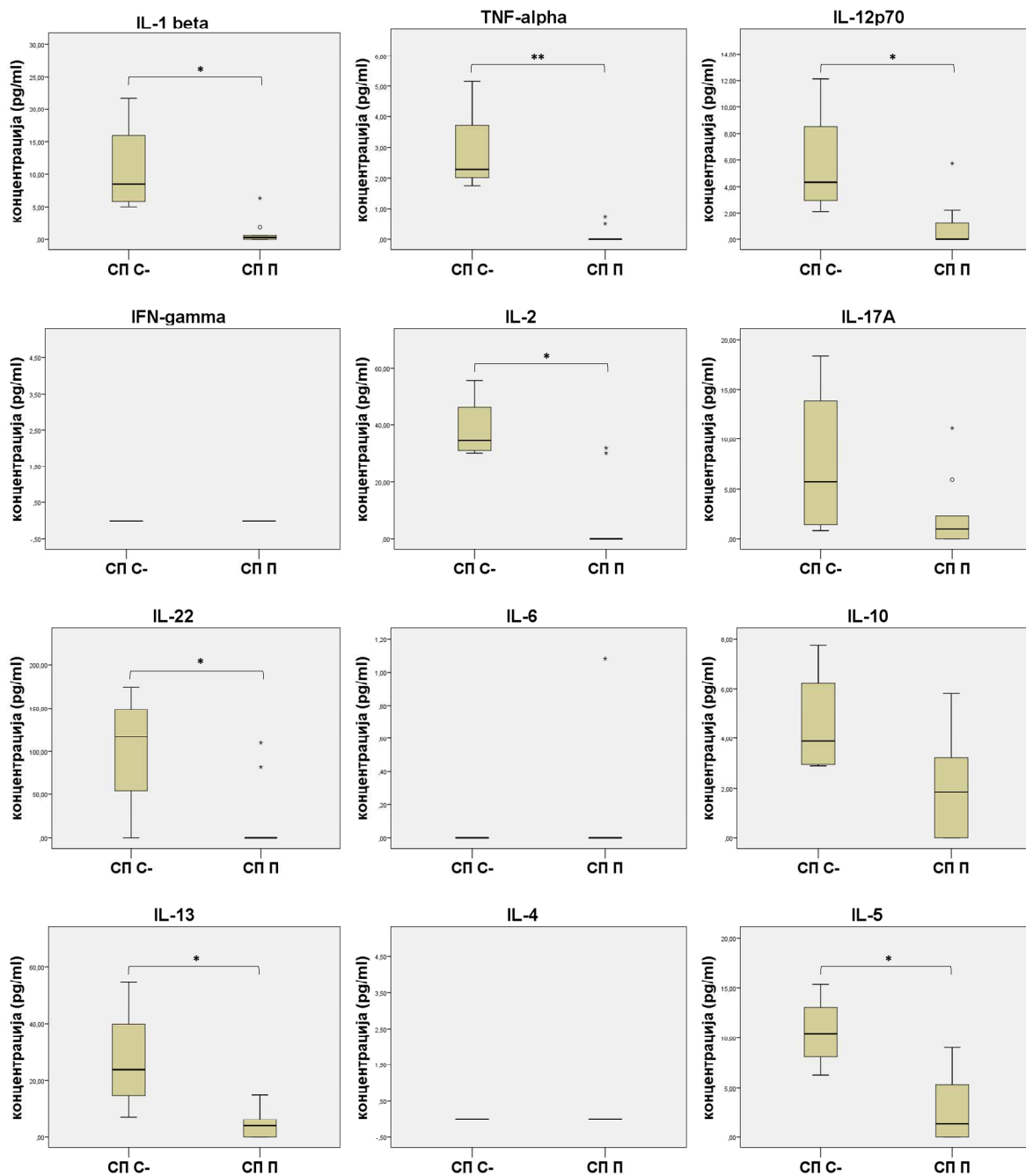




**Графикон 12.** Серумски ниво Th1/Th2/Th17 цитокина код пацијенткиња са тубарним фактором инфертилитета (ТФИ) у односу на серолошки статус хламидијалне инфекције: серонегативне (С-) и пацијенткиње са перзистентном инфекцијом (П).

Слично, анализирајући вредности серумске концентарције цитокина унутар групе пацијенткиња са спонтаним побачајима подељених у односу на серолошки статус хламидијалне инфекције, јасно је уочљиво да ниво цитокина има веома сличан тренд као и када смо целу студијску популацију пацијенткиња поделили на основу серолошког статуса хламидијалне инфекције.

Доказали смо да ниво је IL-12 и IL-2 статистички значајно виши код серонегативних пацијенткиња (IL-12: медијана 4.32; интервал 2.11 – 12.13; IL-2: медијана 34.37; интервал 30.05 – 55.88) него код пацијенткиња са перзистентном инфекцијом (IL-12: медијана 0.00; интервал 0.00 – 5.74; IL-2: медијана 0.00; интервал 0.00 – 31.82) ( $p < 0.05$ ). Такође, статистички значајну разлику показали смо и у случају серумског нивоа IL-1 чије су вредности код серонегативних испитаница имале осам пута виши ниво (медијана 8.55; интервал 5.02 – 21.65) у односу на испитанице са перзистентном хламидијалном инфекцијом (медијана 0.30; интервал 0.00 – 6.34) ( $p < 0.05$ ). Вредности IL-22 достизале су статистичку разлику од између испитаница са перзистентном инфекцијом које су имале нижи ниво (IL-22: медијана 0.00; интервал 0.00 – 109.61) и серонегативних испитаница које су имале виши ниво овог цитокина (IL-22: медијана 116.61; интервал 0.00 – 174.32) ( $p < 0.05$ ). Сличан тренд, доказали смо и за серумски ниво IL-13 и IL-5. Ниво ова два цитокина је био виши код серонегативних пацијенткиња (IL-13: медијана 23.63; интервал 7.15 – 54.50; IL-5: медијана 10.37; интервал 6.23 – 15.33) у односу на пацијенткиње са перзистентном инфекцијом (IL-13: медијана 3.96; интервал 0.00 – 14.83; IL-5: медијана 0.00; интервал 0.00 – 9.02) ( $p < 0.05$ ). Такође показали смо да серонегативне пацијенткиње имају статистички значајно виши ниво TNF- $\gamma$  (медијана 2.27; интервал: 1.76 – 5.18) у односу на пацијенткиње са доказаном перзистентном инфекцијом (медијана 0.00; интервал 0.00 – 0.75) ( $p < 0.01$ ). Измерене вредности IL-17 и IL-10 показивале су разлику међу групама али вредности нису достизале статистичку значајност. У серуму испитиваних група нисмо показали разлику за серумске концентрације IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-4 и IL-9 (Графикон 13).



**Графикон 13.** Серумски ниво Th1/Th2/Th17 цитокина код пацијенткиња са спонтаним побачајима (СП) у односу на серолошки статус хламидијалне инфекције: серонегативне (С-) и пацијенткиње са перзистентном инфекцијом (П).

#### **4.10. Серумски ниво цитокина код серонегативних испитаница**

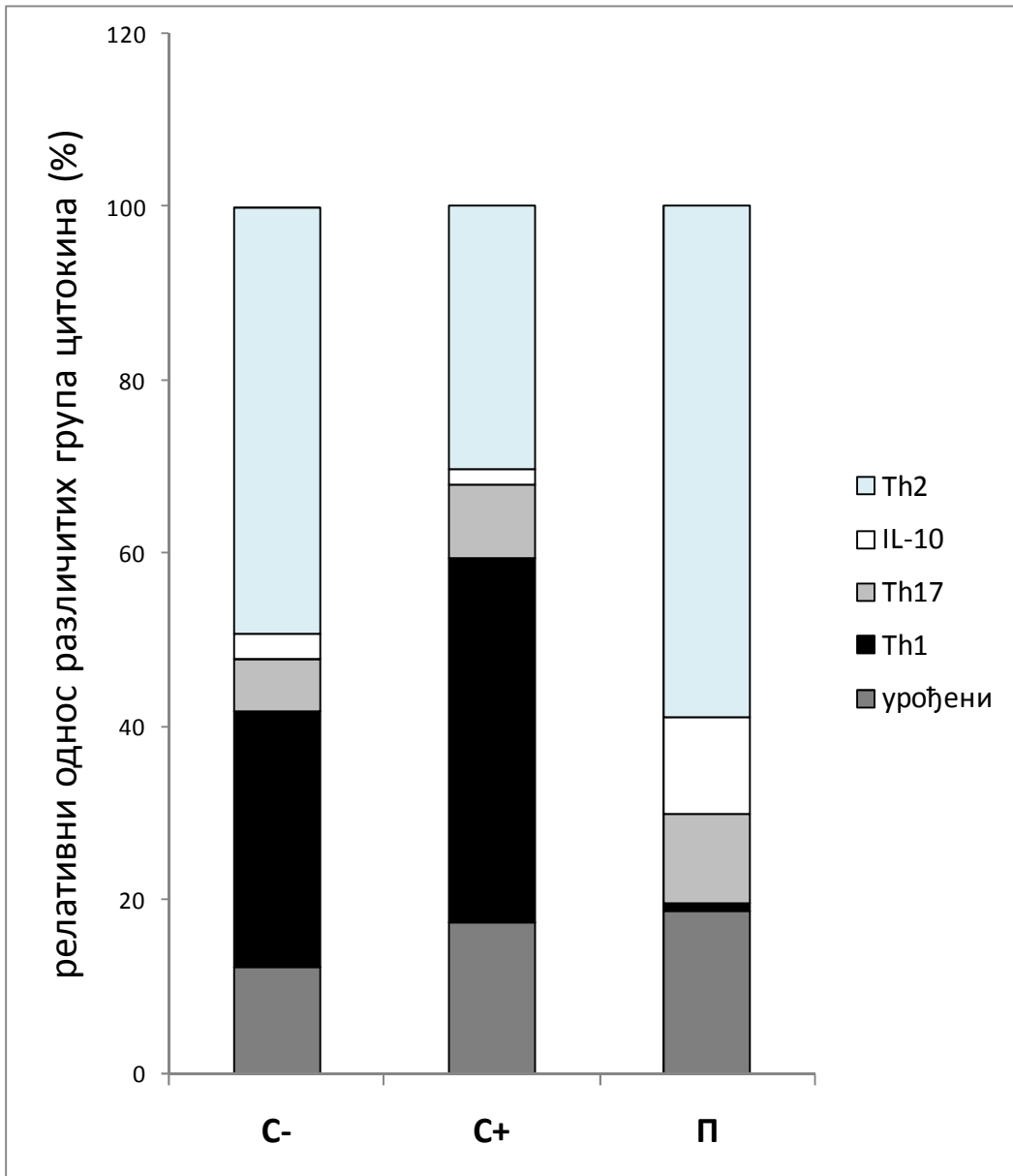
Поредећи серумски ниво испитиваних цитокина код серонегативних испитаница са тубарним фактором инфертилитета, спонтаним побачајима и у контролној групи, нисмо утврдили статистички значајну разлику. Изузетак је IL-4, за који смо значајно повишене вредности добили у контролној групи жена (медијана 8.42; интервал 0.00 – 20.83) у односу на испитанице са тубарним фактором инфертилитета (медијана 0.63; интервал 0.00 – 31.47) и испитанице са спонтаним побачајима (медијана 0.00; интервал 0.00 – 130.57) ( $p < 0.05$ ).

#### **4.11. Серумски ниво цитокина код испитаница са перзистентном хламидијалном инфекцијом**

Слично, поредећи серумски ниво цитокина испитаница са перзистентном хламидијалном инфекцијом између група пацијенткиња са тубарним фактором инфертилитета и спонтаним побачајима, утврдили смо да је серумски ниво IL-1, статистички значајно виши код испитаница са тубарним фактором инфертилитета које су имале три пута виши ниво овог цитокина (медијана 3.42; интервал 0.00 – 12.55) у односу на испитанице са спонтаним побачајима (медијана 0.30; интервал 0.00 – 6.34) ( $p < 0.05$ ). Анализирајући серумске вредности преосталих цитокина, нисмо утврдили постојање статистички значајних разлика између испитиваних група

#### 4.12. Цитокински профил

Коначно, утврдили смо да пацијенти са перзистентном инфекцијом не само да имају најниже нивое свих испитиваних цитокина, већ у односу на серонегативне и серопозитивне пацијенте показују јединствен цитокински профил. Наиме, када смо вредности медијана за сваки од испитиваних цитокина приказали као релативне вредности (процент) у односу на све измерене цитокине, утврдили смо да на супрот серонегативним пацијенткињама које имају избалансиран однос проинфламаторних (урођени, Th1, Th17) и антиинфламаторних (Th2, IL-10) цитокина, серопозитивне пацијенткиње показују превагу проинфламаторних цитокина, док пацијенткиње са перзистентном инфекцијом карактерише готово потпуно одсуство Th1 цитокина удружено са значајном доминацијом проинфламаторних Th17 и антиинфламаторних IL-10 и Th2 цитокина. Значајно је напоменути да у односу на друге цитокине IL-10 представља доминантни појединачни цитокин код пацијената са перзистентном инфекцијом (**Графикон 14**).

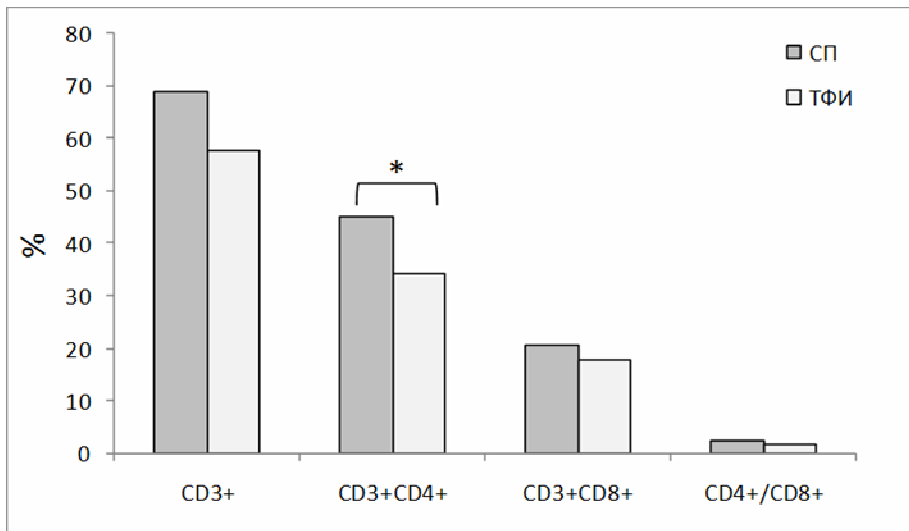


**Графикон 14. Релативни однос различитих група цитокина код субфертилних пацијената груписаних према серолошком статусу хламидијалне инфекције.** Серонегативне (C-); Серопозитивне (C+); Серопозитивне са перзистентном инфекцијом (П). Цитокини су груписани на следећи начин: цитокини урођеног имунитета (IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-12p70), Th1 цитокини (IFN $\gamma$ , IL-2), Th2 цитокини (IL-4, IL-5, IL-13), Th17 цитокини (IL-17A, IL-22, IL-6) и IL-10 (самостално). Вредности медијана за сваку групу су приказане као проценат укупног цитокинског одговора.

#### **4.13. Анализа субпопулација мононуклеарних леукоцита методом проточне цитометрије код субфертилних испитаница са тубарним фактором инфертилитета и спонтаним побачајима**

Методом проточне цитометрије код субфертилних испитаница подељених на основу клиничке дијагнозе на пацијенткиње са тубарним фактором инфертилитета (ТФИ) и пацијенткиње са спонтаним побачајима (СП) мерили смо експресију како екстрацелуларних (CD3+, CD4+, CD8+, CD19+, CD14+, CD57+, HLA-DR+, CD11c+, CD123+) тако и интрацелуларних маркера (Foxp3+, Tbet+, IL-10, TGF- $\beta$ ) мононуклеарних ћелија.

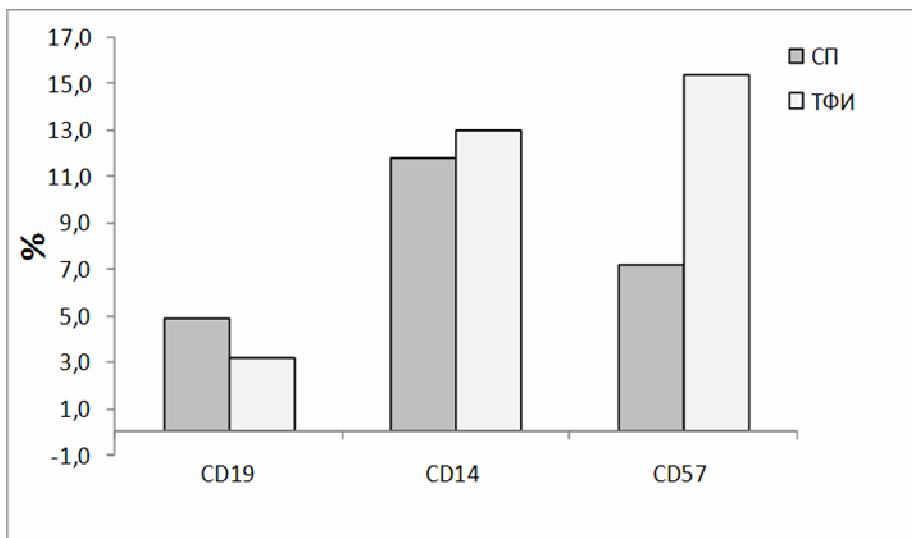
Процентуална заступљеност Т лимфоцита (CD3+ ћелије) као и субпопулација помагачких (CD3+CD4+) и цитотоксичних (CD3+CD8+) Т лимфоцита је била значајно већа у групи пацијенткиња са СП у односу на групу са ТФИ. Анализом односа CD4+ помагачких и CD8+ цитотоксичних Т лимфоцита утврдили смо да је CD4+/CD8+ индекс нешто већи код пацијенткиња са СП, иако су вредности за обе групе блиске нормалним вредностима.



**Графикон 15.** Процентуална заступљеност субпопулација Т лимфоцита у групи пацијенткиња са тубарним фактором инфертилитета (ТФИ) и спонатаним побачајима (СП). Процент Т лимфоцита (CD3+), помагачких Т лимфоцита (CD3+CD4+), цитотоксичних Т лимфоцита (CD3+CD8+), релативни однос (индекс) помагачких CD4+ и цитотоксичних CD8+ Т лимфоцита (CD4+/CD8+).

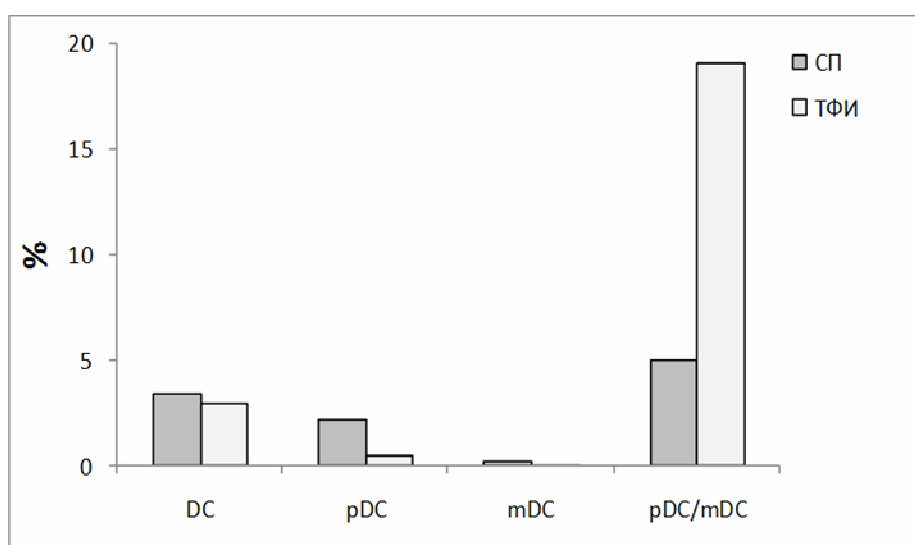


Процент Б лимфоцита (CD19+ ћелије) је такође био већи код пацијенткиња са СП. Међутим, са друге стране проценат моноцита (CD14+ ћелије) био је незнатно виши у групи пацијенткиња са ТФИ док је проценат НК ћелија (CD57+) био значајно виши у овој групи испитаница.



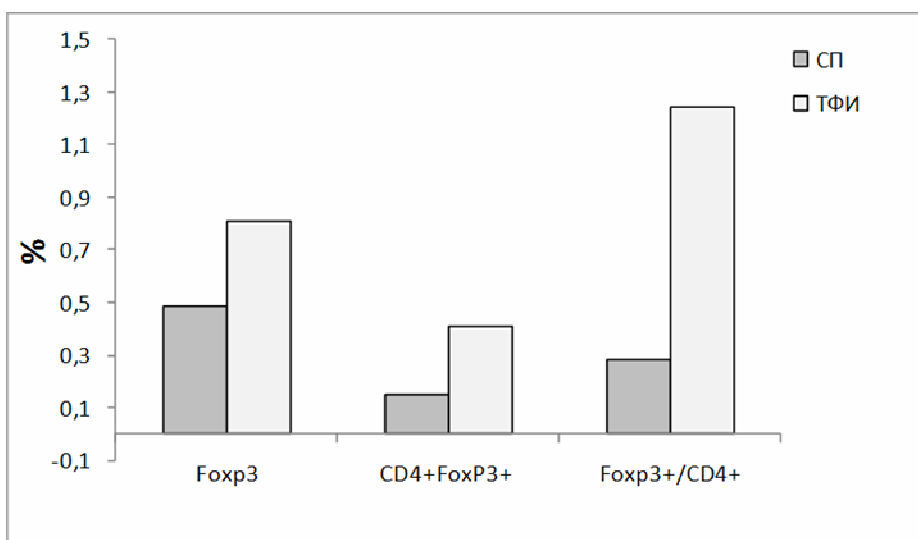
**Графикон 16. Процентуална заступљеност Б лимфоцита (CD19+), моноцита (CD14+) и НК (CD57+) ћелија у групи пацијенткиња са тубарним фактором инфертилитета (ТФИ) и спонатаним побачајима (СП).**

Дендритске ћелије смо детектовали као ћелије негативне за маркере Т лимфоцита (CD3), Б лимфоцита (CD19) и моноцита (CD14), а позитивне на HLA/DR антиген. Заступљеност укупних дендритских ћелија, али и њихових субпопулација како плазмоцитоподобних pDC (Lin-HLA/DR+CD123+) тако и мијелоидних mDC (Lin-HLA/DR+CD11c+) дендритских ћелија већа је у групи пацијенткиња са СП. Међутим, упоређујући индекс pDC/mDC показали смо да је индекс значајно виши код испитаница са ТФИ у односу на испитанице са СП и значајно више померен у правцу pDC.



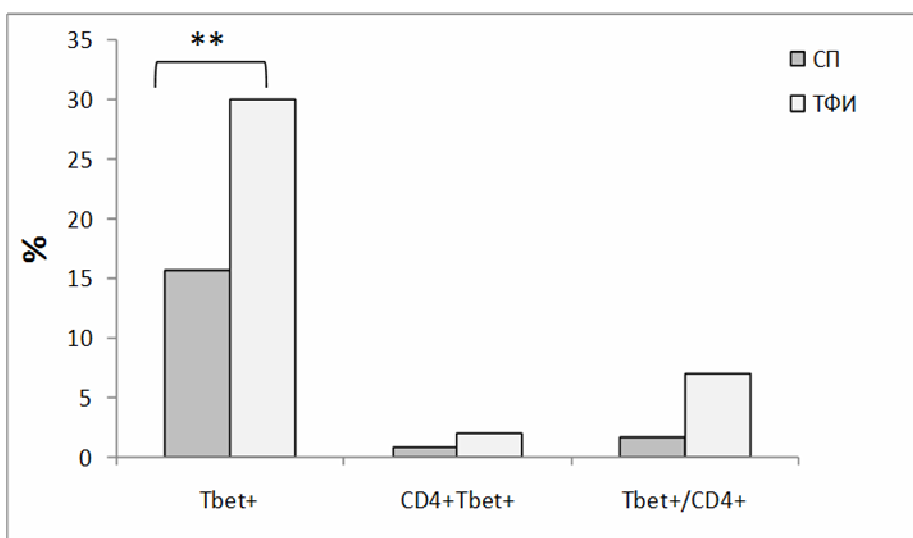
**Графикон 17. Процентуална заступљеност дендритских ћелија у групи пацијенткиња са тубарним фактором инфертилитета (ТФИ) и спонатаним побачајима (СП). Процент дендритских ћелија (DC), плазмоцитоподобних дендритских ћелија (pDC), мијелоидних дендритских ћелија (mDC), релативни однос (индекс) плазмоцитоподобних и мијелоидних дендритских ћелија (pDC/mDC).**

Анализом заступљености ћелија које су Foxp3+, утврдили смо да је у односу на испитанице са СП, већи број ових ћелија присутан у групи ТФИ испитаница. Негде очекивано, у групи ТФИ пацијенткиња утврдили смо и већи проценат регулаторних Т лимфоцита (CD4+Foxp3+) (Treg). Цитометријском анализом учесталости Treg у субпопулацији помагачких Т лимфоцита (Foxp3+/CD4+) утврдили смо да је заступљеност ових ћелија унутар субпопулације CD4+ Т лимфоцита већа у групи пацијенткиња са ТФИ.



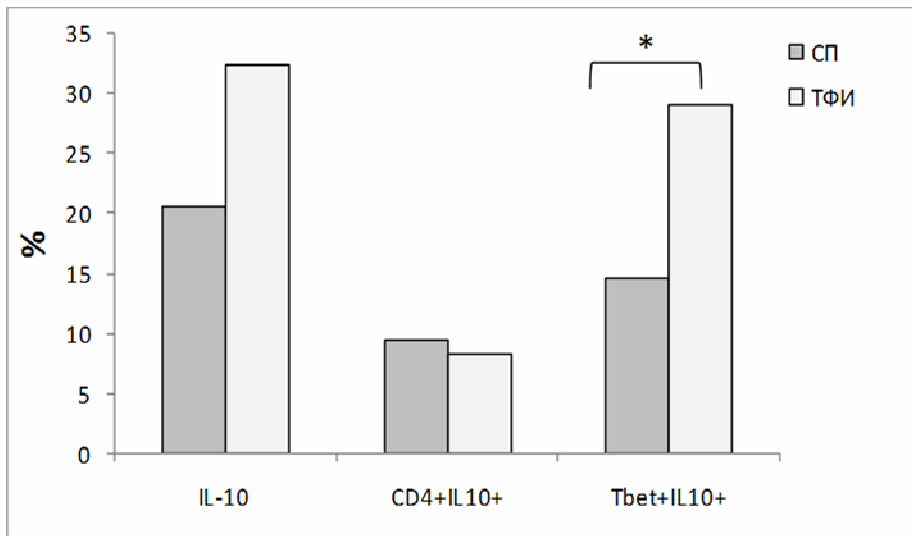
**Графикон 18.** Процентуална заступљеност регулаторних Т лимфоцита у групи пацијенткиња са тубарним фактором инфертилитета (ТФИ) и спонтаним побачајима (СП). Процент Foxp3+ ћелија, регулаторних Т лимфоцита (CD4+Foxp3+), удео Treg лимфоцита у субпопулацији помагачких Т лимфоцита (Foxp3+/CD4+).

Исти тренд прати и процентуалну анализу заступљености ефекторских ћелија које експимирају Tbet+. Показали смо да је проценат ћелија које су Tbet+, као и проценат CD4+Tbet+ помагачких лимфоцита значајно већи у групи ТФИ испитаница. Очекивано, поредећи удео Tbet+ ћелија у субпопулацији помагачких Т лимфоцита (Tbet+/CD4+) утврдили смо да је он значајно нижи у групи пацијенткиња са СП поредећи је са групом пацијенткиња са ТФИ.



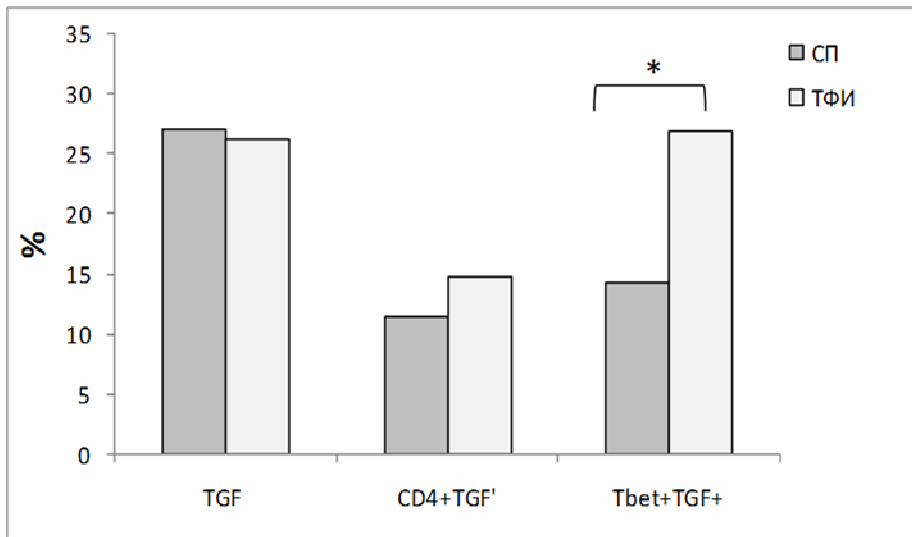
**Графикон 19.** Процентуална заступљеност ефекторских Т лимфоцита у групи пацијенткиња са тубарним фактором инфертилитета (ТФИ) и спонатаним побачајима (СП). Процент Tbet+ ћелија, ефекторских CD4+Т лимфоцита (CD4+Tbet+), удео ефекторских Tbet+ Т лимфоцита у субпопулацији помагачких Т лимфоцита (Tbet+/CD4+).

Анализа интрацелуларне експресије цитокина је показала да је проценат IL-10+ ћелија био виши у групи испитаница са ТФИ, док између испитиваних група није показана разлика у процентуалној заступљености помагачких CD4+ лимфоцита који продукују IL-10. Насупрот томе, учесталост Tbet+ ћелија које продукују IL-10 је била знатно већа код пацијенткиња ТФИ групе.



**Графикон 20.** Процентуална заступљеност IL-10 продукујућих ћелија у групи пацијенткиња са тубарним фактором инфертилитета (ТФИ) и спонтаним побачајима (СП). Процент IL-10+ ћелија, помагачких Т лимфоцита који продукују IL-10 (CD4+IL-10+), ефекторских Tbet+ Т лимфоцита који продукују IL-10 (Tbet+IL-10+).

Насупрот IL-10+ продукујућим ћелијама, TGF- $\beta$ + продукујуће ћелије су процентуално биле равномерно заступљене у обе испитиване групе. Међутим, показали смо да у односу на испитанице са СП, пацијенткиње са ТФИ имају већи како проценат помагачких CD4+TGF- $\beta$ + продукујућих, тако и Tbet+ ефекторских ћелија које продукују TGF- $\beta$ .

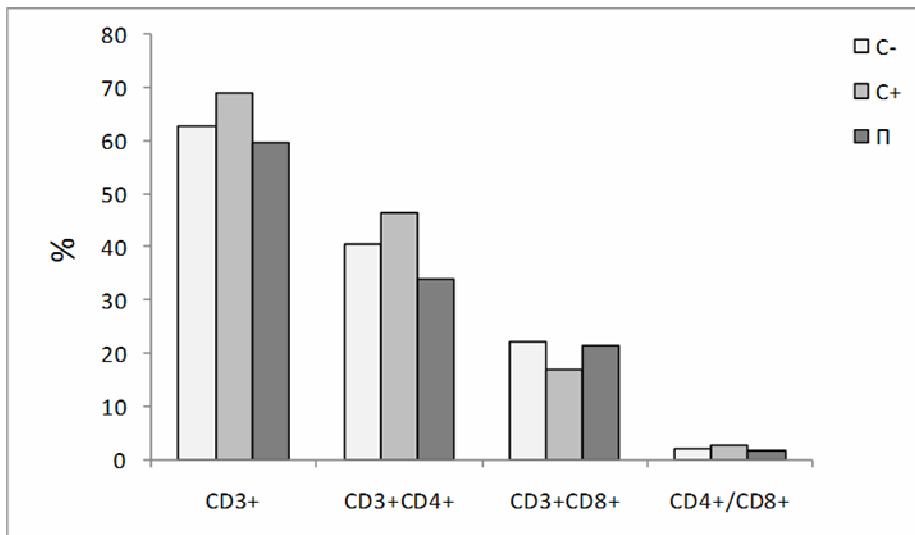


**Графикон 21. Процентуална заступљеност TGF- $\beta$  продукујућих ћелија у групи пацијенткиња са тубарним фактором инфертилитета (ТФИ) и спонатаним побачајима (СП). Процент TGF- $\beta$ + ћелија, помагачких Т лимфоцита који продукују TGF- $\beta$  (CD4+TGF- $\beta$ +), ефекторских Tbet+ Т лимфоцита који продукују TGF- $\beta$  (Tbet+TGF- $\beta$ +).**

#### **4.14. Анализа субпопулација моноклеарних леукоцита методом проточне цитометрије код субфертилних испитаница са различитим серолошким статусом хламидијалне инфекције**

У даљем току анализе смо резултате експресије истих екстрацелуларних и интрацелуларних маркера моноклеарних ћелија упоређивали између субфертилних испитаница груписаних на основу серолошког статуса на пацијенткиње са перзистентном инфекцијом, серопозитивне пацијенткиње са ранијом инфекцијом и серонегативне пацијенткиње.

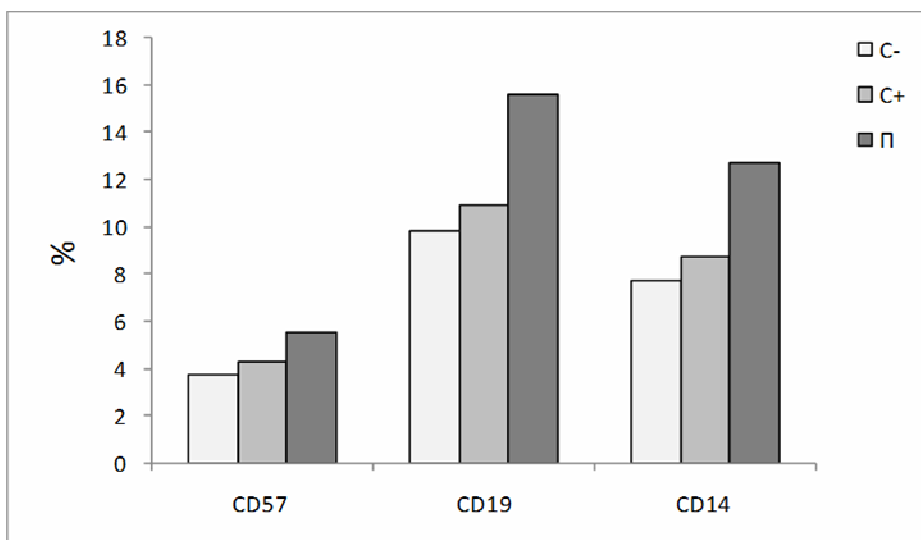
У групи серопозитивних пацијенткиња са ранијом инфекцијом утврдили смо највиши проценат како укупне популације Т лимфоцита (CD3+ ћелије) тако и субпопулације помагачких (CD3+CD4+) Т лимфоцита. Најнижи проценат ових ћелија утврђен је у групи пацијенткиња са перзистентном инфекцијом. Насупрот томе, утврдили смо да је субпопулација цитотоксичних (CD3+CD8+) Т лимфоцита процентуално најмање заступљена у групи серопозитивних пацијенткиња са ранијом инфекцијом. Сходно овом налазу, утврдили смо да је, иако у границама нормалних вредности, индекс CD4+ помагачких и CD8+ цитотоксичних Т лимфоцита највиши код серопозитивних пацијенткиња са ранијом инфекцијом, те да је померен је у правцу помагачких Т лимфоцита. У групи испитаница са перзистентном инфекцијом овај индекс је нижи од нормалних вредности, док је у групи серонегативних испитаница близак нормалним вредностима.



**Графикон 22.** Процентуална заступљеност субпопулација Т лимфоцита код серопозитивних пацијенткиња са перзистентном (П) и ранијом (С+) инфекцијом и серонегативних (С-) пацијенткиња. Процент Т лимфоцита (CD3+), помагачких Т лимфоцита (CD3+CD4+), цитотоксичних Т лимфоцита (CD3+CD8+), релативни однос (индекс) помагачких CD4+ и цитотоксичних CD8+ Т лимфоцита (CD4+/CD8+).

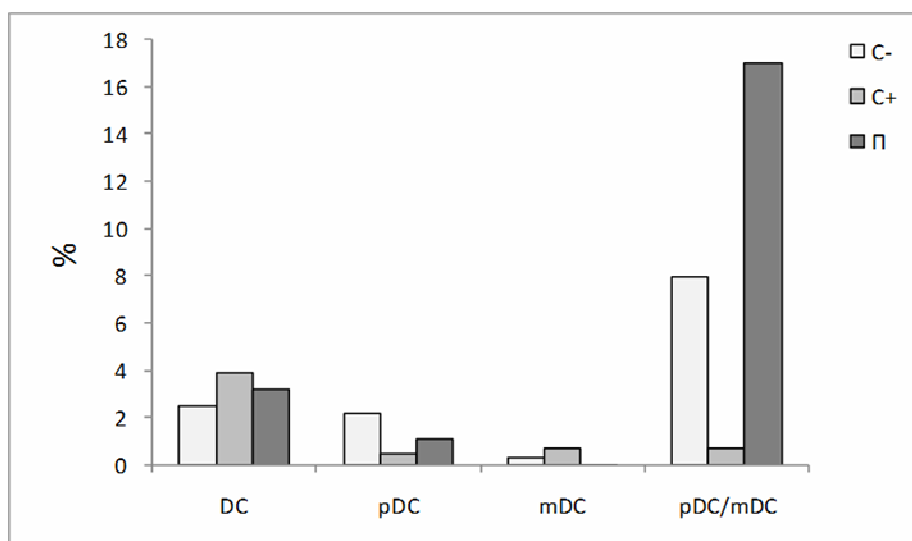


Такође смо утврдили да је процентуална заступљеност Б лимфоцита (CD19+ ћелије), моноцита (CD14+ ћелије) и NK ћелија (CD57+) већа код пацијенткиња са потврђеном перзистентном инфекцијом, у односу како на серопозитивне пацијенткиње са ранијом инфекцијом тако и серонегативне пацијенткиње.



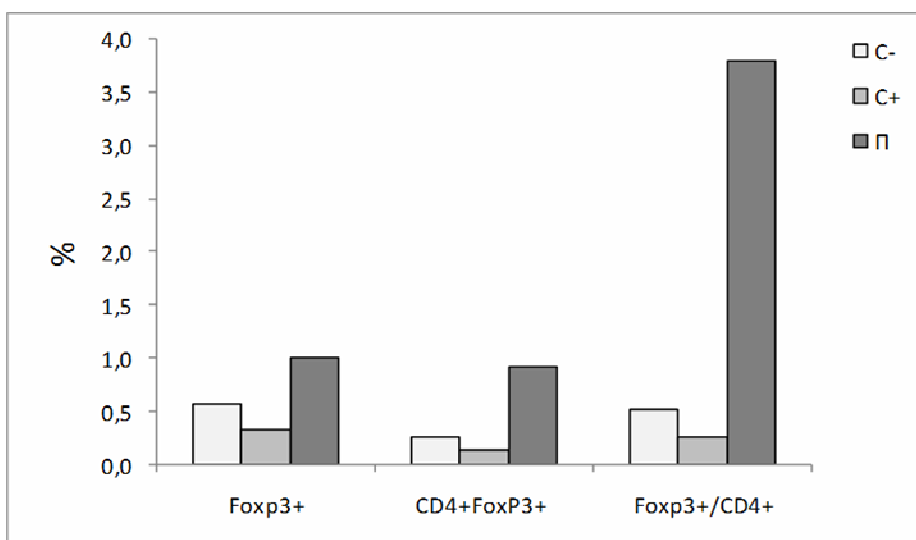
**Графикон 23. Процентуална заступљеност Б лимфоцита (CD19+), моноцита (CD14+) и NK (CD57+) ћелија код серопозитивних пацијенткиња са перзистентном (П) и ранијом (C+) инфекцијом и серонегативних (C-) пацијенткиња.**

Процент укупних дендритских ћелија био је навиши у групи серопозитивних пацијенткиња са ранијом инфекцијом, нешто мањи у групи пацијенткиња са потврђеном перзистентном инфекцијом и најнижи у групи серонегативних жена. Са друге стране, у групи серонегативних жена показали смо значајану заступљеност pDC (Lin–HLA/DR+CD123+) поредећи је са групом испитаница са перзистентном и ранијом инфекцијом. У групи испитаница са ранијом инфекцијом показали смо незнатно виши проценат mDC (Lin–HLA/DR+CD11c+) у односу на серонегативне испитанице, док су вредности у групи жена са перзистентном инфекцијом биле испод граница детекције. Анализом индекса pDC/mDC показали смо да је у групи пацијенткиња са перзистентном инфекцијом веома висок и драстично померен у правцу pDC, у групи серонегативних испитаница нижи и такође померен у правцу pDC, док је код пацијенткиња са ранијом инфекцијом најнижи.



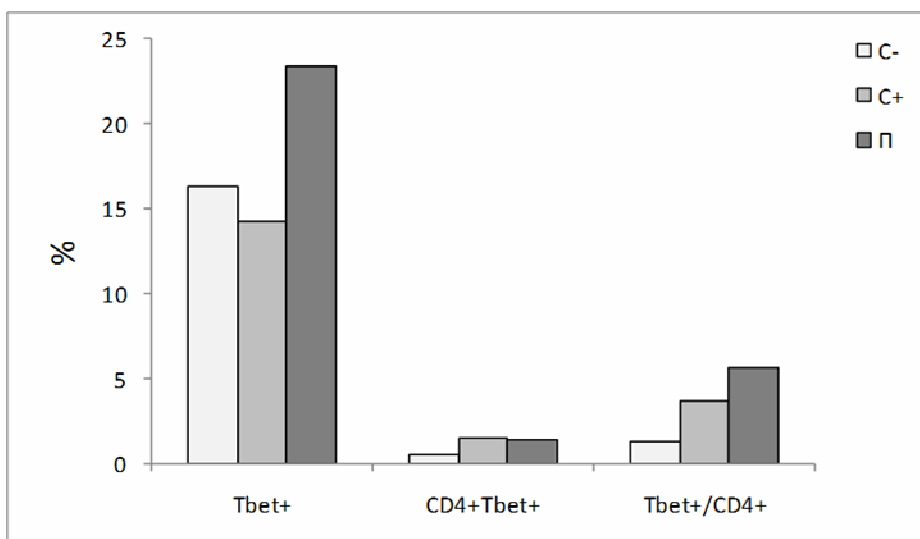
**Графикон 24.** Процентуална заступљеност дендритских ћелија код серопозитивних пацијенткиња са перзистентном (П) и ранијом (С+) инфекцијом и серонегативних (С-) пацијенткиња. Процент дендритских ћелија (DC), плазмocитoидних дендритских ћелија (pDC), мијелоидних дендритских ћелија (mDC), релативни однос (индекс) плазмocитoидних и мијелоидних дендритских ћелија (pDC/mDC).

Значајно већу заступљеност ћелија које експримирају Foxp3+ транскрипциони фактор, као и (CD4+Foxp3+) регулаторних Т лимфоцита (Treg) показали смо у групи пацијенткиња са перзистентном хламидијалном инфекцијом поредећи је са преостале две испитиване групе. Испитивањем учесталости регулаторних Т лимфоцита у субпопулацији помагачких Т лимфоцита (Foxp3+/CD4+) показали смо исти тренд, тако да се веома висок степен заступљености ових ћелија налази у субпопулацији CD4+ Т лимфоцита пацијенткиња са перзистентном инфекцијом.



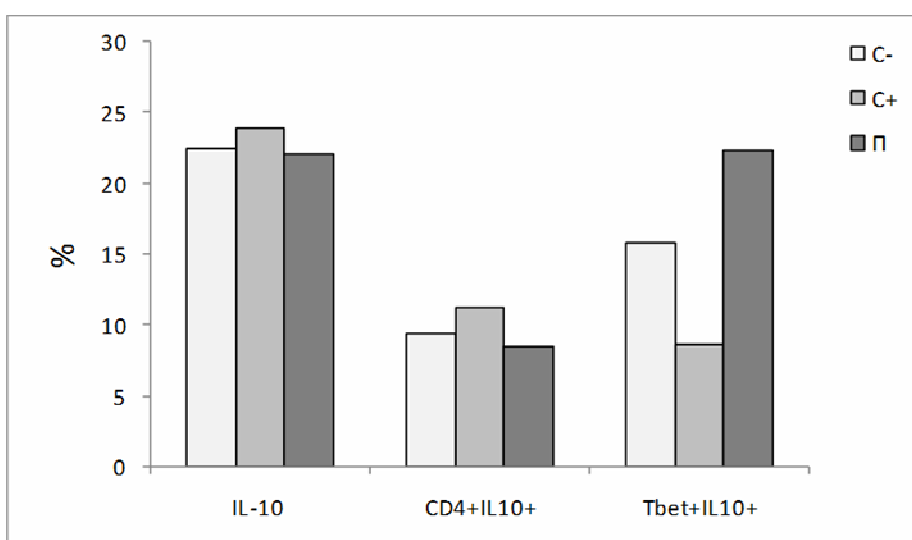
**Графикон 25. Процентуална заступљеност регулаторних Т лимфоцита код серопозитивних пацијенткиња са перзистентном (П) и ранијом (С+) инфекцијом и серонегативних (С-) пацијенткиња. Процент Foxp3+ ћелија, регулаторних Т лимфоцита (CD4+Foxp3+), удео Treg лимфоцита у субпопулацији помагачких Т лимфоцита (Foxp3+/CD4+).**

Такође, у групи испитаница са перзистентном хламидијалном инфекцијом утврдили смо значајано виши проценат ћелија које су Tbet+. Скоро уједначен ниво, CD4+Tbet+ помагачких ћелија показали смо и код пацијенткиња са перзистентном и серопозитивних пацијенткиња са ранијом инфекцијом, док смо у групи серонегативних испитаница имали најнижи проценат ових ћелија. Поредићи удео Tbet+ ћелија у субпопулацији помагачких Т лимфоцита (Tbet+/CD4+) утврдили смо да је удео ових ћелија значајно виши у групи пацијенткиња са перзистентном инфекцијом у односу и на серопозитивне пацијенткиње са ранијом инфекцијом и у односу на серонегативне пацијенткиње.



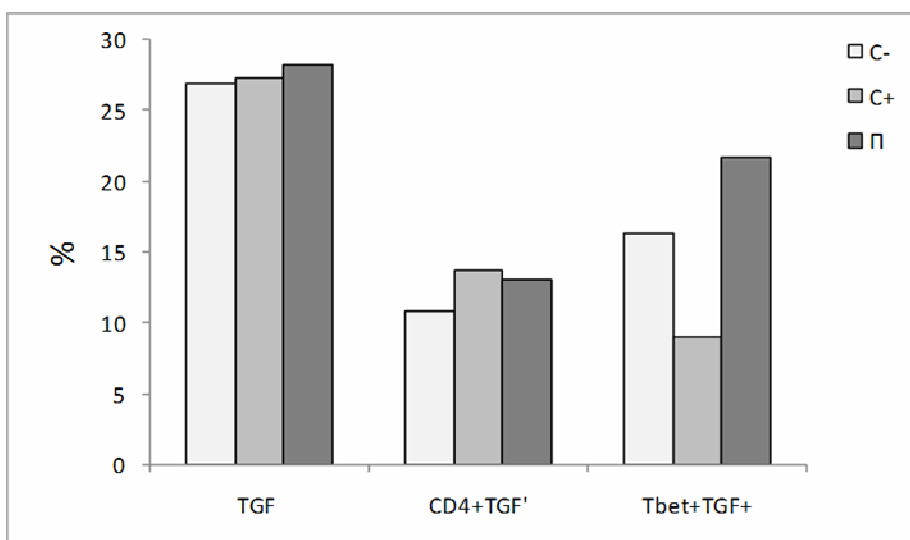
**Графикон 26.** Процентуална заступљеност ефекторских Т лимфоцита код серопозитивних пацијенткиња са перзистентном (П) и ранијом (С+) инфекцијом и серонегативних (С-) пацијенткиња. Процент Tbet+ ћелија, ефекторских CD4+Т лимфоцита (CD4+Tbet+), удео ефекторских Tbet+ Т лимфоцита у субпопулацији помагачких Т лимфоцита (Tbet+/CD4+).

У све три испитиване групе пацијенткиња, утврдили смо висок али уједначен проценат IL-10+ продукујућих ћелија. Иако приближно сличне заступљености, у групи серопозитивних испитаница са ранијом инфекцијом утврдили смо да су помагачке CD4+IL-10+ продукујуће ћелије нешто заступљеније у односу на проценат истих ћелија у групи серонегативних пацијенткиња и пацијенткиња са перзистентном инфекцијом. Међутим проценат ефекторских Tbet+ћелија које продукују IL-10 + био је највиши у групи испитаница са перзистентном инфекцијом, нижи у групи серонегативних, а значајно нижи у групи серопозитивних испитаница са ранијом инфекцијом.



**Графикон 27. Процентуална заступљеност IL-10 продукујућих ћелија код серопозитивних пацијенткиња са перзистентном (П) и ранијом (C+) инфекцијом и серонегативних (C-) пацијенткиња. Процент IL-10+ ћелија, помагачких Т лимфоцита који продукују IL-10 (CD4+IL-10+), ефекторских Tbet+ Т лимфоцита који продукују IL-10 (Tbet+IL-10+).**

Као и у сличају IL–10 продукујућих ћелија, у све три испитиване групе имали смо висок али уједначен проценат и TGF– $\beta$  продукујућих ћелија. Процент помагачких CD4+TGF– $\beta$ + ћелија био је нешто виши у групи серопозитивних испитаница, док је проценат ефекторских Tbet+ ћелија које продукују TGF– $\beta$ + био највећи у групи жена са перзистентном инфекцијом поредећи их како са серонегативним испитаницама тако и серопозитивним испитаницама са ранијом инфекцијом. Најнижи проценат Tbet+TGF– $\beta$ + био је у групи серонегативних жена.



**Графикон 28. Графикон 21. Процентуална заступљеност TGF– $\beta$  продукујућих ћелија код серопозитивних пацијенткиња са перзистентном (П) и ранијом (C+) инфекцијом и серонегативних (C-) пацијенткиња. Процент TGF– $\beta$ + ћелија, помагачких Т лимфоцита који продукују TGF– $\beta$  (CD4+TGF– $\beta$ +), ефекторских Tbet+ Т лимфоцита који продукују TGF– $\beta$  (Tbet+ TGF– $\beta$ +).**



## 5. ДИСКУСИЈА

Висока стопа преваленције гениталне *C. trachomatis* инфекције, као и стални пораст инциденције у протеклих десет година, намеће се као важан јавно здравствени проблем. У 2002 години преко 800.000 нових случајева регистровано је у САД (186). Четири године касније, Центар за контролу и превенцију болести пријавио је готово милион регистрованих случајева (976.445 у 2005), који одговарају инциденцији од 347.8 случајева на 100.000 становника, што представља упадљиво повећање (187). Пораст инциденције хламидијалне инфекције у последњих десет година такође је упадљив и у Европи. У 2005 години, преко 200.000 случајева је извештено у 17 Европских земаља (188).

Са једне стране, ово повећање у броју регистрованих случајева може одражавати појачане и развијеније мере скрининга, а са друге стране може бити последица развоја сензитивнијих дијагностичких тестова за дијагностику хламидија. Поред тога, асимптоматска природа гениталне хламидијалне инфекције чини да у већини случајева инфекција остане недијагностификована, а самим тим и нелечена, што даље омогућава континуирану трансмисију међу сексуалним партнерима. Тако у студији која је проучавала факторе ризика хламидијалне инфекције, скрининг 13.204 асимптоматских жена одражава преваленцу од 9.2% (189). Генитална хламидијална инфекција се чешће дијагностикује код младих девојака између 15—19 године (2.619 случајева/100.000) и између 20—24 године (2.570 случајева/100.000). У САД, преваленција хламидијалне инфекције код младих између 18—26 година је 4.19% и код жена је ризик за инфекцију 3.5 пута већи у поређењу са мушкарцима (190).

Хламидијална инфекција у доњем гениталном тракту жена најчешће (70 – 90%) протиче асимптоматски, а тако и недијагностификована и нелечена (101). Код великог броја инфицираних жена, инфекција се завршава спонтаном резолуцијом, док се са друге стране, у значајном проценту (20% – 40%), инфекција шири у горњи генитални тракт, где упркос активацији одбрамбених механизма домацина, доводи до перзистентне инфекције (102). Наиме, код 40% жена са нетретираном хламидијалном инфекцијом развија се пелвична инфламаторна болест која потенцијално резултира различитим степенима тубарног оштећења. У даљем току, код 20% жена са ПИБ долази



до тубарног фактора инфертилитета, код 18% се развија хронични пелвични бол, док код 9% жена са ПИБ настаје ектопична трудноћа (191).

Поред тога генитална хламидијална инфекција се доводи се у везу и са спонтаним побачајима, изосталим побачајима и рекурентним (хабитуалним) побачајима, превременом руптуром плодових овојница, превременим порођајем, малом телесном масом на рођењу, неонаталном смрти и постпарталним ендометритисом (192). На порођају, услед нетретиране хламидијалне инфекције, путем инфицираног вагиналног секрета мајки, у приближно 50 % новорођенчади се развија коњуктивитис, док се у 20% новорођенчади развија хламидијална пнеумонија (193).

Фактори који утичу на исход инфекције у смислу да ли ће доћи до спонтане резолуције или ће се развити хронична инфламација су са једне стране везани за домаћина, а са друге стране за патоген. Када говоримо о факторима домаћина ту пре свега мислимо на тип имунског одговора који се развија у току гениталне хламидијалне инфекције. Са једне стране, целуларна хипотеза подразумева да инфламаторни одговор иницирају епителне ћелије инфициране хламидијама, које продукујући проинфламаторне хемокине, привлаче леукоците на место инфламације, који затим индукују и појачавају инфламаторни одговор (168). Услед понављаних инфекција или перзистентне инфекције, дуготрајна продукција инфламаторних медијатора доводи до целуларне пролиферације, ремоделовања ткива и стварања ожиљка са следственим компликацијама (169). Са друге стране имунобиолошка хипотеза указује да на исход инфекције у највећој мери утиче тип специфичног имунског одговора (57). Поларизација у правцу Th1 имунског доводи до елиминације узрочника и престанка инфекције (170), али пролонгиран Th1 имунски одговор може довести до настанка колатералног оштећења ткива по типу реакције касне преосетљивости (171). Насупрот томе, активација Т регулаторних ћелија, у раној фази инфекције може довести до инхибиције протективног имунског одговора (173). На крају, и могућност диференцијације CD4+ лимфоцити у правцу Th17 ћелија за које је карактеристична продукција проинфламаторних цитокина, који активирају неутрофиле, али не и продукција IFN- $\gamma$  који је одговоран за активацију макрофага и протективан имунски одговор (174), може индуковати имуно-патолошку инфламацију уз оштећење ткива. (175).

Такође, врста и карактеристике хламидијалних антигена на које имунски систем одговара али и механизми помоћу којих хламидије избегавају имунски одговор могу утицати на исход инфекције. Имунодоминантни антигени хламидија су главни протеин

спољашње мембране (MOMP) и хламидијални “heat shock” протеини (сHSP-60 и сHSP-10). У току перзистентне хламидијалне инфекције, хламидије заустављају синтезу структурних и функционалних протеина (MOMP), али започињу синтезу хламидијалних “heat shock” протеина (сHSP-60 и сHSP-10) који представљају главне маркере перзистентне инфекције (177). Поред тога, у механизме којима хламидије избегавају имунски одговор спада и могућност индукције толерогених, плазмацитоидних дендритских ћелија (pDC), које могу довести до активације сHSP-60 специфичних IL-10 продукујућих Т регулаторних ћелија (173), које пак могу довести до инхибиције протективног имунског одговора (Th1) и следственог развоја перзистентне инфекције праћене колатералним оштећењем околног ткива (180)

На крају, развој перзистенције је можда и најзначајнија способност хламидија да избегну имунски одговор. Различити стимулуси могу довести до инхибиције репликације ретикуларних тела при чему настају велике, аберантне, нерепликативне, перзистентне интрацелуларне форме хламидија чије се присуство сматра одговорним за успостављање перзистентне хламидијалне инфекције. Поред развоја перзистенције и појава честих реинфекција може бити узрок пролонгиране инфламације и следственог оштећења ткива. Појава честих реинфекција доводи се у везу са сероваријабилношћу хламидија, природно кратаким протективним имунитетом и употребом антибиотика који могу прекинути успостављање имунитета услед скраћивања времена трајања инфекције.

Сходно свему наведеном, основни циљ нашег истраживања био је да се утврде имуно–патогенетски механизми који се налазе у основи перзистентне хламидијалне инфекције тј., да се испитају функционалне и фенотипске карактеристике имунског одговора испитаница са хламидијалном инфекцијом, као и евентуална повезаност ових параметара са нивоом перзистенције хламидијалне инфекције. Стога смо, у складу са наведеним циљевима утврдили учесталост хламидијалне инфекције, одредили серумске нивое антитела на хламидијалне антигене, испитали профил секретованих цитокина и утврдили присуство и фенотип појединих субпопулација моноклеарних леукоцита код пацијенткиња са субфертилитетом.

Подаци из наше студије потврђују ранија истраживања да испитанице са субфертилитетом имају висок степен серопозитивности на хламидијалне антигене, при чему испитанице са СП имају већи проценат испитаница са ранијом инфекцијом у односу на групу испитаница са ТФИ. Једна ранија студија је такође показала високу учесталост како IgA (7.9%) тако и IgG (21.1%) антитела код жена са спонтаним

побачајима циме је, као и у насој студији, потврђена асоцијација између спонтаних побачаја и серолошких доказа хламидијалне инфекције (194). Насупрот томе, али и очекивано у групи испитаница са ТФИ показали смо веома висок проценат испитаница са перзистентном инфекцијом. Резултати сличних студија снажно подржавају високу учесталост перзистентне хламидијалне инфекције код пацијенткиња са ТФИ (195–197). Висока учесталост перзистентне хламидијалне инфекције код пацијенткиња са ТФИ на индиректан начин потврђује резултате других студија, које наводе да гениталне хламидијалне инфекције у великом проценту доводе до перзистенције хламидија у горњим партијама гениталног тракта жена, и следственог оштећење ткива репродуктивног тракта жена. Са друге стране, иако је у групи пацијенткиња са ТФИ показан висок проценат перзистентних инфекција, интересантан је налаз да је у односу на групу испитаница са СПу овој групи утврђен висок проценат серонегативних испитаница. Ова висока серонегативност у групи жена са ТФИ, указује на мултифакторијалну етиологију тубарног фактора инфертилитета, како инфективне тако и неинфективне природе. Међу инфективним узрочницима ТФИ се поред *C. trachomatis* наводе и: *Mycobacterium tuberculosis* (198), *Mycoplasma genitalium* (199) *Neisseria gonorrhoeae* (200)

Присуство антитела на МОМР антиген *C. trachomatis* повезано је са протективним имунским одговором. У прилог томе нам говоре недавна истраживања која потврђују да имунизација нативним МОМР антигеном, покреће протективни имунски одговор на хламидијалну инфекцију (201, 202). Насупрот томе, бројне студије наводе да је присуство анти-сHSP60 антитела повезано са патологијом (203), као и да је имунитет на сHSP60 антиген повезан са дуготрајном хроничном инфламацијом горњег гениталног тракта пре свега Фалопијевих туба, у односу на инфекције доњег гениталног тракта (204). Наша студија је показала да је серумски ниво свих детектованих антитела виши у групи испитаница са субфертилитетом, при чему испитанице са ТФИ имају највиши серумски ниво анти-сHSP60 антитела, док испитанице са СП имају највиши серумски ниво анти-МОМР антитела. Такође, постоје студије које су јасно показале да ниво сHSP60 антитела јасно корелира са степеном тубарног оштећења (71, 205). Поред тога, у једној студији је доказано да постоји јасна корелација између ТФИ и присуства антитела на сHSP60, али не и антитела на хумани HSP60 чиме је хипотеза о учешћу аутоимуних механизма у тубарној патологији доведена у питање, без обзира на високу хомологију ова два протеина (206).

У сагласности са нашим истраживањем, постоје бројне студије које су потврдиле присуство анти-МОМР антитела код жена са рекурентним побачајима (207, 208) али и код жена са спонтаним побачајима (194). Резултати нашег истраживања, као и резултати једне од наведених студија (194) који су показали високу учесталост анти-МОМР антитела код жена са спонтаним побачајима, наводе на постојање асоцијација између спонтаних побачаја и серолошких доказа предходних хламидијалних инфекција, што обзиром на висок ниво и стални пораст преваленције гениталних хламидијалних инфекција јасно истиче значај овог налаза. Анализом ових резултата можемо претпоставити да ранија, а поготово, још увек активна (присуство IgA-МОМР антитела) генитална хламидијална инфекција, која се одржава на нивоу ендометријума не спречава концепцију, али онемогућава одржавање трудноће, што је вероватно последица инфламаторног оштећења ендометријума.

Ипак, без обзира постојање студија које су показале повезаност између спонтаних побачаја и серолошких доказа раније хламидијалне инфекције, у смислу присуства IgA и IgG анти-МОМР антитела, до сада ни једна студија није показала корелацију између антитела на сHSP60, као маркера перзистентне хламидијалне инфекције и спонтаних побачаја. У нашој студији смо показали да, не тако висок, али значајан проценат (16,7%) пацијенткиња са СП има антитела на сHSP60 и тиме перзистентну хламидијалну инфекцију. Нешто већу учесталост (26,7%) перзистентне хламидијалне инфекције у групи испитаница са изосталим побачајем, потврдила је студија из Грчке (209). Иако је у нашој студији потврђено да субфертилне испитанице, како ТФИ, тако и СП, имају висок ниво испитиваних антитела, ипак серумски ниво свих испитиваних антитела је био највиши у групи пацијенткиња са перзистентном инфекцијом и то како код ТФИ, тако и у групи пацијенткиња са ранијом инфекцијом. Висок ниво анти-сHSP60, али и анти-МОМР IgG антитела показан је и код пацијенткиња са оклудираним тубама (210). Сличне налазе наводе и друге студије, па је тако утврђено да код жена са ТФИ такође постоји веома висок ниво како анти-МОМР антитела, тако и антитела на сHSP60 антиген (204).

Резултати наше студије, али и подаци других студија нас наводе на закључак, да је ТФИ у великом броју случајева последица пролонгиране, перзистентне инфламације која је удружена са високом продукцијом антитела на експимиране антигене хламидија. Са друге стране, резултати наше студије још једном нас наводе и на закључак да спонтни побачаји могу такође настати услед перзистентне хламидијалне инфекције, која се са ендометријума шири на фетална ткива. Но, узимајући у обзир

високу хомологију између cHSP60 и хуманог HSP60 (hHSP60), не можемо превидети алтернативну могућност по којој продужена изложеност cHSP60, може довести до губитка толеранције и иницијације имунског одговора на hHSP60. На тај начин створена анти-hHSP60 антитела у даљем току могу препознати хумани HSP60 ембриона у раном ембрионалном развоју и довести до прекида трудноће (211–213). Ипак, као што је већ напоменуто, једна ранија студија која је показала да постоји јасна корелација између ТФИ и присуства антитела на cHSP60, није утврдила постојање исте асоцијације између ТФИ и анти-hHSP60 чиме је хипотеза о учешћу аутоимуних механизма у тубарној патологији доведена у питање, без обзира на високу хомологију ова два протеина (206).

Висок ниво свих испитиваних антитела у групи пацијенткиња са перзистентном хламидијалном инфекцијом, нас је навео да употребом ROC анализе испитамо дијагностички значај ових антитела, односно њихову способност да диферентују различите клиничке ентитете субфертилитета. Тако смо показали да ниво анти-MOMP IgA антитела може бити добар маркер за диференцијацију перзистентне инфекције међу пацијенткињама са ТФИ и СП. И други аутори су на сличан начин указали на могућност коришћења анти-MOMP IgA антитела, као и на њихову предност у односу на анти-MOMP IgG антитела, у серодијагностици ТФИ (214). Слично, показано је да су анти-MOMP IgA антитела најбољи имунолошки маркера за дијагнозу хроничног простатитиса (215). Насупрот овим налазима, у једној студији се сугерише да су анти-MOMP IgA антитела безначајна у дијагностици хламидијалне инфекције (216).

Резултати анализе серумског новог цитокина и анализе цитокинског профила, код пацијенткиња са субфертилитетом различитог клиничког узрока, су сходно утврђеној серопреваленци хламидијалне инфекције код ових пацијенткиња, показали да је серумски ниво већине испитиваних цитокина био најнижи у групи испитаница са перзистентном инфекцијом и то како код пацијенткиња са ТФИ, тако и код пацијенткиња са СП. Међутим, иако је ниво готово свих цитокина најнижи у групи испитаница са перзистентном инфекцијом, у односу на серопозитивне, а поготово у односу на серонегативне пацијенткиње, пад нивоа цитокина у групи испитаница са перзистентном инфекцијом није равномеран за све цитокине, тако да релативна заступљеност појединих цитокина у цитокинском одговору испитаница различитих серогрупа није иста. Наиме, насупрот серонегативним испитаницама код којих постоји избалансиран однос про-инфламаторних и анти-инфламаторних цитокина и испитаница са ранијом инфекцијом код којих постоји превага про-инфламаторних цитокина,

цитокински профил испитаница са перзистентном инфекцијом карактерише скоро потпуно одсуство Th1 цитокина уз значајну доминацију IL-10 и Th2 анти-инфламаторних цитокина.

На тај начин, подаци из наше студије снажно подржавају реципрочну активност Th1-Th2/Treg имунског одговора. Наиме, претпоставља се да релативна преминација Th2/Treg имунског одговора, може довести до инхибиције протективних Th1 ћелија и самим тим до немогућности елиминације хламидијалне инфекције, што пак може довести до индукције или одржавања перзистентне форме *C. trachomatis*, која у даљем току стимулацијом хроничне инфламације доводи до оштећења ткива и следствене фиброзе (41,177, 217, 218). Студије на животињама конзистентно подржавају претпоставку да Th1 цитокински одговор промовише резолуцију хламидијалне инфекције, док су Th2/Treg цитокини повезани са перзистенцијом и секвелама (142, 219– 221). У прилог овој претпоставци нам говоре и хумане студије које јасно показују да пацијенти са ТФИ чешће продукују Th2/Treg цитокине, сугеришући да снажан Th1 имунски одговор има критичну улогу у елиминацији инфекције, док Th2/Treg имунски одговор има улогу у патологији (126, 179, 222 – 223).

Обзиром да је наша студија, студија пресека, главно ограничење, посебно у погледу перзистентне инфекције, је немање података везано за време када су испитанице иницијално инфициране, услед чега је немогуће направити закључак да ли је доминација IL-10 и Th2 цитокина код пацијенткиња са перзистентном инфекцијом узрок или последица хламидијалне инфекције. Даље, податак да субфертилне пацијенткиње са ранијом или перзистентном *C. trachomatis* инфекцијом имају мањи ниво свих детектованих цитокина је, на први поглед, контрадикторан подацима из других студија које су показале да је ниво TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  и IL-10, у цервикалном секрету, виши у групи инфертилних жена са *C. trachomatis* инфекцијом, у односу на инфертилне жене без инфекције (224, 225). Ова контрадикторност може се објаснити различитим биолошким узорцима коришћеним у нашој и други студијама. Док са једне стране цервикални узорци одражавају локални/паракрини имунски одговор, за очекивати је да је ниво цитокина виши код жена са акутном хламидијалном инфекцијом, са друге стране узорци серума одражавају системски/ендокрини имунски одговор, па није изненађујуће да је серумски ниво цитокина мањи у односу на ниво локалног имунског одговора. Ова разлика се може објаснити чињеницом да је у периферној крви пацијената са хламидијалном инфекцијом показано присуство малог броја *C. trachomatis* специфичних CD4+ клонова ћелија (226). Међутим, морамо имати

у виду да, у случајевима перзистентне хламидијалне инфекције, коју карактерише асцедентна инфекција из доњег у горњи генитални тракт, узорци цервикаса не могу са сигурношћу одражавати инфекцију/инфламацију горњег репродуктивног тракта. Из тог разлога, специфичан серумски цитокински профил може бити бољи предиктор исхода обољења у односу на локални (цервикални) цитокински профил.

Дакле, и поред извесних неслагања, не треба превидети чињеницу, да су и друге студије, као и наша, показале да је хламидијална перзистенција уско повезана са релативном превагом Th2/Treg анти-инфламаторног имунског одговора. Као што смо већ навели, анализом нивоа серумских цитокина, утврдили смо да релативна заступљеност појединих цитокина у цитокинском одговору испитаница различитих серогрупа није иста, те да испитанице са перзистентном инфекцијом имају јединствен цитокински профил који карактерише одсуство Th1 цитокина и доминација IL-10 и Th2 анти-инфламаторних цитокина.

Резултати наше студије су такође показали да је серумски ниво већине детектованих цитокина, у односу на контролну групу жена, био нижи у обе клиничке групе испитаница, како ТФИ, тако и СП, при чему су пацијенткиње са СП имале најнижи ниво цитокина у серуму. Узимајући у обзир да се највећи број серонегативних испитаница налази у контролној групи жена, мањи у групи испитаница са ТФИ и најмањи у групи испитаница са СП, те да су серонегативне пацијенткиње у поређењу са серопозитивним испитаницама имале виши ниво цитокина, овакав налаз је био очекиван, што такође сугерише да цитокински профил субфертилних испитаница углавном зависи од серопозитивности на хламидијалне антигене а не од клиничке дијагнозе.

На крају, један од резултата наше студије је и налаз да испитанице са перзистентном хламидијалном инфекцијом, поред јасне преваге антиинфламаторних цитокина (IL-10, Th2/Treg) показују и умерену доминацију Th17 цитокина. Још од првих открића Th17 ћелија и њихове улоге у имунском одговору, распрострањено је мишљење по коме ове ћелије имају значајну улогу у имунопатологији различитих обољења (62, 63, 227, 228). Наиме, сматра се да Th17 имунски одговор може бити потенцијални медијатор деструкције ткива и у току перзистентне хламидијалне инфекције. Ова претпоставка је делимично подржана у неколико студија које су показале јаку везу између високог нивоа IL-17 и тежине хламидијалне инфекције (229-231). Обзиром на улогу Th17 ћелија у активацији неутрофила и чињенице да Th17 имунски одговор промовише Treg/TGF- $\beta$  (232), а супримира Th1/IFN- $\gamma$  имунски

одговор (233), највероватније је да у условима ниског нивоа IFN- $\gamma$  и високог нивоа IL-10/IL-4, долази до покретања Th17 имунског одговора који заузврат појачава имунопатологију и доводи до оштећења ткива (231).

Сумарно, анализа цитокинског профила код испитаница различитог статуса хламидијалне инфекције, је показала да пацијенткиње са перзистентном инфекцијом имају снижен ниво Th1 и инфламаторних цитокина, док IL-10, Th2 и Th17 цитокини, иако редуковани, остају релативно високи у односу на Th1 и цитокине урођене имуности, што наводи на закључак о постојању пролонгираног и дисбалансираног Th1/Th17-Th2/Treg имунског одговора.

Интрацелуларни начин живота *C. trachomatis* одређује које ће компоненте имунског одговора бити ефикасне у уклањању бактерије из организма. Бројна истраживања су показала да кључну улогу у одбрани од ове стриктно интрацелуларне бактерије има ћелијски имунски одговор. И CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т лимфоцити укључени су у контролу инфекције продукцијом Th1 цитокина, на првом месту IFN- $\gamma$  који је кључни молекул имунског одговора на инфекцију *C. trachomatis*. CD4<sup>+</sup> Th1 одговор има главну улогу у резолуцији примарне инфекције, као и у резистенцији на реинфекцију. Резултати нашег истраживања добијени методом проточне цитометрије показали су да је у групи серопозитивних пацијенткиња процентуална заступљеност укупних Т лимфоцита (CD3<sup>+</sup>), као и субпопулације помагачких (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>) Т лимфоцита већа него у групи серонегативних пацијенткиња, што указује на ангажованост ћелијске имуности у одговору на инфекцију. У групи пацијенткиња са перзистентном инфекцијом смањен је број и укупних Т лимфоцита и CD4<sup>+</sup> лимфоцита, као и однос CD4/CD8. Ово може бити последица миграције Т лимфоцита на место инфекције или исцрпљивања имунског одговора услед дуготрајне стимулације. Такође, макрофази инфицирани хламидијом могу да индукују апоптозу Т лимфоцита, што је још један механизам којим хламидија избегава имунски одговор и одржава перзистенцију (234). Дуготрајна активација имунског одговора и оштећење ткива које настаје као резултат пролонгиране инфламације индукују настанак регулаторних Т лимфоцита (CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg), а висок ниво IL-2 доприноси њиховој пролиферацији и повећава њихову ефикасност. Наши резултати показују да је број регулаторних Т ћелија, као и процентуална заступљеност ових ћелија у популацији CD4<sup>+</sup> Т лимфоцита, највећа у групи пацијенткиња са перзистентном инфекцијом, док је најнижа у групи серопозитивних пацијенткиња где су одбрамбени механизми домаћина ангажовани, а перзистенција није успостављена.



Процентуална заступљеност NK ћелија (CD57+), Б лимфоцита (CD22+) и моноцит/макрофага (CD14+) је виша код серопозитивних него код серонегативних пацијенткиња, што је резултат постојеће/скорашње инфекције. Са друге стране, показано је да *C. trachomatis*, за сада, непознатим механизмима смањује ефекторске функције NK ћелија, а такође је показано да су лиитичка активност и продукција TNF- $\alpha$  и IFN- $\gamma$  смањени код особа инфицираних *C. trachomatis* (235). Истраживања су показала да у одговору на примарну инекцију *C. trachomatis*, као и на реинфекцију значајну улогу имају и Б лимфоцити, који делују синергистички са CD4+ лимфоцитима (170). Међутим, иако инфекција *C. trachomatis* изазива пролиферацију Б лимфоцита, антитела која секретују су поликлонска, односно антитела специфична за хламидијалне антигене чине мање од 1% продукованих имуноглобулина, што указује да је значај хуморалног имунитета у хламидијалним инфекцијама маргиналан (236).

Дендритске ћелије су потентне антиген-презентујуће ћелије које имају кључну улогу у покретању и одржавању ћелијског имунског одговора. Две главне субпопулације дендритских ћелија су мијелоидне CD11c+ (mDC) и плазмоцитоидне CD123+ дендритске ћелије (pDC). mDC секретују високе нивое интерлеукина-12 и имају улогу у појачавању специфичног имунског одговора, док pDC индукују диференцијацију наивних Т лимфоцита у IL-10–продукујуће регулаторне Т ћелије (237, 238). Познато је да се у слузокожи цервикса налази велики број дендритских ћелија. Иако је код жена инфицираних *C. trachomatis* заступљеност појединих субпопулација у цервикалној мукози испитана (179, 180, 239), мало је података о њиховом односу у периферној крви. Резултати нашег истраживања показали су да је однос плазмоцитоидних и мијелоидних ћелија најнижи у групи серопозитивних пацијенткиња, односно да у периферној крви ових пацијенткиња преовлађују мијелоидне дендритске ћелије, док у групи пацијенткиња са перзистентном инфекцијом преовлађују толерогене плазмоцитоидне ћелије које индукују настанак Treg.

Tbet је транскрипциони фактор који је експримиран у различитим типовима ћелија и има улогу у координисању Th1 имунског одговора регулисањем развоја и ефекторских функција појединих популација ћелија имунског одговора (240). Наши резултати су показали да је у групи пацијенткиња са перзистентном инфекцијом број Tbet+ ћелија, као и процентуална заступљеност Tbet+ ћелија у популацији CD4+ Т лимфоцита највиша. Посебно је интересантно да су у овој групи најбројније Tbet+ ћелије које продукују анти-инфламаторне цитокине IL-10 и TGF $\beta$ , док ових ћелија има најмање у групи серопозитивних пацијенткиња, код којих је имунски одговор активан

због постојеће или скорије инфекције *C. trachomatis*. Овај, наизглед неочекиван налаз, можда указује на алтернативну могућност регулације имунског одговора на интрацелуларне агенсе. Наиме, *in vitro* је показано је да током интрацелуларних инфекција протозоама као што су *Toxoplasma gondii* (241) и *Leishmania major* (242), главни ћелијски извор регулаторног IL-10, нису Th2 или Treg ћелије, већ конвенционалне IFN- $\gamma$ -продукујуће T-bet+Foxp3

Th1 ћелије. Такође показано је да T-bet+Foxp3- Th1 ћелије могу, иако ретко симултано, истовремено продуковати и IFN- $\gamma$  и IL-10, мада продукција ових цитокина стриктно прати кинетику имунског одговора, тако да ове ћелије, у раној фази имунског одговора, доминантно продукују IFN- $\gamma$ , док се продукција IL-10 појављује касније током имунског одговора. Ови и слични налази, указују на нову, алтернативну могућност ауто-ограничавања пролонгираног имунског одговора који не захтева посебне подтипове регулаторних ћелија, већ може бити генерисан од стране Th1 ефекторских ћелија као део њиховог одговора на интрацелуларне патогене (243).

Резултати анализе заступљености појединих популација ћелија у периферној крви груписани према клиничком статусу показали су да је у групи пацијенткиња са ТФИ број CD4+ Т лимфоцита нижи него у МСА групи, али да је у ТФИ групи број и процентуална заступљеност регулаторних Т лимфоцита, однос pDC/mDC, број и процентуална заступљеност Tbet+ ћелија, као и број Tbet+IL-10+ и Tbet+TGF $\beta$ + виши него у групи пацијенткиња са МСА. Узимајући у обзир да се највећи број испитаница са перзистентном инфекцијом налази у групи жена са ТФИ, те да је код испитаница са перзистентном инфекцијом у поређењу са серонегативним и серопозитивним испитаницама, утврђена највећа процентуална заступљеност дефинисаних субпопулација лимфоцита и дендритских ћелија, овакав налаз није био изненађујућ, већ је напротив, још једном потврдио да параметри имунског одговора субфертилних испитаница у највећој мери зависе од серолошког статуса хламидијалне инфекције.

## 6. ЗАКЉУЧЦИ

1. Испитанице са субфертилитетом имају висок степен серопозитивности на хламидијалне антигене, при чему испитанице са ТФИ имају већи проценат перзистентних инфекција, док испитанице са СП имају већи проценат испитаница са ранијом инфекцијом.
2. Серумски ниво свих детектованих антитела виши је у групи испитаница са субфертилитетом, при чему испитанице са ТФИ имају највиши серумски ниво анти-cHSP60 антитела, док испитанице са СП имају највиши серумски ниво анти-MOMP антитела.
3. Субфертилне испитанице са перзистентном инфекцијом, како ТФИ, тако и СП, имају највиши ниво испитиваних антитела, при чему је серумски ниво свих испитиваних антитела би највиши у групи пацијенткиња са ТФИ и то како код пацијенткиња са перзистентном инфекцијом, тако и у групи пацијенткиња са ранијом инфекцијом.
4. ROC анализом смо показали да ниво IgA може бити добар маркер за диференцијацију перзистентне инфекције међу пацијенткињама са ТФИ и СП.
5. Серумски ниво већине детектованих цитокина је у односу на контролну групу жена био нижи у обе клиничке групе испитаница, како ТФИ, тако и СП.
6. Серумски ниво већине испитиваних цитокина је био најнижи у групи испитаница са перзистентном инфекцијом и то како код пацијенткиња са ТФИ, тако и код пацијенткиња са СП.
7. Испитанице са перзистентном хламидијалном инфекцијом, поред јасне преваге антиинфламаторних цитокина (IL-10, Th2) показују и умерену доминацију Th17 цитокина.
8. Испитанице са СП имају већу процентуалну заступљеност помагачких и цитотоксичних Т лимфоцита у односу на ТФИ испитанице.
9. У групи ТФИ испитаница показали смо већу процентуалну заступљеност плазмоцитоидних дендритских ћелија, Т регулаторних лимфоцита и конвенционалних Th1 ефекторских ћелије које продукују IL-10 и TGF- $\beta$ .
10. Код испитаница са ранијом инфекцијом утврдили смо највиши проценат помагачких Т лимфоцита.

11. У групи испитаница са перзистентном инфекцијом утврђена је највећа процентуална заступљеност Б лимфоцита, моноцита и НК ћелија, плазмоцитоидних дендритских ћелија, Т регулаторних лимфоцита и конвенционалних Th1 ефекторских ћелије које продукују IL-10 и TGF- $\beta$ .

## 7. ЛІТЕРАТУРА

1. Manavi K. A review on infection with *Chlamydia trachomatis*. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2006;20:941–51.
2. Fox A, Rogers JC, Gilbert J, Morgan S, Davis CH, Knight S, Wyrick PB. Muramic acid is not detectable in *Chlamydia psittaci* or *Chlamydia trachomatis* by gas chromatography-mass spectrometry. *Infect Immun.* 1990;58:835–7.
3. Jacquier N, Viollier PH, Greub G. The role of peptidoglycan in chlamydial cell division: towards resolving the chlamydial anomaly. *FEMS Microbiol Rev.* 2015;39:262–75.
4. Skilton RJ, Cutcliffen LT, Barlow D, Wang Y, Salim O, Lambden PR, Clarke IN. Penicillin induced persistence in *Chlamydia trachomatis*: high quality time lapse video analysis of the developmental cycle. *PLoS One.* 2009;4:e7723
5. Moulder JW. Why is *Chlamydia* sensitive to penicillin in the absence of peptidoglycan? *Infect Agents Dis.* 1993;2:87–99.
6. Brade H, Brade L, Nano FE. Chemical and serological investigations on the genus specific lipopolysaccharide epitope of *Chlamydia*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:2508–12.
7. Baehr W, Zhang YX, Joseph T, Su H, Nano FE, Everett KD, Caldwell HD. Mapping antigenic domains expressed by *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:4000–4.
8. Stephens RS, Kalman S, Lammel C, Fan J, Marathe R, Aravind L, Mitchell W, Olinger L, Tatusov RL, Zhao Q, Koonin EV, Davis RW. Genome sequence of an obligate intracellular pathogen of humans: *Chlamydia trachomatis*. *Science* 1998;282:754–9.
9. Moulder JW. Interaction of chlamydiae and host cells in vitro. *Microbiol Rev.* 1991;55:143–90.

10. Beagley KW, Timms P. Chlamydia trachomatis infection: incidence, health costs and prospects for vaccine development. *J Reprod Immunol.* 2000;48:47–68.
11. Bastidas RJ, Elwell CA, Engel JN, Valdivia RH. Chlamydial intracellular survival strategies. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013;3:a010256.
12. Choroszy-Król IC, Frej-Mądrzak M, Jama-Kmieciak A, Bober T, Jolanta Sarowska J. Characteristics of the Chlamydia trachomatis species - immunopathology and infections. *Adv Clin Exp Med.* 2012;21:799–808.
13. Hammerschlag MR. The intracellular life of chlamydiae. *Semin Pediatr Infect Dis.* 2002;13:239–48.
14. Dautry-Varsat A, Subtil A, Hackstadt T. Recent insights into the mechanisms of Chlamydia entry. *Cell Microbiol.* 2005;7:1714–22.
15. Su H, Raymond L, Rockey DD, Fischer E, Hackstadt T, Caldwell HD. A recombinant Chlamydia trachomatis major outer membrane protein binds to heparan sulfate receptors on epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93:11143–8.
16. Menozzi FD, Pethe K, Bifani P, Soncin F, Brennan MJ, Locht C. Enhanced bacterial virulence through exploitation of host glycosaminoglycans. *Mol Microbiol.* 2002;43:1379–86.
17. Wehrl W, Brinkmann V, Jungblut PR, Meyer TF, Szczeppek AJ. From the inside out—processing of the Chlamydial autotransporter PmpD and its role in bacterial adhesion and activation of human host cells. *Mol Microbiol.* 2004;51:319–34.
18. Fadel S, Eley AJ. Chlamydia trachomatis OmcB protein is a surface-exposed glycosaminoglycan-dependent adhesin. *Med Microbiol.* 2007;56:15–22.
19. Hackstadt T, Rockey DD, Heinzen RA, Scidmore MA. Chlamydia trachomatis interrupts an exocytic pathway to acquire endogenously synthesized sphingomyelin in transit from the Golgi apparatus to the plasma membrane. *EMBO J.* 1996;15:964–77.
20. Scidmore MA, Hackstadt T. Mammalian 14-3-3beta associates with the Chlamydia trachomatis inclusion membrane via its interaction with IncG. *Mol. Microbiol.* 2001;39:1638–50.

21. Rockey DD, Grosenbach D, Hruby DE, Peacock MG, Heinzen RA, Hackstadt T. Chlamydia psittaci IncA is phosphorylated by the host cell and is exposed on the cytoplasmic face of the developing inclusion. *Mol Microbiol.* 1997;24:217–28.
22. Hackstadt T, Rockey DD, Heinzen RA, Scidmore MA. Chlamydia trachomatis interrupts an exocytic pathway to acquire endogenously synthesized sphingomyelin in transit from the Golgi apparatus to the plasma membrane. *EMBO J.* 1996;15:964–77.
23. Moore ER, Fischer ER, Mead DJ, Hackstadt T. The chlamydial inclusion preferentially intercepts basolaterally directed sphingomyelin-containing exocytic vacuoles. *Traffic.* 2008;9:2130–40.
24. Carabeo RA, Mead DJ, Hackstadt T. Golgi-dependent transport of cholesterol to the Chlamydia trachomatis inclusion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:6771–6.
25. Wylie JL, Hatch GM, McClarty G. Host cell phospholipids are trafficked to and then modified by Chlamydia trachomatis. *J Bacteriol.* 1997;179:7233–42.
26. Hackstadt T, Todd WJ, Caldwell HD. Disulfide-mediated interactions of the chlamydial major outer membrane protein: role in the differentiation of chlamydiae? *J Bacteriol.* 1985;161:25–31.
27. Belland RJ, Zhong G, Crane DD, Hogan D, Sturdevant D, Sharma J, Beatty WL, Caldwell HD. Genomic transcriptional profiling of the developmental cycle of Chlamydia trachomatis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:8478–83.
28. Cocchiari JL, Valdivia RH. New insights into Chlamydia intracellular survival mechanisms. *Cell Microbiol.* 2009;11:1571–8.
29. Hybiske K, Stephens RS. Mechanisms of host cell exit by the intracellular bacterium Chlamydia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104:11430–5.
30. Rank RG, Whittimore J, Bowlin AK, Dessus-Babus S, Wyrick PB. Chlamydiae and polymorphonuclear leukocytes: unlikely allies in the spread of chlamydial infection. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2008;54:104–13.

31. Holmes KK, Johnson DW, Floyd TM, Kvale PA. Studies of venereal disease. II. Observations on the incidence, etiology, and treatment of the postgonococcal urethritis syndrome. *JAMA*. 1967;202:467–73.
32. Richmond SJ, Hilton AL, Clarke SK. Chlamydial infection. Role of Chlamydia subgroup A in non-gonococcal and post-gonococcal urethritis. *Br J Vener Dis*. 1972;48:437–44.
33. Matsumoto A, Manire GP. Electron microscopic observations on the effects of penicillin on the morphology of Chlamydia psittaci. *J Bacteriol*. 1970;101:278–85.
34. Galasso GJ, Manire GP. Effect of antiserum and antibiotics on persistent infection of HeLa cells with meningopneumonitis virus. *J Immunol*. 1961;86:382–5.
35. Beatty WL, Morrison RP, Byrne GI. Persistent chlamydiae: from cell culture to a paradigm for chlamydial pathogenesis. *Microbiol Rev*. 1994; 58:686–699.
36. Coles AM, Reynolds DJ, Harper A, Devitt A, Pearce JH. Low-nutrient induction of abnormal chlamydial development: a novel component of chlamydial pathogenesis? *FEMS Microbiol Lett*. 1993;106:193–200.
37. Hanna L, Merigan TC, Jawetz E. Inhibition of TRIC agents by virus induced interferon. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1966;122:417–421.
38. Kazar J, Gillmore JD, Gordon FB. Effect of interferon and interferon inducers on infection with a non-viral intracellular microorganism, *Chlamydia trachomatis*. *Infect Immun*. 1971;3:825–32.
39. Byrne GI, Lehmann LK, Landry GJ. Induction of tryptophan catabolism is the mechanism for gamma-interferon-mediated inhibition of intracellular *Chlamydia psittaci* replication in T24 cells. *Infect Immun*. 1986;53:347–51.
40. Caldwell HD, Wood H, Crane D, Bailey R, Jones RB, Mabey D, Maclean I, Mohammed Z, Peeling R, Roshick C, Schachter J, Solomon AW, Stamm WE, Suchland RJ, Taylor L, West SK, Quinn TC, Belland RJ, McClarty G. Polymorphisms in Chlamydia trachomatis tryptophan synthase genes differentiate between genital and ocular isolates. *J Clin Invest*. 2003;111:1757–69.



41. Beatty WL, Byrne GI, Morrison RP. Morphologic and antigenic characterization of interferon gamma-mediated persistent *Chlamydia trachomatis* infection in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90:3998–4002.
42. Ness RB, Soper DE, Richter HE, Randall H, Peipert JF, Nelson DB, Schubeck D, McNeeley SG, Trout W, Bass DC, Hutchison K, Kip K, Brunham RC. Chlamydia antibodies, chlamydia heat shock protein, and adverse sequelae after pelvic inflammatory disease: the PID Evaluation and Clinical Health (PEACH) Study. *Sex Transm Dis*. 2008;35:129-35.
43. Raulston JE. Response of *Chlamydia trachomatis* serovar E to iron restriction in vitro and evidence for iron-regulated chlamydial proteins. *Infect Immun*. 1997;65:4539–47.
44. Rothermel CD, Rubin BY, Jaffe EA, Murray HW. Oxygen-independent inhibition of intracellular *Chlamydia psittaci* growth by human monocytes and interferon-gamma-activated macrophages. *J Immunol*. 1986;137:689–92.
45. Richmond JS. Division and transmission of inclusions of *Chlamydia trachomatis* in replicating McCoy cell monolayers *FEMS Microbiol Lett* 1985;29: 49–52
46. Guseva NV, Knight ST, Whittimore JD, Wyrick PB. Primary cultures of female swine genital epithelial cells in vitro: a new approach for the study of hormonal modulation of *Chlamydia* infection. *Infect Immun*. 2003;71:4700–10.
47. Deka S, Vanover J, Dessus-Babus S, Whittimore J, Howett MK, Wyrick PB, Schoborg RV. *Chlamydia trachomatis* enters a viable but non-cultivable (persistent) state within herpes simplex virus type 2 (HSV-2) co-infected host cells. *Cell Microbiol*. 2006;8:149–62.
48. Deka S, Vanover J, Sun J, Kintner J, Whittimore J, Schoborg RV. An early event in the herpes simplex virus type-2 replication cycle is sufficient to induce *Chlamydia trachomatis* persistence. *Cell Microbiol*. 2007;9:725–37.
49. Mathews S, George C, Flegg C, Stenzel D, Timms P. Differential expression of *ompA*, *ompB*, *pyk*, *nlpD* and *Cpn0585* genes between normal and interferon-gamma treated cultures of *Chlamydia pneumoniae*. *Microb Pathog*. 2001;30:337–45.

50. Workowski KA, Lampe MF, Wong KG, Watts MB, Stamm WE. Long-term eradication of *Chlamydia trachomatis* genital infection after antimicrobial therapy. Evidence against persistent infection. *JAMA*. 1993;270:2071–5.
51. Ficarra M, Ibane JS, Poretta C, Ma L, Myers L, Taylor SN, Greene S, Smith B, Hagensee M, Martin DH, Quayle AJ. A distinct cellular profile is seen in the human endocervix during *Chlamydia trachomatis* infection. *Am J Reprod Immunol*. 2008;60:415–25.
52. Wyrick PB, Knight ST. Pre-exposure of infected human endometrial epithelial cells to penicillin in vitro renders *Chlamydia trachomatis* refractory to azithromycin. *J Antimicrob Chemother*. 2004;54:79–85.
53. Caldwell HD, Kromhout J, Schachter J. Purification and partial characterization of the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis*. *Infect Immun*. 1981;31:1161–76.
54. Hatch TP, Vance DW Jr, Al-Hossainy E. Identification of a major envelope protein in *Chlamydia* spp. *J Bacteriol*. 1981;146:426–9.
55. Nikaido H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2003;67:593–656.
56. Wyllie S, Ashley RH, Longbottom D, Herring AJ. The major outer membrane protein of *Chlamydia psittaci* functions as a porin-like ion channel. *Infect Immun*. 1998;66:5202–7.
57. Brunham RC, Peeling RW. *Chlamydia trachomatis* antigens: role in immunity and pathogenesis. *Infect Agents Dis*. 1994;3:218–33.
58. Millman KL, Tavaré S, Dean D. Recombination in the *ompA* gene but not the *omcB* gene of *Chlamydia* contributes to serovar-specific differences in tissue tropism, immune surveillance, and persistence of the organism. *J Bacteriol*. 2001;183:5997–6008.
59. Dean D, Bruno WJ, Wan R, Gomes JP, Devignot S, Mehari T, de Vries HJ, Morré SA, Myers G, Read TD, Spratt BG. Predicting phenotype and emerging strains among *Chlamydia trachomatis* infections. *Emerg Infect Dis*. 2009;15:1385–94.

60. Lampe MF, Stamm WE. Purification of *Chlamydia trachomatis* strains in mixed infection by monoclonal antibody neutralization. *J Clin Microbiol.* 1994;32:533–5.
61. Vandahl BB, Birkelund S, Christiansen G. Genome and proteome analysis of *Chlamydia*. *Proteomics.* 2004;4:2831–42.
62. Henderson IR, Nataro JP. Virulence functions of autotransporter proteins. *Infect Immun.* 2001 Mar;69:1231-43.
63. Henderson IR, Lam AC. Polymorphic proteins of *Chlamydia* spp.– autotransporters beyond the Proteobacteria. *Trends Microbiol.* 2001;9:573–8.
64. Peeling RW, Kimani J, Plummer F, Maclean I, Cheang M, Bwayo J, Brunham RC. Antibody to chlamydial hsp60 predicts an increased risk for chlamydial pelvic inflammatory disease. *J Infect Dis.* 1997;175:1153–8.
65. Peeling RW, Patton DL, Cosgrove Sweeney YT, Cheang MS, Lichtenwalner AB, Brunham RC, Stamm WE. Antibody response to the chlamydial heat-shock protein 60 in an experimental model of chronic pelvic inflammatory disease in monkeys (*Macaca nemestrina*). *J Infect Dis.* 1999;180:774–9.
66. Eckert LO, Hawes SE, Wölner-Hanssen P, Money DM, Peeling RW, Brunham RC, Stevens CE, Eschenbach DA, Stamm WE. Prevalence and correlates of antibody to chlamydial heat shock protein in women attending sexually transmitted disease clinics and women with confirmed pelvic inflammatory disease. *J Infect Dis.* 1997;175:1453–8.
67. Ness RB, Soper DE, Richter HE, Randall H, Peipert JF, Nelson DB, Schubeck D, McNeeley SG, Trout W, Bass DC, Hutchison K, Kip K, Brunham RC. *Chlamydia* antibodies, *chlamydia* heat shock protein, and adverse sequelae after pelvic inflammatory disease: the PID Evaluation and Clinical Health (PEACH) Study. *Sex Transm Dis.* 2008;35:129–35.
68. Ault KA, Statland BD, King MM, Dozier DI, Joachims ML, Gunter J. Antibodies to the chlamydial 60 kilodalton heat shock protein in women with tubal factor infertility. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 1998;6:163–7.

69. Money DM, Hawes SE, Eschenbach DA, Peeling RW, Brunham R, Wölner-Hanssen P, Stamm WE. Antibodies to the chlamydial 60 kd heat-shock protein are associated with laparoscopically confirmed perihepatitis. *Am J Obstet Gynecol.* 1997;176:870–7.
70. Paavonen J, Lehtinen M. Interactions between human papillomavirus and other sexually transmitted agents in the etiology of cervical cancer. *Curr Opin Infect Dis.* 1999;12:67–71.
71. Kinnunen A, Molander P, Morrison R, Lehtinen M, Karttunen R, Tiitinen A, Paavonen J, Surcel HM. Chlamydial heat shock protein 60–specific T cells in inflamed salpingeal tissue. *Fertil Steril.* 2002;77:162–6.
72. 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;15:1484–9.
73. Lichtenwalner AB, Patton DL, Van Voorhis WC, Sweeney YT, Kuo CC. 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;72:1159–61.
74. Debattista J, Timms P, Allan J, Allan J. Reduced levels of gamma-interferon secretion in response to chlamydial 60 kDa heat shock protein amongst women with pelvic inflammatory disease and a history of repeated Chlamydia trachomatis infections. *Immunol Lett.* 2002;81:205–10.
75. Brunham RC, Kimani J, Bwayo J, Maitha G, Maclean I, Yang C, Shen C, Roman S, Nagelkerke NJ, Cheang M, Plummer FA. The epidemiology of Chlamydia trachomatis within a sexually transmitted diseases core group. *J Infect Dis.* 1996;173:950–6.
76. Campanella C, Marino Gammazza A, Mularoni L, Cappello F, Zummo G, Di Felice V. A comparative analysis of the products of GROEL-1 gene from Chlamydia trachomatis serovar D and the HSP60 var1 transcript from Homo sapiens suggests a possible autoimmune response. *Int J Immunogenet.* 2009;36:73–8.
77. Yi Y, Yang X, Brunham RC. Autoimmunity to heat shock protein 60 and antigen-specific production of interleukin-10. *Infect Immun.* 1997;65:1669–74.

78. Cornelis GR, Van Gijsegem F. Assembly and function of type III secretory systems. *Annu Rev Microbiol.* 2000;54:735–74.
79. Cevenini R, Donati M, Sambri V. Chlamydia trachomatis - the agent. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2002;16:761–73.
80. Clifton DR, Fields KA, Grieshaber SS, Dooley CA, Fischer ER, Mead DJ, Carabeo RA, Hackstadt T. A chlamydial type III translocated protein is tyrosine-phosphorylated at the site of entry and associated with recruitment of actin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101:10166–71.
81. Jewett TJ, Fischer ER, Mead DJ, Hackstadt T. Chlamydial TARP is a bacterial nucleator of actin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103:15599–604.
82. Clifton DR, Dooley CA, Grieshaber SS, Carabeo RA, Fields KA, Hackstadt T. Tyrosine phosphorylation of the chlamydial effector protein Tarp is species specific and not required for recruitment of actin. *Infect Immun.* 2005;73:3860–8.
83. Carlson JH, Porcella SF, McClarty G, Caldwell HD. Comparative genomic analysis of Chlamydia trachomatis oculotropic and genitotropic strains. *Infect Immun.* 2005;73:6407–18.
84. Bannantine JP, Stamm WE, Suchland RJ, Rockey DD. Chlamydia trachomatis IncA is localized to the inclusion membrane and is recognized by antisera from infected humans and primates. *Infect Immun.* 1998;66:6017–21.
85. Hackstadt T, Scidmore–Carlson MA, Shaw EI, Fischer ER. The Chlamydia trachomatis IncA protein is required for homotypic vesicle fusion. *Cell Microbiol.* 1999;1:119–30.
86. Suchland RJ, Jeffrey BM, Xia M, Bhatia A, Chu HG, Rockey DD, Stamm WE. Identification of concomitant infection with Chlamydia trachomatis IncA-negative mutant and wild-type strains by genomic, transcriptional, and biological characterizations. *Infect Immun.* 2008;76:5438–46.
87. Geisler WM, Suchland RJ, Rockey DD, Stamm WE. Epidemiology and clinical manifestations of unique Chlamydia trachomatis isolates that occupy nonfusogenic inclusions. *J Infect Dis.* 2001;184:879–84.

88. Scidmore-Carlson MA, Shaw EI, Dooley CA, Fischer ER, Hackstadt T. Identification and characterization of a *Chlamydia trachomatis* early operon encoding four novel inclusion membrane proteins. *Mol Microbiol.* 1999;33:753–65.
89. Kawa DE, Stephens RS. Antigenic topology of chlamydial PorB protein and identification of targets for immune neutralization of infectivity. *J Immunol.* 2002;168:5184–91.
90. Chen D, Lei L, Lu C, Flores R, DeLisa MP, Roberts TC, Romesberg FE, Zhong G. Secretion of the chlamydial virulence factor CPAF requires the Sec-dependent pathway. *Microbiology.* 2010;156:3031–40.
91. Kumar Y, Valdivia RH. Actin and intermediate filaments stabilize the *Chlamydia trachomatis* vacuole by forming dynamic structural scaffolds. *Cell Host Microbe.* 2008;4:159–69.
92. Ying S, Pettengill M, Latham ER, Walch A, Ojcius DM, Häcker G. Premature apoptosis of *Chlamydia*-infected cells disrupts chlamydial development. *J Infect Dis.* 2008;198:1536–44.
93. Pirbhai M, Dong F, Zhong Y, Pan KZ, Zhong G. The secreted protease factor CPAF is responsible for degrading pro-apoptotic BH3-only proteins in *Chlamydia trachomatis*-infected cells. *J Biol Chem.* 2006;281:31495-501.
94. Read TD, Brunham RC, Shen C, Gill SR, Heidelberg JF, White O, Hickey EK, Peterson J, Utterback T, Berry K, Bass S, Linher K, Weidman J, Khouri H, Craven B, Bowman C, Dodson R, Gwinn M, Nelson W, DeBoy R, Kolonay J, McClarty G, Salzberg SL, Eisen J, Fraser CM. Genome sequences of *Chlamydia trachomatis* MoPn and *Chlamydia pneumoniae* AR39. *Nucleic Acids Res.* 2000;28:1397–406.
95. Carlson JH, Hughes S, Hogan D, Cieplak G, Sturdevant DE, McClarty G, Caldwell HD, Belland RJ. Polymorphisms in the *Chlamydia trachomatis* cytotoxin locus associated with ocular and genital isolates. *Infect Immun.* 2004;72:7063–72.
96. Fehlner-Gardiner C, Roshick C, Carlson JH, Hughes S, Belland RJ, Caldwell HD, McClarty G. Molecular basis defining human *Chlamydia trachomatis* tissue tropism. A possible role for tryptophan synthase. *J Biol Chem.* 2002;277:26893–903.

97. Dugan J, Rockey DD, Jones L, Andersen AA. Tetracycline resistance in *Chlamydia suis* mediated by genomic islands inserted into the chlamydial *inv*-like gene. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48:3989–95.
98. Baehr W, Zhang YX, Joseph T, Su H, Nano FE, Everett KD, Caldwell HD. Mapping antigenic domains expressed by *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988;85:4000–4.
99. Wang SP, Grayston JT. Three new serovars of *Chlamydia trachomatis*: Da, Ia, and L2a. *J Infect Dis.* 1991;163:403–5.
100. Brunham R, Yang C, Maclean I, Kimani J, Maitha G, Plummer F. *Chlamydia trachomatis* from individuals in a sexually transmitted disease core group exhibit frequent sequence variation in the major outer membrane protein (*omp1*) gene. *J Clin Invest.* 1994;94:458–63.
101. Peipert JF. Clinical practice. Genital chlamydial infections. *N Engl J Med.* 2003;349:2424–30.
102. Morré SA, van den Brule AJ, Rozendaal L, Boeke AJ, Voorhorst FJ, de Blok S, Meijer CJ. The natural course of asymptomatic *Chlamydia trachomatis* infections: 45% clearance and no development of clinical PID after one-year follow-up. *Int J STD AIDS.* 2002;13 Suppl 2:12–8.
103. Linhares IM, Witkin SS. Immunopathogenic consequences of *Chlamydia trachomatis* 60 kDa heat shock protein expression in the female reproductive tract. *Cell Stress Chaperones.* 2010;15:467–73.
104. Kokcu A, Yavuz E, Celik H, Bildircin D. A panoramic view to relationships between reproductive failure and immunological factors. *Arch Gynecol Obstet.* 2012;286:1283–9.
105. Bébéar C, de Barbeyrac B. Genital *Chlamydia trachomatis* infections. *Clin Microbiol Infect.* 2009;15:4–10.
106. Paavonen J, Eggert-Kruse W. *Chlamydia trachomatis*: impact on human reproduction. *Hum Reprod Update.* 1999;5:433–47.

107. Vigil P, Tapia A, Zacharias S, Riquelme R, Salgado AM, Varleta J. First-trimester pregnancy loss and active *Chlamydia trachomatis* infection: correlation and ultrastructural evidence. *Andrologia*. 2002;34:373–8.
108. Rastogi S, Salhan S, Mittal A. Detection of *Chlamydia trachomatis* antigen in spontaneous abortions. Is this organism a primary or secondary indicator of risk? *Br J Biomed Sci*. 2000;57:126–9.
109. Witkin SS, Ledger WJ. Antibodies to *Chlamydia trachomatis* in sera of women with recurrent spontaneous abortions. *Am J Obstet Gynecol*. 1992;167:135–9.
110. Gibbs RS. The origins of stillbirth: infectious diseases. *Semin Perinatol*. 2002;26:75–8.
111. Ryan GM Jr, Abdella TN, McNeeley SG, Baselski VS, Drummond DE. *Chlamydia trachomatis* infection in pregnancy and effect of treatment on outcome. *Am J Obstet Gynecol*. 1990;162:34–9.
112. Alger LS, Lovchik JC, Hebel JR, Blackmon LR, Crenshaw MC. The association of *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, and group B streptococci with preterm rupture of the membranes and pregnancy outcome. *Am J Obstet Gynecol*. 1988;159:397–404.
113. Jain S. Perinatally acquired *Chlamydia trachomatis* associated morbidity in young infants. *J Matern Fetal Med*. 1999;8:130–3.
114. Frommell GT, Rothenberg R, Wang S, McIntosh K. Chlamydial infection of mothers and their infants. *J Pediatr*. 1979;95:28–32.
115. Hammerschlag MR, Cummings C, Roblin PM, Williams TH, Delke I. Efficacy of neonatal ocular prophylaxis for the prevention of chlamydial and gonococcal conjunctivitis. *N Engl J Med*. 1989;320:769–72.
116. Hammerschlag MR, Chandler JW, Alexander ER, English M, Koutsky L. Longitudinal studies on chlamydial infections in the first year of life. *Pediatr Infect Dis*. 1982;1:395–401



117. Parks KS, Dixon PB, Richey CM, Hook EW 3rd. Spontaneous clearance of *Chlamydia trachomatis* infection in untreated patients. *Sex Transm Dis* 1997;24:229–35.
118. Geisler WM, Wang C, Morrison SG, Black CM, Bandea CI, Hook EW 3rd. The natural history of untreated *Chlamydia trachomatis* infection in the interval between screening and returning for treatment. *Sex Transm Dis* 2008;35:119–23.
119. Joyner JL, Douglas JM Jr, Foster M, Judson FN. Persistence of *Chlamydia trachomatis* infection detected by polymerase chain reaction in untreated patients. *Sex Transm Dis* 2002;29:196–200.
120. Rogers SM, Miller WC, Turner CF, et al. Concordance of *Chlamydia trachomatis* infections within sexual partnerships. *Sex Transm Infect* 2008;84:23–8.
121. van den Brule AJ, Munk C, Winther JF, et al. Prevalence and persistence of asymptomatic *Chlamydia trachomatis* infections in urine specimens from Danish male military recruits. *Int J STD AIDS* 2002;13(suppl 2):19–22.
122. Sheffield JS, Andrews WW, Klebanoff MA, et al. Spontaneous resolution of asymptomatic *Chlamydia trachomatis* in pregnancy. *Obstet Gynecol* 2005;105:557–62.
123. 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.
124. McCormack WM, Alpert S, McComb DE, Nichols RL, Semine DZ, Zinner SH. Fifteen-month follow-up study of women infected with *Chlamydia trachomatis*. *N Engl J Med* 1979;300:123–5.
125. Molano M, Meijer CJ, Weiderpass E, et al. The natural course of *Chlamydia trachomatis* infection in asymptomatic Colombian women: a 5-year follow-up study. *J Infect Dis* 2005;191:907–916.
126. Agrawal T, Vats V, Salhan S, Mittal A. Mucosal and peripheral immune responses to chlamydial heat shock proteins in women infected with *Chlamydia trachomatis*. *Clin Exp Immunol* 2007;148:461–8.

127. Ghaem-Maghani S, Ratti G, Ghaem-Maghani M, et al. Mucosal and systemic immune responses to plasmid protein pgp3 in patients with genital and ocular *Chlamydia trachomatis* infection. Clin Exp Immunol 2003;132:436–442.
128. Mittal A, Kapur S, Gupta S. Host immune response in chlamydial cervicitis. Br J Biomed Sci 1996;53:214–20.
129. Pate MS, Hedges SR, Sibley DA, Russell MW, Hook EW 3rd, Mestecky J. Urethral cytokine and immune responses in *Chlamydia trachomatis* infected males. Infect Immun 2001;69:7178–81.
130. Wang C, Tang J, Crowley-Nowick PA, Wilson CM, Kaslow RA, Geisler WM. Interleukin (IL)-2 and IL-12 responses to *Chlamydia trachomatis* infection in adolescents. Clin Exp Immunol 2005;142:548–54.
131. Ghanem KG, Shah N, Klein RS, et al. Influence of sex hormones, HIV status, and concomitant sexually transmitted infection on cervicovaginal inflammation. J Infect Dis 2005;191:358–66.
132. Mittal A, Rastogi S, Reddy BS, Verma S, Salhan S, Gupta E. Enhanced immunocompetent cells in chlamydial cervicitis. J Reprod Med 2004;49:671–7.
133. Cohen CR, Koochesfahani KM, Meier AS, et al. Immunoepidemiologic profile of *Chlamydia trachomatis* infection: importance of heat-shock protein 60 and interferon-gamma. J Infect Dis 2005;192:591–9.
134. Geisler WM, Tang J, Wang C, Wilson CM, Kaslow RA. Epidemiological and genetic correlates of incident *Chlamydia trachomatis* infection in North American adolescents. J Infect Dis 2004;190:1723–9.
135. Wang C, Tang J, Geisler WM, Crowley-Nowick PA, Wilson CM, Kaslow RA. Human leukocyte antigen and cytokine gene variants as predictors of recurrent *Chlamydia trachomatis* infection in high-risk adolescents. J Infect Dis 2005;191:1084–92.
136. Dean D, Suchland RJ, Stamm WE. Evidence for long-term cervical persistence of *Chlamydia trachomatis* by omp1 genotyping. J Infect Dis 2000;182:909–16.

137. Gomes JP, Borrego MJ, Atik B, Santo I, et al. Correlating *Chlamydia trachomatis* infectious load with urogenital ecological success and disease pathogenesis. *Microbes Infect* 2006;8:16–26.
138. Barron AL, Rank RG, Moses EB. Immune response in mice infected in the genital tract with mouse pneumonitis agent (*Chlamydia trachomatis* biovar). *Infect Immun* 1984;44:82–5.
139. Ramsey KH, Newhall WJ, Rank RG. Humoral immune response to chlamydial genital infection of mice with the agent of mouse pneumonitis. *Infect Immun* 1989;57:2441–6.
140. Rank RG, Batteiger BE, Soderberg LSF. Susceptibility to reinfection after a primary chlamydial genital infection. *Infect Immun* 1988;56: 2243–9.
141. Batteiger BE, Rank RG. Analysis of the humoral immune response in chlamydial genital infection in guinea pigs. *Infect Immun* 1987;55:1767–73.
142. Darville T, Andrews CW Jr, Laffoon KK, Shymasani W, Kishen LR, Rank RG. Mouse strain-dependent variation in the course and outcome of chlamydial genital tract infection is associated with differences in host response. *Infect Immun*. 1997;65:3065–73.
143. Datta SD, Sternberg M, Johnson RE, et al. Gonorrhea and chlamydia in the United States among persons 14 to 38 years of age, 1999 to 2002. *Ann Intern Med*. 2007;147:89–96.
144. Barnes RC, Katz BP, Rolfs RT, Batteiger BE, Caine VA, Jones RB. Quantitative culture of endocervical *Chlamydia trachomatis*. *J Clin Microbiol*. 1990;28:774–780.
145. Lee V, Tobin JM, Foley E. Relationship of cervical ectopy to chlamydia infection in young women. *J Fam Plann Reprod Health Care*. 2006;32:104–106.
146. Katz BP, Batteiger BE, Jones RB. Effect of prior sexually transmitted disease on the isolation of *Chlamydia trachomatis*. *Sex Transm Dis*. 1987;14:160–4.
147. Hiltunen-Back E, Haikala O, Kautiainen H, Reunala T. A nationwide survey of *Chlamydia trachomatis* infection in Finland. *Sex Transm Dis*. 2001; 28:252–8.

148. Rietmeijer CA, Van Bemmelen R, Judson FN, Douglas MJ. Incidence and repeat infection rates of *Chlamydia trachomatis* among male and female patients in an STD clinic: implications for screening and rescreening. *Sex Transm Dis.* 2002;29:65–72.
149. Brunham RC, Kimani J, Bwayo J, Maitha G, Maclean I, Yang C, Shen C, Roman S, Nagelkerke NJ, Cheang M, Plummer FA. The epidemiology of *Chlamydia trachomatis* within a sexually transmitted diseases core group. *J Infect Dis.* 1996 Apr;173(4):950–6.
150. Burstein GR, Zenilman JM, Gaydos CA, Diener-West M, Howell MR, Brathwaite W, Quinn TC. Predictors of repeat *Chlamydia trachomatis* infections diagnosed by DNA amplification testing among inner city females. *Sex Transm Infect.* 2001;77:26-32.
151. Blythe MJ, Katz BP, Batteiger BE, Ganser JA, Jones RB. Recurrent genitourinary chlamydial infections in sexually active female adolescents. *J Pediatr* 1992; 121:487–93.
152. Gomes JP, Borrego MJ, Atik B, et al. Correlating *Chlamydia trachomatis* infectious load with urogenital ecological success and disease pathogenesis. *Microbes Infect* 2006;8:16–26.
153. Geisler WM, Lensing SY, Press CG, Hook EW 3rd. Spontaneous resolution of genital *Chlamydia trachomatis* infection in women and protection from reinfection. *J Infect Dis.* 2013;207:1850–6.
154. Su H, Morrison R, Messer R, Whitmire W, Hughes S, Caldwell HD. The effect of doxycycline treatment on the development of protective immunity in a murine model of chlamydial genital infection. *J Infect Dis* 1999; 180:1252–8.
155. Brunham RC, Martin DH, Kuo C-C, et al. Cellular immune response during uncomplicated genital infection with *Chlamydia trachomatis* in humans. *Infect Immun* 1981; 34:98–104.
156. Brunham RC, Pourbohloul B, Mak S, White R, Rekart ML. The unexpected impact of a *Chlamydia trachomatis* infection control program on susceptibility to reinfection. *J Infect Dis* 2005; 192:1836–44.

157. Génèreux M, Leclerc P, Bédard L, Allard R. Upsurge of chlamydial reinfection in a large Canadian city: an indication of suboptimal chlamydia screening practices? *Can J Public Health* 2010;101:420–4.
158. Brunham RC, Rekart ML. The arrested immunity hypothesis and the epidemiology of chlamydia control. *Sex Transm Dis* 2008; 35:53–4.
159. Rekart ML, Gilbert M, Meza R, et al. Chlamydia public health programs and the epidemiology of pelvic inflammatory disease and ectopic pregnancy. *J Infect Dis* 2013; 207:30–8.
160. Arno JN, Ricker VA, Batteiger BE, Katz BP, Caine VA, Jones RB. Interferon gamma in endocervical secretions of women infected with *Chlamydia trachomatis*. *J Infect Dis* 1990;162:1385–9.
161. Agrawal T, Vats V, Wallace PK, Salhan S, Mittal A. Cervical cytokine responses in women with primary or recurrent chlamydial infection. *J Interferon Cytokine Res* 2007; 27:221–6.
162. Scott ME, Ma Y, Farhat S, Shiboski S, Moscicki AB. Covariates of cervical cytokine mRNA expression by real-time PCR in adolescents and young women: effects of *Chlamydia trachomatis* infection, hormonal contraception and smoking. *J Clin Immunol* 2006;26:222–32.
163. Brunham RC, Kuo C-C, Cles L, Holmes KK. Correlation of host immune response with quantitative recovery of *Chlamydia trachomatis* from the human endocervix. *Infect Immun* 1983;39:1491–1494.
164. Johnson RM. Murine oviduct epithelial cell cytokine responses to *Chlamydia muridarum* infection include interleukin-12-p70 secretion. *Infect Immun*. 2004;72:3951–60.
165. Ortiz L, Demick KP, Petersen JW, Polka M, Rudersdorf RA, Van der Pol B, Jones R, Angevine M, DeMars R. Chlamydia trachomatis major outer membrane protein (MOMP) epitopes that activate HLA class II-restricted T cells from infected humans. *J Immunol*. 1996;157:4554–67.

166. Kim SK, Angevine M, Demick K, et al. Induction of HLA class I-restricted CTLs specific for the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis* in human genital infection. *J Immunol.* 1999;162:6855–66.
167. Stephens RS. The cellular paradigm of chlamydial pathogenesis. *Trends Microbiol* 2003;11:44–51.
168. Rasmussen SJ, Eckmann L, Quayle AJ, et al. Secretion of proinflammatory cytokines by epithelial cells in response to *Chlamydia* infection suggests a central role for epithelial cells in chlamydial pathogenesis. *J Clin Invest.* 1997;99:77–87.
169. Darville T, Hiltke TJ. Pathogenesis of genital tract disease due to *Chlamydia trachomatis*. *J Infect Dis.* 2010;201 Suppl 2:S114–25.
170. Morrison SG, Su H, Caldwell HD, Morrison RP. Immunity to murine *Chlamydia trachomatis* genital tract reinfection involves B cells and CD4(+) T cells but not CD8(+) T cells. *Infect Immun* 2000;68:6979–87.
171. Grayston JT, Wang SP, Yeh LJ, Kuo CC. Importance of reinfection in the pathogenesis of trachoma. *Rev Infect Dis.* 1985;7:717–725.
172. Watkins NG, Hadlow WJ, Moos AB, Caldwell HD. Ocular delayed hypersensitivity: a pathogenetic mechanism of chlamydial conjunctivitis in guinea pigs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986;83:7480–4.
173. Kinnunen A, Surcel HM, Halttunen M, Tiitinen A, Morrison RP, Morrison SG, Koskela P, Lehtinen M, Paavonen J. *Chlamydia trachomatis* heat shock protein-60 induced interferon-gamma and interleukin-10 production in infertile women. *Clin Exp Immunol.* 2003;131:299–303.
174. Cruz A, Khader SA, Torrado E, et al. Cutting edge: IFN-gamma regulates the induction and expansion of IL-17-producing CD4 T cells during mycobacterial infection. *J Immunol.* 2006;177:1416–20.
175. Benwell RK, Lee DR. Essential and synergistic roles of IL1 and IL6 in human Th17 differentiation directed by TLR ligand-activated dendritic cells. *Clin Immunol.* 2010;134:178–87.

176. Beatty WL, Morrison RP, Byrne GI. Immunolectron-microscopic quantitation of differential levels of chlamydial proteins in a cell culture model of persistent *Chlamydia trachomatis* infection. *Infect Immun*. 1994;62:4059–62.
177. Beatty WL, Byrne GI, Morrison RP. Repeated and persistent infection with *Chlamydia* and the development of chronic inflammation and disease. *Trends Microbiol*. 1994;2:94–8.
178. Kinnunen A, Paavonen J, Surcel HM. Heat shock protein 60 specific T-cell response in chlamydial infections. *Scand J Immunol*. 2001;54:76–81.
179. Agrawal T, Vats V, Wallace PK, Salhan S, Mittal A. Role of cervical dendritic cell subsets, co-stimulatory molecules, cytokine secretion profile and beta-estradiol in development of sequelae to *Chlamydia trachomatis* infection. *Reprod Biol Endocrinol*. 2008;6:46.
180. Agrawal T, Vats V, Wallace PK, Singh A, Salhan S, Mittal A. Recruitment of myeloid and plasmacytoid dendritic cells in cervical mucosa during *Chlamydia trachomatis* infection. *Clin Microbiol Infect*. 2009;15:50-9.
181. Rank RG, Bowlin AK, Kelly KA. Characterization of lymphocyte response in the female genital tract during ascending chlamydial genital infection in the guinea pig model. *Infect Immun* 2000; 68:5293–8.
182. Haggerty CL, Gottlieb SL, Taylor BD, Low N, Xu F, Ness RB. Risk of sequelae after *Chlamydia trachomatis* genital infection in women. *J Infect Dis*. 2010;201 Suppl 2:S134–55.
183. Beatty WL, Belanger TA, Desai AA, Morrison RP, Byrne GI. Role of tryptophan in gamma interferon-mediated chlamydial persistence. *Ann N Y Acad Sci*. 1994 Aug 15;730:304–6.
184. Beatty WL, Belanger TA, Desai AA, Morrison RP, Byrne GI. Tryptophan depletion as a mechanism of gamma interferon-mediated chlamydial persistence. *Infect Immun*. 1994;62:3705–11.
185. Beatty WL, Morrison RP, Byrne GI. Reactivation of persistent *Chlamydia trachomatis* infection in cell culture. *Infect Immun*. 1995;63:199–205.

186. CDC (ed) (2003) Sexually transmitted disease surveillance 2002. Department of Health and Human Services, Atlanta, Georgia. <http://www.cdc.gov/std/stats02/default.htm>
187. CDC (2007) National Surveillance Data for Chlamydia, Gonorrhea, and Syphilis—Trends in reportable sexually transmitted diseases in the United States, 2006
188. ECDC (2008) Review of chlamydia control activities in EU countries Technical Report, Stockholm. <http://data.euro.who.int/HEN/Search/SearchTitle.aspx?Healthtopic=Governance%20and%20stewardship&SourceEvidenceId=12>
189. Gaydos CA, Howell MR, Pare B, Clark KL, Ellis DA, Hendrix RM, Gaydos JC, McKee KT Jr, Quinn TC (1998) *Chlamydia trachomatis* infections in female military recruits. *N Engl J Med* 339:739–44
190. Miller WC, Ford CA, Morris M, Handcock MS, Schmitz JL, Hobbs MM, Cohen MS, Harris KM, Udry JR (2004) Prevalence of chlamydial and gonococcal infections among young adults in the United States. *JAMA* 291:2229–2236
191. Baud D, Regan L, Greub G. Emerging role of Chlamydia and Chlamydia-like organisms in adverse pregnancy outcomes. *Curr Opin Infect Dis.* 2008;21:70–6
192. Mårdh PA. Tubal factor infertility, with special regard to chlamydial salpingitis. *Curr Opin Infect Dis.* 2004;17:49–52.
193. Darville T. Chlamydia trachomatis infections in neonates and young children. *Semin Pediatr Infect Dis.* 2005 Oct;16(4):235–44.
194. Wilkowska-Trojnieł M, Zdrodowska-Stefanow B, Ostaszewska-Puchalska I, Redzko S, Przepieć J, Zrodowski M The influence of Chlamydia trachomatis infection on spontaneous abortions. *Adv Med Sci.* 2009;54:86–90.
195. den Hartog JE, Morré SA, Land JA. Chlamydia trachomatis-associated tubal factor subfertility: Immunogenetic aspects and serological screening. *Hum Reprod Update.* 2006;12:719–30.
196. den Hartog JE, Lardenoije CM, Severens JL, Land JA, Evers JL, Kessels AG. Screening strategies for tubal factor subfertility. *Hum Reprod.* 2008;23:1840–8.



197. Tiitinen A, Surcel HM, Halttunen M, Birkelund S, Bloigu A, Christiansen G, Koskela P, Morrison SG, Morrison RP, Paavonen J. Chlamydia trachomatis and chlamydial heat shock protein 60-specific antibody and cell-mediated responses predict tubal factor infertility. *Hum Reprod.* 2006;21:1533–8.
198. Thangappah RB, Paramasivan CN, Narayanan S. Evaluating PCR, culture and histopathology in the diagnosis of female genital tuberculosis. *Indian J Med Res.* 2011;134:40–46
199. Clausen HF, Fedder J, Drasbek M, Nielsen PK, Toft B, Ingerslev HJ, Birkelund S, Christiansen G. Serological investigation of *Mycoplasma genitalium* in infertile women. *Hum Reprod.* 2001;16:1866–74
200. Kodaman PH, Arici A, Seli E. Evidence-based diagnosis and management of tubal factor infertility. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2004;16:221–9.
201. Kari L, Whitmire WM, Crane DD, Reveneau N, Carlson JH, Goheen MM, Peterson EM, Pal S, de la Maza LM, Caldwell HD. Chlamydia trachomatis native major outer membrane protein induces partial protection in nonhuman primates: implication for a trachoma transmission-blocking vaccine. *J Immunol.* 2009;182:8063–70.
202. Pal S, Peterson EM, de la Maza LM. Vaccination with the Chlamydia trachomatis major outer membrane protein can elicit an immune response as protective as that resulting from inoculation with live bacteria. *Infect Immun.* 2005;73:8153–60.
203. Arno JN, Yuan Y, Cleary RE, Morrison RP. Serologic responses of infertile women to the 60-kd chlamydial heat shock protein (hsp60). *Fertil Steril.* 1995;64:730–5.
204. Clad A, Petersen EE, Dettlaff S. Antibodies to Chlamydia trachomatis heat shock protein 60 (cHSP60) and Chlamydia trachomatis major outer membrane protein (MOMP) in women with different tubal status. *Clin Lab.* 2003;49:269–71.
205. Bax CJ, Dörr PJ, Trimpos JB, Spaargaren J, Oostvogel PM, Peña AS, Morré SA. Chlamydia trachomatis heat shock protein 60 (cHSP60) antibodies in women without and with tubal pathology using a new commercially available assay. *Sex Transm Infect.* 2004;80:415–6.

206. Hjelholt A, Christiansen G, Johannesson TG, Ingerslev HJ, Birkelund S. Tubal factor infertility is associated with antibodies against *Chlamydia trachomatis* heat shock protein 60 (HSP60) but not human HSP60. *Hum Reprod.* 2011;26:2069–76.
207. Witkin SS, Ledger WJ. Antibodies to *Chlamydia trachomatis* in sera of women with recurrent spontaneous abortions. *Am J Obstet Gynecol.* 1992;167:135–9.
208. Baud D, Regan L, Greub G. Comparison of five commercial serological tests for the detection of anti-*Chlamydia trachomatis* antibodies. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2010;29:669–75.
209. Daponte A, Pournaras S, Deligeoroglou E, Skentou H, Messinis IE. Serum interleukin-1 $\beta$ , interleukin-8 and anti-heat shock 60 *Chlamydia trachomatis* antibodies as markers of ectopic pregnancy. *J Reprod Immunol.* 2012;93:102–8.
210. Dutta R, Jha R, Salhan S, Mittal A. *Chlamydia trachomatis* specific heat shock proteins 60 antibodies can serve as prognostic marker in secondary infertile women. *Infection.* 2008;36:374–8.
211. Equils O, Lu D, Gatter M, Witkin SS, Bertolotto C, Arditi M, McGregor JA, Simmons CF, Hobel CJ. *Chlamydia* heat shock protein 60 induces trophoblast apoptosis through TLR4. *J Immunol.* 2006;177:1257–63.
212. Baud D, Goy G, Jatou K, Osterheld MC, Blumer S, Borel N, Vial Y, Hohlfeld P, Pospischil A, Greub G (2011) Role of *Chlamydia trachomatis* in miscarriage. *Emerg Infect Dis* 17:1630–1635.
213. Linhares IM, Witkin SS (2010) Immunopathogenic consequences of *Chlamydia trachomatis* 60 kDa heat shock protein expression in the female reproductive tract. *Cell Stress Chaperones* 15:467–467.
214. Mouton JW, Peeters MF, van Rijssort-Vos JH, Verkooyen RP. Tubal factor pathology caused by *Chlamydia trachomatis*: the role of serology. *Int J STD AIDS.* 2002;13(Suppl 2):26–9.
215. Mazzoli S, Cai T, Rupealta V, Gavazzi A, Castricchi Pagliai R, Mondaini N, Bartoletti R. Interleukin 8 and anti-*Chlamydia trachomatis* mucosal IgA as urogenital

- immunologic markers in patients with *C. trachomatis* prostatic infection. *Eur Urol.* 2007;51:1385–93.
216. Muvunyi CM, Dhont N, Verhelst R, Temmerman M, Claeys G, Padalko E. Chlamydia trachomatis infection in fertile and subfertile women in Rwanda: prevalence and diagnostic significance of IgG and IgA antibodies testing. *Hum Reprod.* 2011;26:3319–26.
217. Cheever AW, Williams ME, Wynn TA et al. Anti-IL-4 treatment of *Schistosoma mansoni*-infected mice inhibits development of T cells and non-B non-T cells expressing Th2 cytokines while decreasing egg-induced hepatic fibrosis. *J Immunol.* 1994;153:753–9.
218. Wynn TA, Cheever AW, Jankovic D, Poindexter RW, Caspar P, et al. An IL-12-based vaccination method for preventing fibrosis induced by schistosome infection. *Nature.* 1995;376:594–6.
219. Igietseme JU, Ramsey KH, Magee DM, Williams DM, Kincy TJ, Rank RG. Resolution of murine chlamydial genital infection by the adoptive transfer of a biovar-specific, Th1 lymphocyte clone. *Reg. Immunol.* 1993;5:317–324.
220. Magee DM, Igietseme JU, Smith JG, Bleicker CA, Grubbs BG, et al. Chlamydia trachomatis pneumonia in the severe combined immunodeficiency (SCID) mouse. *Reg Immunol* 1993;5:305–311.
221. Marks E, Verolin M, Stensson A, Lycke N. Differential CD28 and inducible costimulatory molecule signaling requirements for protective CD4<sup>+</sup> T-cell-mediated immunity against genital tract *Chlamydia trachomatis* infection. *Infect Immun* 2007;75:4638-47.
222. Holland MJ, Bailey RL, Hayes LJ, Whittle HC, Mabey DC. Conjunctival scarring in trachoma is associated with depressed cell-mediated immune responses to chlamydial antigens. *J. Infect. Dis.* 1993;168:1528–1531.
223. Holland MJ, Bailey RL, Conway DJ, Culley F, Miranpuri G, et al. T helper type-1 (Th1)/Th2 profiles of peripheral blood mononuclear cells (PBMC); responses to antigens of *Chlamydia trachomatis* in subjects with severe trachomatous scarring. *Clin. Exp Immunol* 1996;105:429–435.

224. Srivastava P, Jha R, Bas S, Salhan S, Mittal A. In infertile women, cells from *Chlamydia trachomatis* infected sites release higher levels of interferon-gamma, interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha upon heat-shock-protein stimulation than fertile women. *Reprod Biol Endocrinol* 2008;6:20.
225. Reddy BS, Rastogi S, Das B, Salhan S, Verma S, Mittal A. Cytokine expression pattern in the genital tract of *Chlamydia trachomatis* positive infertile women - implication for T-cell responses. *Clin Exp Immunol* 2004;137:552–8.
226. Holland MJ, Bailey RL, Conway DJ, Culley F, Miranpuri G, et al. T helper type-1 (Th1)/Th2 profiles of peripheral blood mononuclear cells (PBMC); responses to antigens of *Chlamydia trachomatis* in subjects with severe trachomatous scarring. *Clin Exp Immunol* 1996;105:429–35.
227. Dubin PJ, Kolls JK. IL-23 mediates inflammatory responses to mucoid *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007;292:L519-L528.
228. Koenders MI, Kolls JK, Oppers-Walgreen B, et al. Interleukin-17 receptor deficiency results in impaired synovial expression of interleukin-1 and matrix metalloproteinases 3, 9, and 13 and prevents cartilage destruction during chronic reactivated streptococcal cell wall-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2005;52:3239–3247.
229. Masson L, Salkinder AL, Olivier AJ, McKinnon LR, Gamielien H, et al. Relationship between female genital tract infections, mucosal interleukin-17 production and local T helper type 17 cells *Immunology* 2015;146:557-67.
230. Mathew M, Waugh C, Beagley KW, Timms P, Polkinghorne A. Interleukin 17A is an immune marker for chlamydial disease severity and pathogenesis in the koala (*Phascolarctos cinereus*). *Dev Comp Immunol* 2014;46:423-9.
231. Zhou X, Chen Q, Moore J, Kolls JK, Halperin S, Wang J. Critical role of the interleukin-17/interleukin-17 receptor axis in regulating host susceptibility to respiratory infection with *Chlamydia* species. *Infect Immun* 2009;77:5059-70.
232. Zhou X, Chen L, Zhou W, Huang J, Liu D. [Relationship between CD4 + CD25 + Foxp3 + regulatory T cells and Th17 responses in *Chlamydia muridarum* pulmonary infection]. *Wei Sheng Wu Xue Bao* 2014;53:74-81.

233. Shekhar S, Peng Y, Gao X, Joyee AG, Wang S, et al. NK cells modulate the lung dendritic cell-mediated Th1/Th17 immunity during intracellular bacterial infection. *Eur J Immunol* 2015;45:2810-20.
234. Michael C. Jendro, Tobias Deutsch, Britta Körber, Lars Köhler, Jens G. Kuipers, Birgit Krausse-Opatz, Jürgen Westermann, Elke Raum, and Henning Zeidler. Infection of Human Monocyte-Derived Macrophages with *Chlamydia trachomatis* Induces Apoptosis of T Cells: a Potential Mechanism for Persistent Infection. *Infect Immun.* 2000; 68: 6704–11.
235. Mavoungou E, Poaty-Mavoungou V, Touré FS, Sall A, Delicat A, Yaba P, Mandeme Y, Nabias R, Lansoud-Soukate J. Impairment of natural killer cell activity in *Chlamydia trachomatis* infected individuals. *Trop Med Int Health.* 1999;4:719-27.
236. Bard J, Levitt D. *Chlamydia trachomatis* stimulates human peripheral blood B lymphocytes to proliferate and secrete polyclonal immunoglobulins in vitro. *Infect Immun.* 1984; 43(1): 84–92.
237. Moseman EA, Liang X, Dawson AJ, Panoskaltis-Mortari A, Krieg AM, Liu YJ, Blazar BR, Chen W. Human plasmacytoid dendritic cells activated by CpG oligodeoxynucleotides induce the generation of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol.* 2004;173:4433-42.
238. Pan ZJ, Horton CG, Lawrence C, Farris AD. Plasmacytoid dendritic cells and type 1 IFN promote peripheral expansion of Foxp3+ regulatory T cells specific for the ubiquitous RNA-binding nuclear antigen La/SS-B. *Clin Exp Immunol.* 2016.
239. Agrawal T, Vats V, Salhan S, Mittal A. Determination of chlamydial load and immune parameters in asymptomatic, symptomatic and infertile women. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2009;55(2):250-7.
240. Lazarevic V, Glimcher LH, Lord GM. T-bet: a bridge between innate and adaptive immunity. *Nature Reviews Immunology* 2013;13:777–89.
241. Jankovic D, Kullberg MC, Feng CG, Goldszmid RS, Collazo CM, Wilson M, Wynn TA, Kamanaka M, Flavell RA, Sher A. Conventional T-bet(+)Foxp3(-) Th1 cells are the major source of host-protective regulatory IL-10 during intracellular protozoan infection. *J Exp Med.* 200719;204(2):273-83.

242. Anderson CF, Oukka M, Kuchroo VJ, Sacks D. CD4(+)CD25(-)Foxp3(-) Th1 cells are the source of IL-10-mediated immune suppression in chronic cutaneous leishmaniasis. *J Exp Med.* 2007;204:285-97.
243. Jankovic D, Trinchieri G. IL-10 or not IL-10: that is the question. *Nat Immunol.* 2007;8:1281-3.