

UNIVERSITÁ DEGLI STUDI DI CATANIA

Dottorato di Ricerca

Infezioni in Chirurgia Generale, in Geriatria in Ostetricia

XXIV CICLO

Coordinatore Gent.ma Prof.ssa A.M. Speciale

Dott.ssa Alessandra Iemmola

Infezioni Genitali da Chlamydia Trachomatis ed Infertilità

TESI DI DOTTORATO

Relatore : Chiar.^{mo} Prof. Marco A. Palumbo

Anno accademico 2010/2011

INDICE

INTRODUZIONE	1
CAPITOLO PRIMO	
LE MALATTIE SESSUALMENTE TRASMISSIBILI	4
1.1. MTS e infertilità.....	4
1.2. Dati epidemiologici dell'OMS.....	6
1.3. Prevenzione e trattamento.....	8
1.4. MTS e danno tuberico.....	11
CAPITOLO SECONDO	
LA CHLAMYDIA	20
2.1. Aspetto Microbiologico	20
2.2. Epidemiologia	24
2.3. Modalità di infezione e risposta immunitaria	30
2.4. Manifestazioni cliniche delle infezioni da C. Trachomatis	32
2.4.1. Infezioni negli uomini.....	32
2.4.2. Infezioni nelle donne	33
2.4.3. Infezioni neonatali	36
2.4.4. Linfogramuloma venereo (LGV)	36
2.5. Diagnosi	38
2.5.1. Diagnosi diretta.....	38
2.5.2. L'immunofluorescenza diretta.....	40
2.5.3. Il metodo immunoenzimatico (ELISA)	40

2.5.4. Tecniche di biologia molecolare, Polymerase Chain Reaction (PCR).....	41
2.5.5. La sierologia.....	43
CAPITOLO TERZO	
IL NOSTRO STUDIO.....	46
3.1. I Test di Screening	46
3.2. Il nostro studio	54
3.2.1. Risultati prelievo endometriale.....	56
3.2.2. Risultati prelievo vaginale	57
3.2.3. Prelievo Endometriale vs Prelievo Vaginale.....	57
CONCLUSIONI	59
BIBLIOGRAFIA	62
Sitografia.....	74

INTRODUZIONE

Una malattia venerea, il nome deriva dalla mitologia, ovvero da “Venere”, dea dell’amore, è un’infezione che si trasmette principalmente per contagio sessuale diretto.

Queste malattie, conosciute fin dal tempo dei romani, sono state spesso fonte di disapprovazione sociale, perché associate a comportamenti considerati immorali; atteggiamento che, in passato, ha limitato le misure necessarie a contenere l'infezione, o il ricorso alla terapia, spesso praticata in clandestinità.

Inoltre la prostituzione e la scarsa informazione hanno peggiorato la situazione favorendo, in alcuni casi, una diffusione epidemica di alcune malattie veneree.

Attualmente è noto che queste patologie sono causate dalla trasmissione di agenti patogeni (batteri, virus, parassiti o funghi) attraverso le mucose genitali.

L’espressione infezioni sessualmente trasmissibili (IST) raggruppa le malattie trasmesse durante l’atto e il contatto sessuale e, secondo l’Organizzazione mondiale della sanità (OMS), è preferibile a quella usata in precedenza (malattie sessualmente trasmissibili) in quanto

sottolinea il frequente decorso sintomatico di queste infezioni che, altrimenti, nei casi conclamati si manifestano con sintomi acuti o come forme croniche. Particolarmente rilevanti sono le conseguenze tardive a esse associate come l'infertilità, le gravidanze ectopiche, il cancro della cervice uterina, le stenosi uretrali, il coinvolgimento di altri apparati (ossa, cuore, sistema nervoso) e la mortalità precoce in età infantile o giovanile. Nell'insieme, le IST si associano a una morbilità e mortalità rilevante e contribuiscono significativamente ai costi sanitari, con un peso che varia notevolmente nelle varie aree del mondo. Ciò vale soprattutto quando colpiscono donne in età fertile per le conseguenze sul feto e sul neonato.

Le infezioni a trasmissione sessuale rappresentano quindi un importante fattore di infertilità, sia femminile che maschile, dato che, una volta acquisite, possono dare origine ad alterazioni spesso irreversibili degli organi della riproduzione.

Si stima che circa il 19% delle coppie sia infertile, ovvero non sia in grado di portare a termine una gravidanza; tra le diverse cause di infertilità circa il 20% dei casi è da attribuire ad un danno tubarico.

Nella maggior parte dei casi il danno alle tube è secondario ad un'infezione dell'apparato genitale femminile contratta per via

sessuale. I germi più comunemente coinvolti in questo meccanismo sono la *Chlamydia Trachomatis*, la *Neisseria Gonorrhoeae*, i Micoplasmi e i batteri Gram negativi.

L'infezione genitale da *C. trachomatis* è l'infezione batterica a trasmissione sessuale più diffusa nel mondo. Tuttavia, la *Chlamydia* è di solito asintomatica e perciò può diffondersi largamente nella popolazione senza essere diagnosticata (se non a seguito di esami mirati condotti su larga scala) con costi in prospettiva piuttosto elevati (per via delle complicanze) nonostante la disponibilità di terapie economiche ed efficaci.

Da qui nasce la necessità di organizzare campagne di screening atte a sensibilizzare la popolazione al problema ed a prevenire le eventuali complicanze che l'infezione stessa può determinare.

CAPITOLO PRIMO

LE MALATTIE SESSUALMENTE TRASMISSIBILI

1.1. Malattie sessualmente trasmesse e infertilità

Le infezioni sessualmente trasmesse sono molto più frequenti nella popolazione giovanile: si stima, infatti, che circa il 50% dei ragazzi di età inferiore ai 25 anni ne abbia contratto almeno una.

Con riferimento alla Chlamydia, si stima che - in Italia - il 15% delle ragazze abbiano potuto contrarre questa infezione nei primi anni dall'inizio dell'attività sessuale.

La causa della diffusione di queste infezioni fra i giovani è sicuramente legata alla scarsa consapevolezza dei rischi legati a rapporti sessuali non protetti.

Sappiamo che il 75% delle donne e il 50% degli uomini che contraggono l'infezione da Chlamydia, non presentano nessun disturbo e ciò produce un duplice effetto: la non attuazione di terapie efficaci con conseguente possibilità di trasmissione di questa ad altri partner.

Quando l'infezione è invece sintomatica, i disturbi possono essere molto variabili: nella donna possiamo avere perdite vaginali, bruciori alla minzione e dolori pelvici a seconda della gravità del quadro clinico. Anche nell'uomo la sintomatologia spesso è molto sfumata e si limita a bruciori alla minzione.

Indipendentemente dalla gravità dell'infezione, ne può derivare alle tube un danno irreversibile che compromette la fertilità delle donne provocando sterilità oppure, può determinare una gravidanza ectopica.

Nell'uomo un'infezione che si protrae in modo cronico può determinare un'alterazione delle vie seminali che, alla fine, porterà alla mancata fuoriuscita degli spermatozoi nel liquido seminale.

Un'altra grande categoria di infezioni sessualmente trasmesse è costituita dai virus delle epatiti (B e C), dal virus dell'HIV e dalla sifilide.

In questi casi l'infezione non rappresenta solamente un ostacolo alla riproduzione, perché con lo stesso rapporto sessuale non protetto, il partner infetto può trasmettere la malattia al partner sano.

In conclusione, possiamo dire che le infezioni sessualmente trasmesse rappresentano un grande problema per la riproduzione umana e che

sicuramente i primi sforzi per contrastarle devono essere mirati a potenziarne la prevenzione. Un primo passo può essere quello di aumentare l'informazione a partire dall'adolescenza.

1.2. Dati epidemiologici dell'Organizzazione Mondiale della Sanità

Le malattie sessualmente trasmissibili (MST) costituiscono uno dei più seri problemi di salute pubblica in tutto il mondo, sia nei Paesi industrializzati sia in quelli in via di sviluppo. Secondo le stime dell'Organizzazione Mondiale della Sanità, le MST hanno un'incidenza annua di 333 milioni di casi escludendo l'AIDS, la cui incidenza ed effetto sullo stato di salute e su quello socio-economico di interi paesi, soprattutto nell'area africana, è definita da anni ormai una reale emergenza.

L'incidenza delle MST nel mondo è in continuo aumento, soprattutto per la maggiore mobilità e l'aumento della tendenza ad avere rapporti sessuali con più partners. Le lesioni e le infiammazioni genitali date dalle diverse MST inoltre aumentano consistentemente il rischio di trasmissione dell'AIDS.

Una delle categorie più a rischio, nel mondo, è quella degli adolescenti. Secondo l'OMS, l'85% dei giovani tra i 10 e i 24 anni, vive in Paesi in via di sviluppo. Circa 73 milioni di adolescenti tra i 10 e i 14 anni sono lavoratori. Nella grande maggioranza dei casi, le relazioni sessuali per questi giovani iniziano molto presto nella fase adolescenziale. Dei 333 milioni di nuovi casi stimati ogni anno, almeno 111 interessano giovani sotto i 25 anni di età. La carenza di conoscenze e la difficoltà di accesso ai contraccettivi meccanici (preservativi) rendono i ragazzi molto più esposti al rischio di infezioni sessualmente trasmissibili.

Le ragazze sono più vulnerabili dei ragazzi per ragioni fisiologiche ma anche sociali, essendo spesso costrette a relazioni sessuali fin da bambine. Ogni anno, un adolescente su venti contrae una MST curabile, senza contare le infezioni virali.

Contrarre una MTS in una donna gravida può avere conseguenze molto gravi per il feto, fino alla morte in utero dello stesso. Oltre alla trasmissione, congenita, della malattia possono esserci, danni neurologici, infezioni oculari, polmoniti, epatiti acute, meningiti, malattie croniche al fegato, cirrosi.

La diagnosi di un'infezione ST è più problematica durante l'adolescenza perché la malattia può essere asintomatica. Inoltre, il disonore sociale e la difficoltà di accesso a servizi di trattamento possono incidere negativamente sull'attitudine al controllo da parte degli adolescenti.

1.3. Prevenzione e trattamento

Il controllo delle MST è una delle priorità dell'OMS e di altre organizzazioni sanitarie. La strategia adottata si basa soprattutto sulla prevenzione, con la promozione di comportamenti sessuali responsabili (informazione, attenzione nelle pratiche sessuali saltuarie e con partner occasionali, accesso all'uso di preservativi). L'educazione e il counselling si devono accompagnare comunque anche a misure di identificazione sia delle persone infette che non mostrano sintomi (ad esempio con lo screening di alcune categorie, come le donne in gravidanza) sia dei loro partner sessuali. Il trattamento delle MST dovrebbe essere incluso nei servizi sanitari di base offerti ai cittadini, con la disponibilità di farmaci adeguati, con il trattamento anche dei partner sessuali, con l'educazione pubblica, con la distribuzione capillare di preservativi, con la promozione di

un'adeguata prevenzione nelle categorie a rischio. Infine, una misura preventiva, è quella di vaccinare le persone a rischio per quelle malattie per le quali esiste un vaccino disponibile (epatite B, papillomavirus).

Sono state attivate nel mondo diverse iniziative di gestione globale delle MST. In particolare, l'Oms ha aperto, all'interno del programma di ricerca e training sulle malattie tropicali, una sessione completamente dedicata al problema: la Surveillance Diagnostic Initiative (SDI - Iniziativa di sorveglianza sulle diagnosi delle malattie). Fondata nel 1990, la SDI risponde alla necessità di mettere a punto sistemi di diagnosi più efficaci soprattutto nei paesi con basso livello di risorse sanitarie, dato che l'80-90% dell'incidenza globale di queste malattie si ha nei paesi poveri. In particolare, la SDI risponde al bisogno urgente di migliorare la diagnosi precoce di AIDS nelle regioni dell'Africa subsahariana, anche perché è stato dimostrato che le MST facilitano la trasmissione del virus HIV.

Negli Stati Uniti, i CDC (Center for Disease and Control) hanno attivato da tempo una sezione completamente dedicata alle malattie sessualmente trasmissibili che interessano in modo particolare alcune

regioni e alcune categorie sociali della popolazione americana. La sezione, chiamata Division of Sexually Transmitted Disease, mantiene un sistema di sorveglianza annuale sull'andamento delle malattie e ha prodotto delle linee guida per la diagnosi e il trattamento.

In Europa, l'Ufficio regionale dell'Oms ha messo a punto una Task force europea con il compito di rispondere efficacemente alle epidemie di MST in Europa dell'Est e in Asia centrale, epidemie che possono potenzialmente diventare un problema serio di salute per tutta la regione europea.

Le malattie sessualmente trasmissibili sono infatti tornate recentemente all'ordine del giorno dei sistemi sanitari europei, per l'elevata incidenza rilevata nei nuovi Paesi membri, quelli appartenenti all'ex blocco sovietico. Nonostante i dati siano variabili e dipendano in larga scala dai metodi di screening, secondo l'Ufficio regionale europeo dell'OMS, l'incidenza media della MST nei Paesi dell'Est europeo è in media 100 volte più alta che nei Paesi europei occidentali (da 62,8-164,1 casi per 100.000 a 1,46 per 100.000 abitanti).

Quasi tutti i Paesi europei hanno un sistema di sorveglianza sulle MST, più del 90% ha cliniche specializzate ma solo il 60% ha linee

guida per la gestione e il trattamento. Nel 56% dei Paesi, i servizi relativi alle MST fanno parte delle cure primarie e solo il 30% dei Paesi ha un programma nazionale strutturato di controllo e trattamento. La task force, avviata nel 2000, avrà il compito di stabilire pratiche e linee guida da attuare per una risposta globale all'emergenza MST.

1.4. MTS e danno tubarico

I danni alle tube di Falloppio, che includono l'occlusione tubarica e/o la fibrosi, sono alcune delle principali cause di sterilità femminile. Il danno è generalmente causato da batteri sessualmente trasmessi che infettano dapprima il tratto genitale inferiore, per poi risalire fino all'utero e alle tube. Tali infezioni possono causare una malattia infiammatoria pelvica (PID) (Akande V, 2002). La PID è un'infezione batterica del tratto genitale che può includere endometrite, parametrite, salpingite e ascesso tubo-ovarico. Sono causate principalmente da batteri quali: *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* e altri batteri aerobi e anaerobi appartenenti alla flora vaginale e in grado di determinare vaginosi batterica (Crossman SH, 2006). Nel mondo sviluppato, la causa più comune di danno tubarico è

l'infezione da *C. trachomatis* (Organizzazione Mondiale della Sanità, 1995; ESHRE, 1996).

L'epitelio delle tube è composto principalmente da cellule ciliate colonnari e da cellule non-ciliate secretorie. Le prime spingono, battendo le ciglia vibratili, la secrezione prodotta dalle cellule non-ciliate nella quale è sospeso l'ovocita, che viene quindi spinto verso l'utero. L'epitelio tubarico subisce modificazioni cicliche, sia pure molto più limitate rispetto a quelle dell'endometrio, nel corso della fase luteinica. Anche il numero delle cellule ciliate ed il movimento delle ciglia sono influenzati dagli ormoni ovarici: gli estrogeni favoriscono la cilio-genesi, il progesterone antagonizza questo effetto (Donnez et al., 1985). Tuttavia, quando il delicato strato epiteliale delle tube è danneggiato da infezioni e infiammazioni, durante una salpingite, nelle cellule ciliate si riducono permanentemente il numero e la qualità delle ciglia (Donnez et al., 1984). Uno studio effettuato da Patton et al. (1989) ha mostrato che due gruppi di donne infertili, uno con una storia di salpingite palese e l'altro con salpingite asintomatica, aveva sviluppato importanti modificazioni delle tube di Falloppio, appiattimento delle pieghe della mucosa, ampia perdita delle ciglia vibratili e degenerazione delle cellule secretorie (Patton et al., 1989). I

pazienti non avevano segni di malattia attiva al momento del prelievo del campione, il che conferma che il danno epiteliale è irreversibile. Questi danni possono portare a infertilità tubarica e aumentano il rischio di gravidanza ectopica.

Non tutti i casi di salpingite possono essere spiegati con l'infezione da *N. gonorrhoeae* o *C. trachomatis*, pertanto, molti studi sono stati effettuati per verificare se altri batteri possono essere isolati dalle tube di queste pazienti. Il recupero di *Mycoplasma hominis* direttamente dalle tube di Falloppio di donne con salpingite acuta (Mårdh e Westrom, 1970a), seguita dalla generazione di una risposta anticorpale al *M. hominis* nelle stesse pazienti (Mårdh e Westrom, 1970b), è uno dei principali elementi di prova che associa questo microorganismo alle flogosi tubariche. *M. hominis* è spesso causa di vaginosi batterica (VB): è stato trovato in almeno due terzi delle donne con VB e in appena il 10% di donne sane (Rosenstein et al., 1996).

Meno si sa delle possibili implicazioni sull'infertilità da infezioni da *Mycoplasma genitalium*. Il microorganismo, isolato per la prima volta nel 1981 (Tully et al., 1981), è stato studiato in maniera molto estesa nel corso degli ultimi anni. In uno studio condotto da Cohen et al. (2005) si è constatato che *M. genitalium* può risalire fino alle tube

(HFT) e il suo DNA è stato rilevato direttamente nelle cellule delle tube ed in campioni di endometrio di una paziente affetta da lieve salpingite (Cohen et al., 2005).

Uno studio di A. Baczynska et al. (2006) ha analizzato gli effetti delle infezioni da *Mycoplasma hominis* e *Mycoplasma genitalium* sull'epitelio HFT e li ha confrontati con gli effetti delle infezioni da *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae*. Hanno effettuato degli studi istologici utilizzando campioni di tessuto di tube di Falloppio (HFT). I campioni di HFT sono stati prelevati da cinque donne non gravide, in premenopausa, nel corso di un intervento di isterectomia per indicazioni chirurgiche. Le operazioni sono state effettuate subito dopo il sanguinamento mestruale, così, le cellule epiteliali sono in fase estrogenica e sono state incluse solo donne senza salpingite. Quindi questi campioni sono stati infettati, su specifici terreni di coltura, con *M. hominis* e *M. genitalium*, ovviamente separatamente e lasciati in incubazione per cinque giorni. I tessuti infetti con *M. genitalium* hanno mostrato gonfiore delle ciglia e una certa perdita delle stesse, che non è stata osservata in nessuno dei controlli non infetti (Figura 3). Nulla da rilevare invece per quel che riguarda il campione infetto con *M. hominis*. I risultati

dell'infezione da *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae* utilizzati in questo studio (A. Baczynska et al., 2006) come controlli “positivi” concordavano con gli studi precedenti. Entrambi gli agenti patogeni sono stati studiati in dettaglio utilizzando colture di HFT. Cooper et al. (1990) hanno osservato un effetto citotossico caratterizzato da perdita di microvilli e la rottura delle giunzioni cellulari quando più microrganismi chlamydiali, sotto forma di corpi elementari (EBS, incapace di riprodursi ma in grado di sopravvivere al di fuori della cellula ospite), aderiscono alle cellule della mucosa. Essi hanno inoltre rilevato la rottura delle cellule epiteliali con rilascio di EBS. Inclusioni chlamydiali sono state osservate 72 ore dopo l'infezione sia nelle cellule ciliate sia in quelle secernenti non-ciliate. Come “inclusioni” intendiamo entrambe le forme del ciclo di sviluppo della *C. trachomatis* (corpo elementare e corpo reticolare) (Figura 2 A e B). Recentemente, la citotossicità della *C. trachomatis* è stata correlata con la presenza di un gene che codifica per proteine che hanno una significativa omologia con le grandi citotossine clostridiali (Belland et al., 2001). Tale tossina può essere in grado di causare il danno tissutale osservato. I risultati dell'infezione da *C. trachomatis* sono

stati, tuttavia, non così drammatici come i risultati dell'infezione da *N. gonorrhoeae*.

N. gonorrhoeae è il microrganismo che ha avuto l'effetto più tossico sulla coltura di HFT nello studio di A. Baczyńska et al. (2006) ed ha causato danni ingenti sull'intero epitelio (figura 2 B e C). Numerose pubblicazioni precedenti suggeriscono che la *N. gonorrhoeae* è in grado di infettare l'epitelio endocervicale, esocervicale e uretrale (Edwards et al., 2000; Harvey et al., 1997). Anche se l'infezione da *M. genitalium*, non ha provocato gli stessi danni della *C. trachomatis* o della *N. gonorrhoeae*, se non trattata, potrebbe avere gravi conseguenze come l'infertilità tubarica.

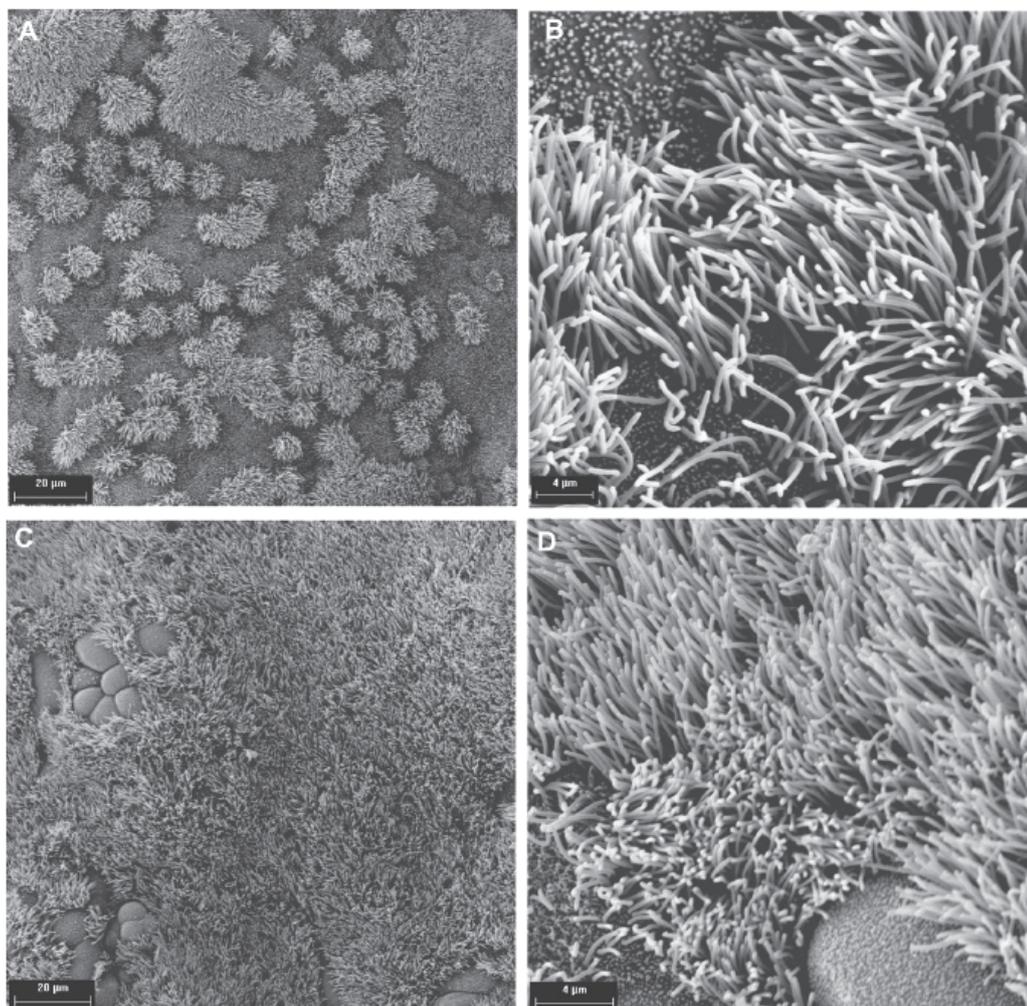


Figura 1. Visione al microscopio elettronico dell'epitelio tubarico (HFT) dei controlli non infetti. (A e B) HFT non infettato dopo 1 giorno di incubazione in terreno contenente antibiotico. (C e D) dei tessuti presenti alla fine dell'esperimento, dopo 6 giorni di cultura d'organo. Tutte e quattro le immagini mostrano una normale superficie della mucosa tubarica, con molte cellule ciliate e secretorie. Normale morfologia delle cellule ciliate e di secrezione. Sulle cellule ciliate sono presenti un gran numero di ciglia per ogni singola cellula.

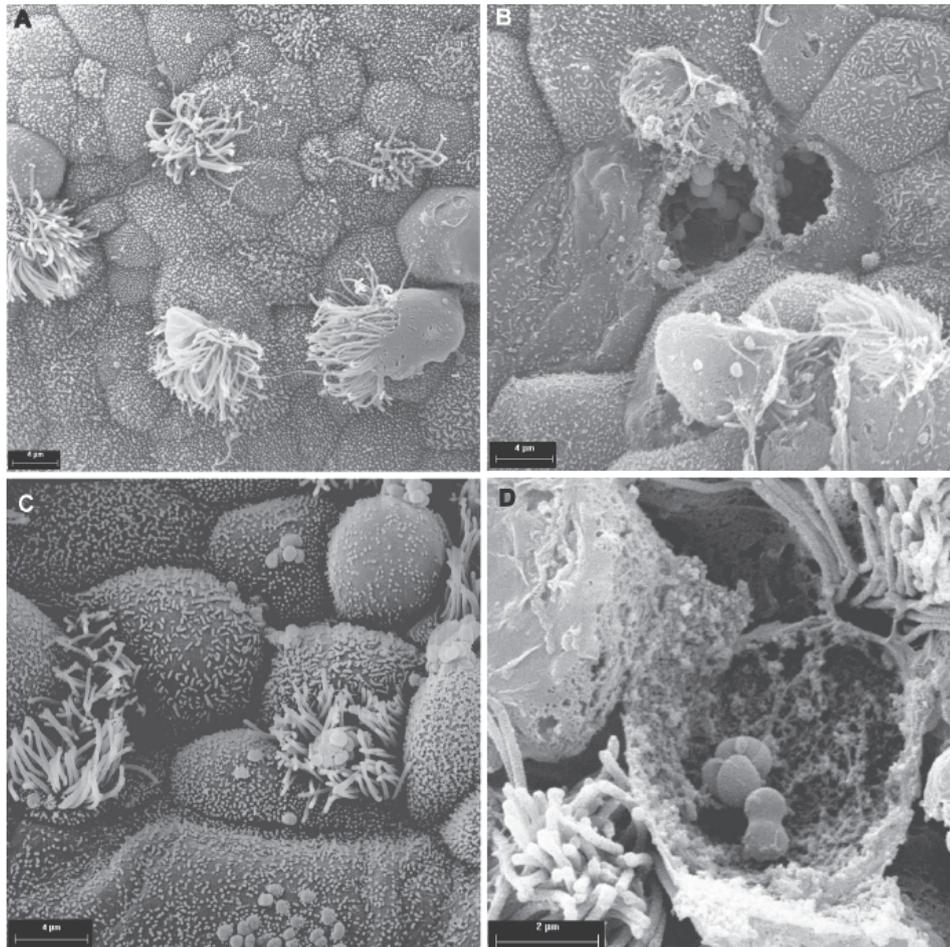


Figura 2. SEM dell'epitelio HFT durante l'infezione da *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae*. (A e B) tessuti infetti con *C. trachomatis*. Il microorganismo infetta le cellule ciliate e quelle secretorie. (A) Un effetto citotossico diretto locale della *C. trachomatis* sull'epitelio ciliato. (B) Rottura delle membrane cellulari e Chlamydia visibile all'interno delle cellule lisate. (C e D) frammenti di tessuto infettato da *N. gonorrhoeae*. (C) gonococchi legati principalmente ai microvilli delle cellule secretorie. (D) Tessuto gravemente degenerato dopo 5 giorni di infezione. Cellule ciliate mutate. *N. gonorrhoeae* potrebbe essere visto anche all'interno delle cellule epiteliali danneggiate. Può essere osservato un chiaro effetto tossico da parte della *N. gonorrhoeae* sulla cultura di HFT.

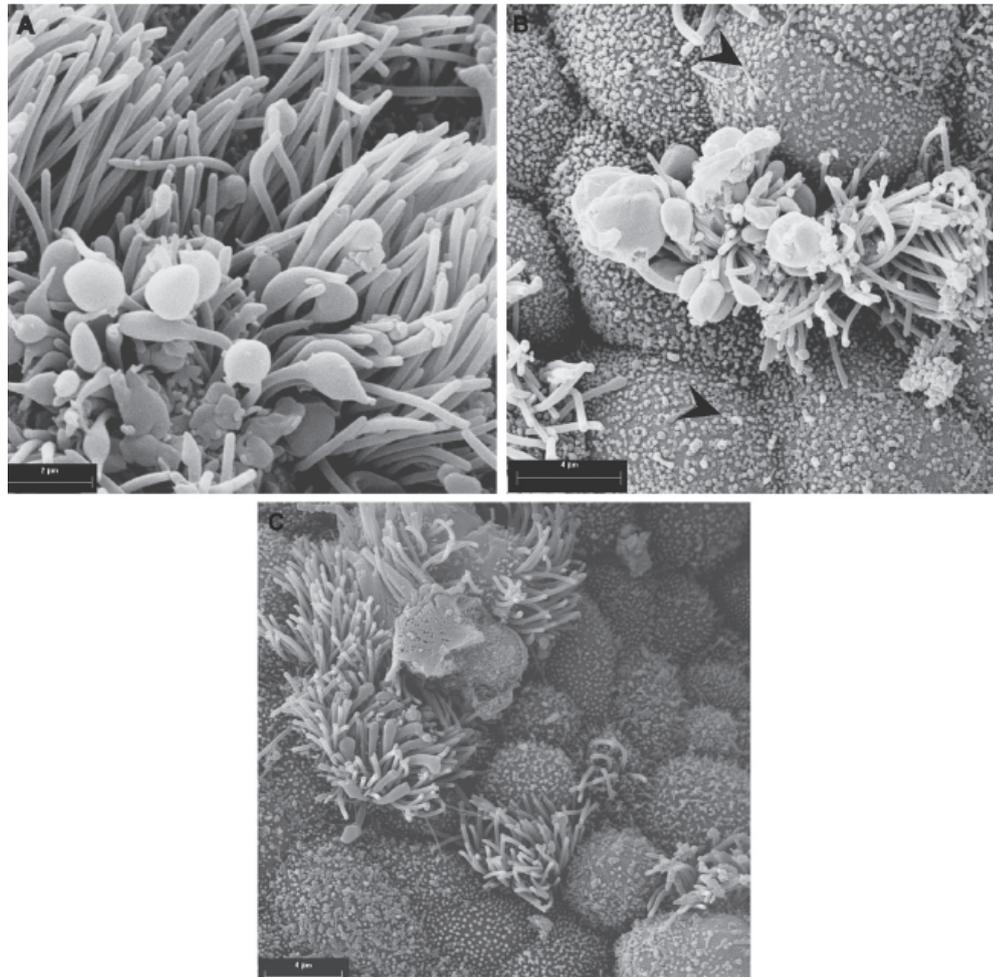


Figure 3. Effetti dell'infezione da *M. genitalium* sulle cellule ciliate. (A-C) Alterazioni determinate da *M. genitalium* sull'epitelio tubarico.

Possiamo notare nelle immagini che le ciglia sono danneggiate dall'infezione. (A) le ciglia appaiono con forme diverse e il gonfiore può apparire nella parte distale, media o basale delle ciglia. (B) Le ciglia cadono letteralmente a pezzi, molte si accorciano e il numero di ciglia per cellula è notevolmente ridotto. Strutture simili ai *M. genitalium* possono essere viste nella preparazione, aderenti alle cellule secretorie e indicate con frecce. Le cellule secretorie non sono state colpite dal *M. genitalium*. (C) si nota l'interessamento delle cellule ciliate ed in particolare due cellule morte che sono ancora in parte attaccate al tessuto HFT.

CAPITOLO SECONDO

LA CHLAMYDIA

2.1. Aspetto Microbiologico

L'infezione da *Chlamydia trachomatis* rappresenta, nei Paesi industrializzati, la più frequente infezione batterica sessualmente trasmissibile. Secondo l'OMS si stima che annualmente vengano diagnosticate circa novanta milioni di infezioni da *chlamydia* in tutto il mondo.

La *Chlamydia trachomatis* è un batterio Gram-negativo, intracellulare obbligato, appartenente alla famiglia Chlamydiaceae che comprende il solo genere *Chlamydia*; sopravvive e si replica in un fagosoma batterico-modificato chiamato inclusione. L'involucro esterno è costituito da una componente lipopolisaccaridica (LPS) e da una proteina denominata MOMP (Major Outer Membrane Protein) con probabile funzione di "porina". Questi batteri hanno una parete cellulare rigida con peptidoglicano sostituito da proteine ricche di

cisteina, tale rigidità è data da ponti disolfuro tra le molecole MOMP e residui di cisteina nella molecola proteica.

Come altri parassiti intracellulari, questi batteri sovvertono il percorso fagocitario per evitare il degrado in fagolisosomi e sfruttare le vie di traffico per l'acquisizione sia di energia che di nutrienti essenziali per la loro sopravvivenza, perché non sono in grado di produrre autonomamente energia (non producono ATP, ma utilizzano quello della cellula infettata).

La *Chlamydia trachomatis* ha un particolare tropismo per l'epitelio della mucosa genitale e oculare ed è l'agente eziologico delle più diffuse malattie veneree genito-urinarie e può causare cecità negli esseri umani, a seconda del sierotipo responsabile dell'infezione.

Esistono 17 sierotipi:

I sierotipi A, B, Ba e C sono gli agenti causa del tracoma (non a trasmissione sessuale) frequente nei bambini.

I sierotipi D, Da, E, F, G, H, I, Ia, Ja e K sono responsabili di malattie sessualmente trasmissibili e oculari. In particolare i sierotipi D-K causano nell'uomo uretriti, nella donna cerviciti, salpingiti e infezioni pelviche (PID), gravidanze extra-uterine, aborto. Nel neonato, di

madre infetta, l'infezione contratta durante il parto può causare congiuntivite o polmonite interstiziale.

I sierotipi L1, L2 e L3 sono la causa del linfogranuloma venereo. Questi sierotipi possono attraversare le cellule epiteliali delle mucose e quindi diffondere attraverso il sistema linfatico dove si moltiplicano all'interno dei fagociti mononucleari presenti all'interno dei linfonodi.

La *Chlamydia trachomatis* è caratterizzata da due stadi cellulari che si alternano durante il ciclo di sviluppo:

- il *corpo elementare* (dimensioni 200-300 nm), incapace di riprodursi, ma in grado di sopravvivere al di fuori della cellula ospite e che si colora in blu-rosso al metodo di Giemsa;
- il *corpo reticolare* (che raggiunge le dimensioni di 1000 nm), in grado di riprodursi ma privo di capacità infettante. Il corpo reticolare si riproduce all'interno della cellula infetta e subisce quindi un processo di riorganizzazione che lo trasforma in corpo elementare, che fuoriesce dalla cellula a seguito di un processo di lisi e che si colora in blu con il metodo di Giemsa.

La trasmissione, pertanto, avviene attraverso il corpo elementare, di dimensione minore e altamente infettante, per contagio interumano, sia per via sessuale che materno-fetale.

La *C. trachomatis* comprende numerosi sierotipi correlati a diversi quadri clinici. I sierotipi L1 L2 e L3 sono associati al linfogranuloma venereo, quelli A, B, Ba e C al tracoma, e quelli D, E, F, G, H, I, J e K sono associate a forme di congiuntivite, infezioni uro-genitali e polmonite interstiziale del neonato.

Immagine al microscopio elettronico della *Chlamydia trachomatis*.

2.2. Epidemiologia

L'infezione da *C. trachomatis* è la malattia batterica a trasmissione sessuale più diffusa al mondo. Si stimano a livello mondiale circa 50 milioni di casi di infezione all'anno. Al contrario delle altre malattie a trasmissione sessuale (MTS), la sua prevalenza è maggiore nel sesso femminile rispetto a quello maschile.

L'infezione da *C. trachomatis* si associa spesso ad altre MTS.

Con l'eccezione del linfogranuloma venereo, le infezioni da *Chlamydia* sono ampiamente diffuse tra la popolazione generale, interessando principalmente i giovani tra i 16 ei 24 anni di età. Fattori di rischio demografico e comportamentale sono: la giovane età della donna (≤ 25 anni), la razza non bianca, il basso livello socioeconomico, i partner sessuali multipli, i partner sessuali con uretrite non gonococcica, il mancato impiego di contraccettivi di barriera e/o l'uso di contraccettivi ormonali (Manavi K et al., 2006).

Negli Stati Uniti, dove vi è l'obbligo di notifica, sono stati segnalati alla CDC nel 2007 più di un milione di casi (1.108.174) di infezione da *Chlamydia*, che corrisponde ad un tasso di 370,2 casi / 100.000, con un aumento del 7,5% rispetto al tasso del 2006 (www.cdc.gov/std/stats07/chlamydia.htm).

Nel 2007, il tasso complessivo delle segnalazioni di infezione da Chlamydia tra le donne in tutti i 50 stati e il Distretto di Columbia (543,6 casi per 100.000 femmine) era quasi tre volte superiore al tasso tra gli uomini (190,0 casi per 100.000 maschi), probabilmente riflettendo un maggiore numero di donne sottoposte a screening per l'infezione. I tassi più bassi fra gli uomini indicano anche che molti dei partner sessuali delle donne che hanno contratto l'infezione non vengono diagnosticati o segnalati come Chlamydia. Tuttavia, con l'avvento del test di amplificazione degli acidi nucleici (NAATs o PCR), che può essere effettuato sulle urine di uomini sintomatici e asintomatici, sono sempre maggiori i casi di infezione chlamydiali riscontrati. Dal 2003 al 2007, il tasso di infezione da Chlamydia negli uomini è aumentato del 42,9% (133,0-190,0 casi per 100.000 maschi) rispetto ad un aumento del 17,3% nelle donne durante lo stesso periodo (463,6-543,6 casi per 100.000 femmine).

Tra le donne, i tassi più alti di Chlamydia segnalati nel 2007, specifici per età, sono stati tra i 15 e i 19 anni di età (3.004,7 casi ogni 100.000 donne) e tra i 20 e i 24 anni di età (2.948,8 casi ogni 100.000 femmine). Rispetto al 2003, questi sono aumentati nei due gruppi di età del 12,4% e 17,3%, rispettivamente. E ciò può riflettere o un

aumento dei casi di infezione o una maggiore partecipazione ai test di screening delle giovani donne tra i 20-24 anni d'età.

Tra gli uomini, i tassi di infezione sono stati più alti nella fascia di età che va dai 20 ai 24 anni (932,9 casi per 100.000 maschi) (Figura 5, Tabella 10), pur essendo comunque inferiore a quello delle donne. I tassi di Chlamydia tra gli uomini sono aumentati nella fascia di età più alta a partire dal 2003 (www.cdc.gov/std/stats07/chlamydia.htm) probabilmente l'effetto dell'aumentata aderenza allo screening delle donne ha influenzato la diagnosi nei partners.

Nell'Europa occidentale, secondo l'OMS, sono 5 milioni i nuovi casi di infezione nel 1999, e 6 milioni quelli in Europa orientale e Asia centrale. La prevalenza varia dall'8% dell'Islanda, al 6,7% della Danimarca, al 5% dell'Olanda, 4% della Francia fino al 2,7% dell'Italia. Riguardo all'Italia, è difficile ritrovare dati attendibili e più recenti per quel che riguarda l'incidenza e la prevalenza dell'infezione da Chlamydia, in quanto non è una patologia sottoposta ad obbligo di notifica, né è attiva un'effettiva politica di screening o di sensibilizzazione, neanche nei confronti delle categorie più a rischio.

L'agenzia di protezione della salute britannica riporta 52.113 casi diagnosticati di Chlamydia nel 2002 tra le donne di età compresa tra i 16 e i 24 anni di età ricoverate nelle cliniche di trattamento delle MST.

Il servizio però stima che nello stesso gruppo di età vi siano in realtà altri 100-200.000 casi non diagnosticati. Tra il 1999 e il 2000, il Department of Health inglese ha finanziato un programma pilota di screening tra le donne in età compresa tra i 16 e i 24 anni, in due regioni, Portsmouth e Wirral, trovando prevalenze comprese tra il 10 e il 18%. Dato il successo del progetto pilota, è stato poi avviato un programma di screening nazionale (www.epicentro.iss.it/problemi/clamidia/studi.asp).

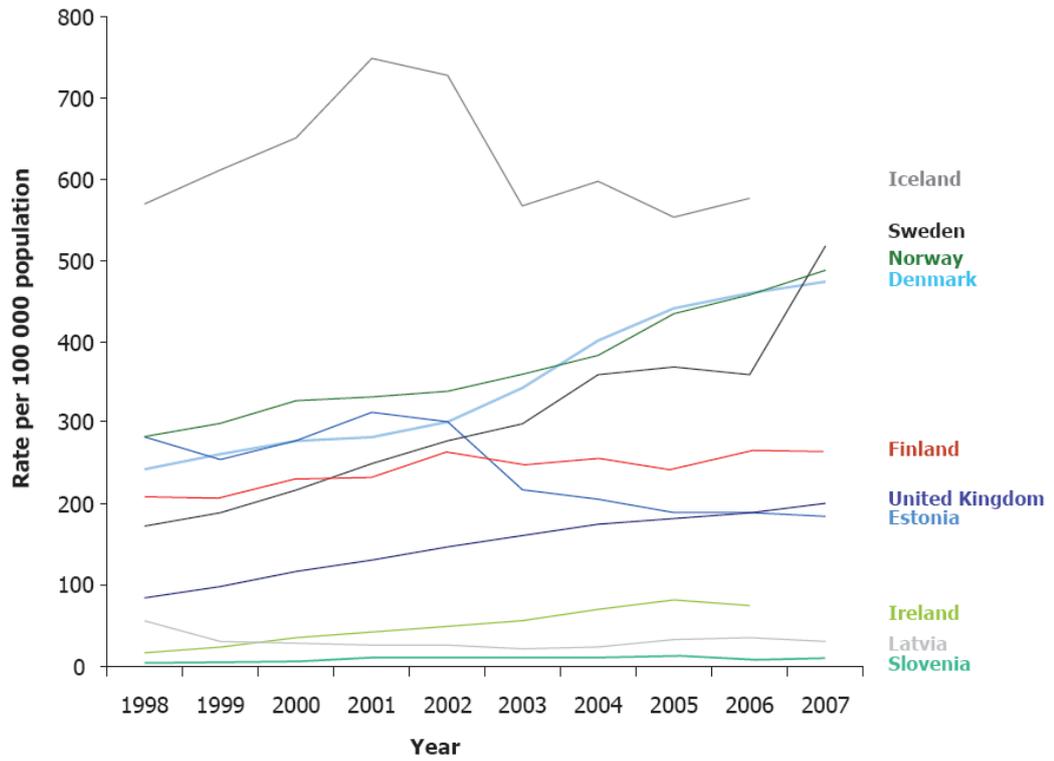
In Europa, inoltre, l'incidenza di questa infezione è aumentata negli ultimi 10 anni. Nel 2005, oltre 200.000 casi sono stati riportati in 17 Paesi europei (www.ecdc.europa.eu/en/Health_Topics/chlamydia_infection/aer_07.aspx), e nel 2007, 253.386 casi confermati di infezione da Chlamydia sono stati riportati da 22 Stati membri dell'Unione Europea, con un tasso complessivo di 122,6 per 100.000 abitanti. La reale incidenza è probabilmente superiore a questi tassi riportati. La mancanza di coerenza in materia di sorveglianza della Chlamydia e le variazioni nelle politiche, ad esempio, di metodi utilizzati per la diagnostica, rendono difficile stimare l'incidenza e la prevalenza di Chlamydia in Europa o fare confronti (www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/0906_GUI_Chlamydia_Control_in_Europe.pdf). Si stima che i tassi di prevalenza vadano dal 2% al 17% nelle donne

asintomatiche, a seconda delle impostazioni, della popolazione e del paese.

In Danimarca, il tasso complessivo di prevalenza di infezione è stata 456 casi/100.000 nel 2007. Nel Regno Unito, è stato riportato che il 10,3% delle donne e il 13,3% degli uomini sotto i 25 anni di età sono infetti (Manavi K et al., 2006). In confronto ad altri Paesi, la prevalenza è più bassa in Svizzera, con tassi che vanno dal 2,8% nelle donne (Paget WJ et al., 2002) all'1,2% negli uomini (Baud D et al., 2008). In Francia, dove l'infezione da Chlamydia non è una malattia soggetta a notifica, gli studi di screening hanno dimostrato grandi differenze in base alla popolazione testata, che vanno dal 6-11% nei soggetti che frequentano i centri di pianificazione familiare (Warszawski J, 2006) all'1-3% nei soggetti che si rivolgono ai centri medici di prevenzione universitari (Barbeyrac de B et al., 2004). Nel 2005, la prevalenza globale di *C. trachomatis* nella popolazione francese è stata dell'1,5% in generale e del 3% nella popolazione fra i 18-24 anni (6th Meeting of the European Society for Chlamydia Research, abstract P71, Goulet V, 2008).

La prevalenza delle infezioni da *C. trachomatis* varia dal 3-5% della popolazione asintomatica (di cui il 70% donne), al 5-7% delle gravide, ad oltre il 20% delle donne afferenti ai centri per malattie sessualmente trasmesse.

Figure 1: Rate of reported chlamydia cases per 100 000 population: 1998–2007



Source: ESSTI. Sexually Transmitted Infections in Europe. Health Protection Agency, 2008. No. 3 [32]

2.3. Modalità di infezione e risposta immunitaria

I meccanismi fisiopatologici dell'infezione da *Chlamydia* sono poco conosciuti. La risposta iniziale all'infezione, delle cellule epiteliali consiste in un'infiltrazione di neutrofili, seguiti da linfociti, macrofagi, cellule del plasma e di eosinofili.

Il rilascio di citochine e interferoni da parte della cellula epiteliale infettata, dà inizio alla cascata infiammatoria.

L'infezione da *Chlamydia* stimola una risposta umorale delle cellule, con la produzione conseguente di immunoglobuline secretorie A (IgA), circolatorie M (IgM), immunoglobuline G (IgG) e una risposta immunitaria cellulare.

Da studi recenti sembra che sia coinvolta, nella risposta immunitaria, un proteina della membrana esterna (MOMP) di 40-kd, e proteine heat-shock (Chsp) di *Chlamydia* da 10 e 60 kd, ma sono in corso ulteriori studi per comprendere meglio questi meccanismi di risposta cellulare-mediata.

La Chlamydia trachomatis ha un ciclo vitale dimorfico, i Corpi Elementari (EB) infettanti, per la sopravvivenza extracellulare e i Corpi Reticolari (RB) non infettanti, per la replicazione intracellulare.

Il corpo elementare è uno stadio infettivo, ma metabolicamente inattivo, con il quale *Chlamydia trachomatis* infetta le cellule epiteliali della mucosa uro-genitale e/o oculare.

Il corpo elementare è piccolo, tondeggiante e denso; riconosce i recettori presenti sulla superficie delle cellule epiteliali della mucosa mediante il legame delle MOMP e penetra nella cellula mediante “endocitosi selettiva per il parassita”. Il corpo elementare penetra nella cellula all’interno di un fagosoma e inibisce la sua fusione con i lisosomi cellulari, impedendo così la lisi intracellulare.

All’interno dell’inclusione, dopo circa 6-8 ore, i corpi elementari si idratano, si accrescono e si differenziano in corpi reticolari (RB), metabolicamente attivi .

I corpi reticolari all’interno dell’inclusione sintetizzano DNA, RNA e proteine utilizzando l’ATP della cellula e si dividono per scissione binaria, accumulandosi all’interno dell’inclusione (visibili al microscopio ottico). Nell’arco di 24-48 ore, i corpi reticolari si differenziano in corpi elementari infettivi, che vengono successivamente rilasciati per autolisi, e infettano le cellule vicine.

In presenza di inibitori della crescita, come l'interferone-gamma (IFN γ), questi batteri possono acquisire una forma persistente, non-replicativa e non-infettiva e, dopo la rimozione del inibitore, sono in grado di riattivarsi nuovamente ritornando infettivi (EB).

L'interferone-gamma (IFN- γ), prodotto dalle cellule T dell’uomo, induce l'espressione di indoleamine-2,3-diossigenasi (IDO) cellulare che degrada il triptofano, riducendone i livelli intracellulari.

La carenza di tale amminoacido porta alla morte della Chlamydia. Si è visto che una popolazione di Chlamydia spp., nello stadio di corpo reticolato (RB), risponde alla mancanza di triptofano con l'acquisizione di una forma persistente non-replicativa, ma vitale.

Dopo la rimozione di IFN- ϵ l'aumento di triptofano, le forme persistenti si ridifferenziano rapidamente in corpi elementari (EB) infettivi. Alcuni ceppi di Chlamydia spp. (sierotipi genitali) hanno adottato un sistema di difesa, basato su una triptofano-sintasi funzionale che può utilizzare indolo per sintetizzare triptofano e quindi bypassare il meccanismo di latenza

2.4. Manifestazioni cliniche delle infezioni da C. Trachomatis

L'infezione da Chlamydia può causare cervicite nelle donne e uretrite negli uomini. Tuttavia, questa infezione può produrre pochi o nessun sintomo in circa il 70% delle donne e 50% degli uomini (Van de Laar MJ et al., 2007) e quindi rimanere inosservata.

2.4.1. Infezioni negli uomini

La C. trachomatis è la causa principale delle uretriti non-gonococciche e post-gonococciche. L'uretrite può essere complicata da epididimite acuta nei giovani uomini. Dopo 7-21 giorni di incubazione compaiono

i sintomi: disuria, perdita di liquido chiaro, viscoso e indolore che si accompagna spesso a sensazione di corpo estraneo in uretra (Peipert JF, 2003). Le complicanze si manifestano in genere dopo un'uretrite curata male o trascurata e sono prostatiti, epididimiti, sterilità maschile, congiuntiviti e retiniti. Le forme asintomatiche svolgono un ruolo importante nella propagazione della malattia.

La sindrome di Reiter (uretrite, congiuntivite, artrite e lesioni mucocutanee) o l'artrite reattiva è stata anche associata ad infezioni da *C. trachomatis*, con un elevato rapporto maschio/femmina (Hicks D et al., 2008).

2.4.2. Infezioni nelle donne

Le donne con cervicite possono essere asintomatiche o possono lamentare perdite vaginali muco purulente o sanguinamento postcoitale. Sono stati osservati l'edema, la congestione e il sanguinamento della cervice uterina.

L'infezione isolata dell'uretra (15-25% delle donne) aumenta con il progredire dell'età e si manifesta con disuria, pollachiuria e piuria senza batteriuria (sindrome uretrale acuta); tuttavia la maggior parte delle donne esaminate con infezione uretrale da *Chlamydia* non

lamenta disturbi urinari. Tali uretriti sono comprese fra le “uretriti non specifiche”, cioè non causate da *Neisseria gonorrhoeae*; i sierotipi dal D al K ne sono gli agenti etiologici.

L'incubazione dura in media 7-14 giorni con disuria e caratteristiche perdite uretrali trasparenti, bianche o grigiastre. Anche qui sono presenti leucociti polimorfonucleati. Spesso causa l'uretrite post gonococcica, cioè quella uretrite che si manifesta dopo che la *Neisseria gonorrhoeae* è stata adeguatamente trattata con antibiotici che non eradicano contemporaneamente anche la *Chlamydia trachomatis*.

Uretrite e cervicite possono essere associate. Una cultura-negativa per leucocituria fa sospettare un'infezione da *Chlamydia trachomatis*.

La cervicite muco-purulenta è seguita da endometrite, endosalpingite e, infine, da una pelvi-peritonite.

Dalla cervice il microrganismo può risalire verso l'alto, e per disseminazione endoluminale ascendente dalle basse vie genitali può provocare quindi endometrite, che può manifestarsi con un irregolare sanguinamento uterino, salpingite o malattia infiammatoria pelvica (PID), patologie spesso subcliniche. Sembra addirittura che, in Europa, la *Chlamydia trachomatis* sia la causa di almeno il 60% dei

casi di grave PID (Rogstad K et al., 2008). La salpingite può portare a gravi danni tubarici per gli esiti cicatriziali della flogosi e tutto ciò può compromettere la capacità riproduttiva della donna. I due terzi dei casi di infertilità da fattore tubarico e un terzo di tutti i casi di gravidanza ectopica potrebbero essere causati da infezioni chlamydiali (Peipert JF, 2003; Paavonen J et al. 1999). Dolore pelvico cronico, legato alla presenza di aderenze peritoneali, può verificarsi in più del 15% delle donne con precedenti episodi di PID (Rogstad K et al., 2008).

La sindrome di Fitz-Hugh-Curtis (FHC) o periepatite è stata descritta per la prima volta nel 1920 da Stajano, un ginecologo dell'Università di Montevideo. Si tratta dell'associazione tra Malattia Infiammatoria Pelvica ed aderenze tra diaframma e fegato. Questa sindrome vede associati dolore addominale al quadrante superiore destro, periepatite e infezioni dell'apparato genitale femminile da *C. trachomatis* e/o da *N. gonorrhoeae*. Inoltre frequentemente simula altre affezioni ed è particolarmente frequente in donne giovani sessualmente attive. La sindrome di FHC va sospettata ogni qualvolta una donna giovane, sessualmente attiva, presenti un quadro simile ad una colecistite (febbre e dolore all'ipocondrio destro a esordio subacuto o acuto), mentre sono irrilevanti i sintomi e i segni di salpingite.

Ci sono poche prove del coinvolgimento della *C. trachomatis* in corionamnionite (Rogstad K et al., 2008). Endometriti post-partum si verificano nel 30% delle donne con infezione prenatale da Chlamydia.

2.4.3. Infezioni neonatali

I neonati di madri affette da infezioni chlamydiali possono essere infettati al momento del parto. Il tasso di trasmissione attraverso le secrezioni vaginali infette è elevato (50-70%). Circa il 30-50% dei bambini di madri infette svilupperà una congiuntivite 5-10 giorni dopo la nascita. Almeno il 50% dei bambini con congiuntivite avrà anche naso faringite (Peipert JF et al., 2003). Una polmonite da Chlamydia si sviluppa in circa 30% di questi casi, dopo 2-3 settimane di incubazione. L'infezione non trattata, acquisita al momento della nascita, può persistere per mesi o anni (Hammerschlag MR, 1994; Stenberg K et al., 1986).

2.4.4. Linfogramuloma venereo (LGV)

In Paesi industrializzati come l'Italia e gli USA pochi casi di LGV sono registrati e riscontrati principalmente su immigrati o persone che hanno effettuato viaggi in particolari zone geografiche quali i Caraibi, Sud America, India e alcune zone dell'Africa, Paesi nei quali è,

invece, una patologia molto diffusa. Si verificano formazione di lesioni che con il passare del tempo diventano dolenti e fenomeni di lombalgia, diffusi principalmente nelle donne se la lesione riguarda la cervice uterina. Altre manifestazioni sono: cefalea, meningite asettica, febbre, mialgie, artralgie, congiuntivite, eritema nodoso, anoressia, dolore alle articolazioni e vomito. LGV è causato da ceppi di *C. trachomatis* appartenenti ai sierotipi L1, L2, L2a ed L3. Le infezioni causate dagli altri sierotipi di *C. trachomatis* interessano le cellule squamo-colonnari, mentre il LGV ha carattere sistemico e interessa le cellule endoteliali e linfoidi. I sierotipi L, che sono più invasivi dei sierotipi D-K, colpiscono il tessuto connettivo sottomucoso e sono in grado di diffondere ai linfonodi locoregionali. Le proctiti da LGV possono essere diagnosticate come malattia infiammatoria intestinale, e determinare una stenosi rettale (Manavi K et al., 2006)

La persistenza di casi di linfogranuloma venereo che possono contribuire alla trasmissione del virus di immunodeficienza umana (HIV) evidenzia l'importanza della necessità di controllare l'infezione.

TABLE I. Clinical manifestations of *Chlamydia trachomatis* infections

Serovar	Clinical manifestation	Complication
A–C	Keratoconjunctivitis	Scarring trachoma, blindness
D–K	Males: urethritis, proctitis Females: cervicitis, urethritis, proctitis	Epididymitis Endometritis, salpingitis, pelvic pain, ectopic pregnancy, perihepatitis (Fitz-Hugh–Curtis syndrome), infertility
	Males and females: conjunctivitis	Reiter's syndrome, reactive arthritis
LI–L3	Lymphogranuloma venereum: inguinal syndrome, proctitis	Fibrosis, rectal stricture

2.5. Diagnosi

Sono attualmente disponibili diverse tecniche che consentono la diagnosi sia diretta che indiretta o sierologica.

2.5.1. Diagnosi diretta. Tecnica di prelievo

Ci sono stati importanti sviluppi nel corso degli ultimi 30 anni. Dato che *C. trachomatis* è un batterio intracellulare obbligato, la coltura cellulare resta un metodo di riferimento, ma sono ora disponibili per diagnosi molti altri test non di tipo colturale.

Presupposto fondamentale della diagnosi diretta, che mira a identificare la presenza del microrganismo, di un suo antigene o di un suo frammento molecolare, rimane, come per le altre infezioni, la correttezza del prelievo, del suo trasporto e della sua conservazione.

I prelievi raccolti con tecnica invasiva includono i tamponi uretrali negli uomini, e nelle donne tamponi endocervicali o uretrali, e campioni prelevati dal tratto genitale superiore (liquido del cavo di Douglas, e prelievi endometriali e tubarici). Altri siti comprendono la congiuntiva, il nasofaringe o del tratto respiratorio inferiore.

I prelievi raccolti con tecnica non-invasiva includono le urine di primo getto (FVU), i tamponi vulvovaginali, tamponi anali e del pene (Tabella 3). La carica batterica di questi prelievi è uno dei principali aspetti della loro idoneità per la diagnosi, che può essere effettuata solo mediante test di amplificazione degli acidi nucleici (Naats o PCR) (Michel CEC et al., 2007).

I tamponi vaginali raccolti hanno una bassa carica batterica rispetto ai tamponi endocervicali, ma più alta rispetto a quella delle urine e si adattano bene ai programmi di screening (Schachter J et al., 2005). FVU è un tipo di campione idoneo per gli uomini (Gaydos CA et al., 2008). La sensibilità dei risultati ottenuti con penile-swab è inferiore a

quella con FVU (6th Meeting of the European Society for Chlamydia Research, abstract P10, Barbeyrac de B, 2008).

L'isolamento della *Chlamydia trachomatis* in coltura cellulare da prelievi endocervicali ed uretrali, considerato fino a poco tempo fa il test di riferimento standard (sensibilità stimata 70-90% e specificità 100%) (Essig A et al., 2008; Black CM et al., 1997), richiede laboratori specializzati in grado di garantire la qualità dell'indagine e un'attesa di tre-sette giorni per ottenere dei risultati.

2.5.2. L'immunofluorescenza diretta

Prevede l'uso di anticorpi monoclonali fluorescinati specie-specifici (DFA). I tempi di esecuzione sono brevi (circa 15 min.); la tecnica è semplice e necessita di un microscopio ad immunofluorescenza e di un operatore esperto (Black CM et al., 1997). La sensibilità varia dall'80-90% e la specificità dal 85-99%, sempre in riferimento alla metodica colturale e in relazione all'esperienza dell'operatore.

2.5.3. Il metodo immunoenzimatico (ELISA)

Identifica l'antigene mediante anticorpi monoclonali coniugati con un enzima, la perossidasi; la lettura spettrofotometrica fornisce risultati

obiettivi a prescindere dall'operatore. Il consensus generale riconosce all'immunoenzimatica minore sensibilità e specificità rispetto alle metodiche colturali e alla stessa immunofluorescenza diretta. Il suo uso routinario è giustificato dal basso costo, dalla semplicità di esecuzione, dalla facile lettura nonché dalla rapidità di esecuzione (30 min).

2.5.4. Tecniche di biologia molecolare, Polymerase Chain Reaction (PCR)

Le metodiche di ibridizzazione molecolare, con impiego di sonde biotinate e di tecniche di amplificazione genica (PCR), sono in grado di evidenziare minuscoli frammenti di DNA di *Chlamydia trachomatis* su prelievi uretrali, endocervicali o endometriali o su campioni di urina, con sensibilità e specificità pari al 100% (Leber AL et al., 2006; Schachter J et al., 2006) . La PCR amplifica le sequenze nucleotidiche di un plasmide criptico della *Chlamydia trachomatis* presente approssimativamente in un numero di copie variabile da 7 a 10 per corpo elementare così che risulta più vantaggioso in termini di sensibilità rispetto al DNA micromosomiale.

I test di amplificazione genica degli acidi nucleici devono essere considerati oggi i test “gold standard” per la diagnosi di infezione da *Chlamydia trachomatis*. Possono essere utilizzati per i programmi di screening e per l’individuazione della presenza di *C. trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae* nello stesso modello.

Il loro impiego è tuttora ancora limitato sia per i costi elevati sia per la necessità di disporre di laboratori attrezzati. Sebbene siano più costose dei test antigenici, queste tecniche consentono di identificare un maggior numero di soggetti infetti.

Nel 2006, una nuova variante di *C. trachomatis* appartenente al sierotipo E, con una delezione 377-bp nel plasmide criptico, è stata descritta in Svezia (Ripa T et al., 2006), dove è stata riportata un’alta percentuale (10-65%) di pazienti infette. Non vi è attualmente alcuna prova che la variante si sia diffusa ampiamente in tutta Europa (Lynagh Y et al. 2007; De Barbeyrac B et al. 2007). Questa nuova variante, ovviamente, non può essere rilevata da prove di amplificazione del segmento genomico deletato, ma può essere rilevata da un’amplificazione, ad esempio, del gene cromosomico *ompA* o dell’rRNA.

2.5.5. La sierologia

La sierologia è utile solo in alcuni casi di infezione da *C. trachomatis* e in studi sieroepidemiologici (Persson K et al. 2002). Mostra diversi inconvenienti, tra cui la cross-reattività sierologica tra *C. trachomatis* e *Chlamydomphila* specie. Non è impiegata nella diagnosi di routine di infezione genitale “superficiale” da *Chlamydia trachomatis*, in quanto non permette di distinguere un’infezione recente da una pregressa. La ricerca anticorpale può tuttavia assumere un ruolo diagnostico importante nelle infezioni genitali “profonde” (salpingiti e PID). Anche se non è raccomandata per la diagnosi di infezioni del tratto genitale inferiore, o per lo screening in pazienti asintomatici, la sierologia può essere utile per la diagnosi LGV, polmonite neonatale, le infezioni del tratto genitale superiore e per la valutazione del fattore di sterilità tubarica.

I metodi sierologici disponibili sono di fissazione del complemento, microimmunofluorescenza ed ELISA. Le ultime due consentono la distinzione tra le IgG, IgA e IgM.

La microimmunofluorescenza, che è specie e sierotipo-specifica, è considerata il metodo di riferimento.

L'ELISA (tecnica immunoenzimatica), può avvalersi di peptidi sintetici che possono evidenziare domini variabili del MOMP o del LPS ricombinante.

TABLE 2. Direct detection of *Chlamydia trachomatis*

Method	Turn-around time	Advantages	Limits
Cell culture	72 h	Specificity, strain	Sensitivity 80–85%
Antigen detection			
DFA	45 min	Simple, unit test	Sensitivity 75–80% Subjective reading
EIA	4 h	Automation	Sensitivity 75–80%
Point of care	30 min	Low cost, unit test	Low specificity (confirmatory test)
Molecular methods			
DNA probing	2 h	Easy to perform	Sensitivity 75–80%
Hybrid capture	4 h	Sensitivity 95% Specificity 99%	Only for cervical specimens (FDA)
NAAT (real-time PCR, SDA, TMA, NASBA)	2–4 h	Sensitivity >95% Specificity 99%	Contamination, costly processing of specimen

TABLE 3. Advantages and limits of main urogenital specimens

Sex	Specimen	Advantages	Limits	Usable technique
Men	Urethral swab	High sensitivity	Invasive	All tests
	Urine	Non-invasive Self-collected		NAATs Some EIA tests
	Penile swab	Non-invasive Self-collected	Low sensitivity	NAATs
Women	Cervical swab	High sensitivity	Invasive	All tests
	Urethral swab ^a	High sensitivity	Invasive	All tests
	Urine	Non-invasive Self-collected	Low sensitivity	NAATs
	Vaginal swab	Non-invasive Self-collected		NAATs

NAAT, nucleic acid amplification test; EIA, enzyme immunoassay.
^aOnly in association with cervical swabs to improve the diagnosis of infection.

CAPITOLO TERZO

IL NOSTRO STUDIO

3.1. Test di Screening

La prevalenza dell'infezione dipende dalle caratteristiche della popolazione studiata. Alcune condizioni costituiscono fattori di rischio: un dato costante è rappresentato dall'aumentata prevalenza dell'infezione nella popolazione giovanile, in particolare negli adolescenti (si stima un rischio relativo di 2,0-3,5 per le donne sotto i 25 anni d'età, rispetto a quelle di età superiore). Altri fattori di rischio identificati sono il mancato utilizzo di metodi contraccettivi di barriera, l'averne un nuovo partner o più partner, l'anamnesi positiva per malattie sessualmente trasmissibili e, dal punto di vista demografico, la nulliparità o il non essere sposati.

In molte nazioni l'infezione è considerata un problema di salute pubblica e, per questo motivo, sono stati proposti o realizzati dei programmi di screening per la popolazione a rischio. Laddove questi programmi sono stati adottati, nella popolazione sottoposta a screening si è osservato una riduzione della prevalenza dell'infezione

e delle sue complicanze. Uno studio controllato randomizzato condotto su una popolazione di donne a rischio sottoposta a screening (e ad eventuale trattamento) ha riscontrato un rischio relativo di malattia infiammatoria pelvica minore rispetto ai controlli (RR 0.45, CI 0.2-0.9) (Scholes D et al., 1996).

I vantaggi aumentano consensualmente alla prevalenza dell'infezione, che rappresenta però un fattore molto variabile nelle diverse popolazioni. Non esiste comunque un accordo su quale sia il tasso di prevalenza che giustifichi un programma di screening.

I programmi di screening, sinora realizzati sono di tipo opportunistico, vale a dire la popolazione target è stata identificata dai medici di medicina generale o dagli specialisti tra le donne giunte a controllo sanitario per qualsiasi motivo (ad esempio per eseguire il Pap test, per richiesta di contraccezione, per IVG, per gravidanza, ecc.) (ANAES, 2003; CDC, 2006). La possibilità di utilizzare un test di amplificazione dell'acido nucleico, eseguibile su materiale ottenuto con un semplice tampone vaginale prelevato dalla donna stessa o su un campione di urine, sembra aumentare l'adesione al programma.

Le aree di incertezza rimangono l'intervallo ottimale di screening nella popolazione a rischio e la possibilità di estenderlo alla popolazione maschile giovanile.

Come sottolineato dall'agenzia pubblica francese ANAES, lo screening delle donne sotto i 25 anni d'età ha come obiettivo la riduzione del tasso di complicanze dell'infezione, mentre uno screening che coinvolga anche agli uomini sotto i 30 anni si pone l'obiettivo di ridurre la prevalenza dell'infezione.

In Inghilterra lo screening è offerto annualmente a uomini e donne tra 16 e 25 anni di età sessualmente attivi, in vari setting sanitari e non (es. nelle scuole). In tre anni sono stati screenati oltre 180.000 persone con un tasso di positività di 10.4% per le femmine e 10.7% per i maschi (Department of Health, London, 2006). La valutazione costi/benefici di questo tipo di programma sembra favorevole se si considera un'incidenza di malattia infiammatoria pelvica in seguito all'infezione pari o superiore al 10% (Adams EJ et al., 2007). L'analisi costo/efficacia di un programma di screening attivo, con invito diretto a tutta la popolazione a rischio, non sembra vantaggioso alla luce delle attuali stime delle complicanze, che mostrano un tasso nettamente più basso di quello comunemente considerato (Low N et al., 2007).

Nella tabella in calce sono riassunte le principali raccomandazioni elaborate da agenzie pubbliche o società scientifiche sulle modalità di screening.

Raccomandazioni per lo screening

Agenzia produttrice (anno)	Popolazione da sottoporre a screening	Frequenza dello screening
American Academy of Pediatrics (2000)	- tutte le giovani donne sessualmente attive	- annuale
American College of Obstetricians and Gynecologists (2003)	- tutte le giovani donne sessualmente attive e le donne a rischio d'infezione	- non specificato
American College of Preventive Medicine (2003)	- tutte le donne sessualmente attive a rischio: età <25 anni, nuovo o più partner nell'anno precedente, mancato utilizzo di metodi contraccettivi barriera, storia di MST, ectopia cervicale. - donne in gravidanza	- annuale - nel primo trimestre in tutte le donne, nel terzo trimestre se presenti fattori di rischio
American Medical Association (1997)	- tutte le giovani donne sessualmente attive	- annuale
Canadian Task Force on Preventive Health Care (1996)	- tutte le persone a rischio: donne sessualmente attive di età <25 anni, donne e uomini con un nuovo o più partner nell'anno precedente, mancato utilizzo di metodi contraccettivi barriera. - donne in gravidanza	- non specificato - nel primo trimestre in tutte le donne
Centers for Disease Control and Prevention (2006)	- tutte le donne sessualmente attive <25 anni o di età maggiore se presente un fattore di rischio: es. nuovo o più partner nei tre mesi precedenti; - donne in gravidanza	- annuale - nel primo trimestre in tutte le donne, nel terzo trimestre se presenti fattori di rischio (es. età <25 anni)
US Preventive Services Task Force (2001)	- tutte le donne <25 anni sessualmente attive e le donne a rischio d'infezione - tutte le donne in gravidanza <25 anni o a rischio d'infezione	- intervallo ottimale incerto - intervallo ottimale incerto
UK Department of Health (2006)	- tutte le donne e uomini <25 anni sessualmente attive o a rischio	- annuale, da ripetere eventualmente in base al rischio individuale (es. cambio di partner)
Scottish Intercollegiate Guideline Network (2000)	- tutte le donne <25 anni sessualmente attive e le donne >25 anni a rischio d'infezione (es. nuovo o più partner nell'anno precedente)	- intervallo ottimale incerto
Victorian Government Department of Human Services (2006)	- tutte le donne sessualmente attive < 25 anni - adolescenti in gravidanza	- annuale - primo trimestre
Agence Nationale d'Accreditation et d'Evaluation en Santé (2003)	Sono state formulate tre proposte: - tutte le donne <25 anni sessualmente attive - tutte le donne <25 anni e gli uomini <30 anni - estensione ai soggetti a rischio qualunque sia l'età	- non specificato

SaPeRIDoc - Centro di documentazione online sulla salute perinatale e riproduttiva

I soggetti che devono essere sottoposti a screening sono principalmente donne che presentano: secrezioni vaginali, sanguinamento post-coitale o intermestruale o spotting in corso di terapia estro-progestinica, cervice iperemica con segni di flogosi e facilmente sanguinante, uretrite, malattia infiammatoria pelvica, dolore pelvico e artrite reattiva (in donne sessualmente attive); gli uomini sarebbe opportuno che si sottoponessero allo screening, in presenza di: secrezioni uretrali, disuria, uretrite, epididimo-orchite ed artrite reattiva (in sessualmente attivi).

Inoltre lo screening deve essere proposto, dopo un'interruzione volontaria di gravidanza, nei pazienti affetti da una malattia a trasmissione sessuale, ai partners sessuali di soggetti affetti da *Chlamydia trachomatis*, alle madri di bimbi affetti da congiuntivite o polmonite, alle donne che hanno subito interventi chirurgici in cavità uterina e che presentano fattori di rischio per infezione da *Chlamydia trachomatis*, ai donatori di liquido seminale o di ovociti, ed in generale alle donne e agli uomini di età <25 anni e sessualmente attivi, ed inoltre alle donne di qualsiasi età con due o più partners sessuali nell'ultimo anno o che hanno cambiato partner sessuale nell'ultimo anno.

I benefici di ogni programma di screening , cioè i tassi di aumento delle diagnosi e quindi il trattamento, con conseguente riduzione delle complicanze, devono sempre essere valutati rispetto ai costi, non solo per gli operatori sanitari, ma anche per i pazienti. Lo screening, ed in particolare i risultati falsi positivi, possono provocare ansia, le visite ripetute possono comportare difficoltà e costi elevati in termini di viaggio o di perdita di giorni lavorativi, i risultati falsi negativi potrebbero portare a involontaria ritrasmissione, e lo screening può portare ad un falso senso di sicurezza.

Nei Paesi basati su sistemi di assicurazione sanitaria, gli operatori del settore devono essere coinvolti nelle discussioni sui programmi di screening in quanto questi saranno efficaci solo se la diagnosi sarà coordinata al trattamento. I farmaci disponibili per la Chlamydia sono poco costosi e semplici da gestire, così il costo della diagnosi in più casi non sarà dispendioso, con il risultato di benefici a lungo termine e un risparmio in termini di riduzione delle complicanze quali PID, infertilità tubarica e gravidanze extrauterine, che invece sono potenzialmente più gravi e che quindi comporterebbero spese notevoli per il Servizio Sanitario e/o per i pazienti.

I costi e i benefici potenziali di uno screening sulla Chlamydia dipenderanno:

- dalla prevalenza dell'infezione chlamydiale in una popolazione;
- dalla capacità di identificare e raggiungere le popolazioni ad alto rischio;
- dal comportamento sessuale (che influisce sui tassi di trasmissione e di reinfezione);
- dalla sensibilità e dalla specificità dei metodi di prova utilizzati;
- dall'adozione di screening nelle popolazioni target;
- dalla compliance del trattamento nei soggetti infetti.

Esistono due principali metodi di screening: proattivo, che si prefigge di sottoporre allo screening l'intera popolazione target, e opportunistico, sottoponendo all'esame gli individui che si rivolgono ad un settore sanitario specifico (Jones R et al., 2007). L'approccio opportunistico, scegliendo come target individui sessualmente attivi sotto i 25 anni di età, che si rivolgono a strutture sanitarie specifiche, è utilizzato nella maggior parte dei programmi di screening della Chlamydia negli Stati Uniti, Regno Unito e in Francia. In questo momento, le ricerche sono necessarie a stabilire i vantaggi e gli svantaggi di questi programmi (Low N et al., 2007).

Diciotto Stati membri dell'Unione Europea e partecipanti al progetto "Chlamydia Control in Europe" (Stoccolma, luglio 2009) dell'European Centre For Disease Prevention and Control (ECDC, 2009), hanno convenuto che nessun programma di screening per la *C. trachomatis* attuato ha raggiunto gli standard ottimali. Solo in sei di questi Stati, individui asintomatici possono accedere ai test di screening per la Chlamydia, quando frequentano altri servizi sanitari. I gruppi selezionati per tale "screening opportunistico" variano i Paesi. Ad esempio, in Islanda il test viene offerto alle donne che hanno abortito, in Estonia è offerto alle donne in gravidanza e a coloro che cambiano frequentemente partner sessuali, in Norvegia è offerto alle donne che hanno subito un aborto o che hanno avuto bisogno di cure prenatali, ai giovani sotto i 25 anni che hanno cambiato recentemente partner e ai partner dei pazienti con una STI; in Danimarca, due comunità riceveranno inviti postali annuali dove viene loro ricordato di effettuare il test. In Inghilterra nel 2007 sono stati sottoposti a screening gli uomini sessualmente attivi e donne di età inferiore ai 25 anni invitando a recarsi in strutture ospedaliere e non solo (ad esempio, nelle università). Nei Paesi Bassi, è stato introdotto, all'inizio del 2008 un programma pilota che prevede l'invio annuale di

inviti postali in tre regioni ai giovani tra i 16 e i 29 anni. Un registro basato su programmi di screening mediante inviti postali è previsto in Norvegia. Presto altri nove Paesi introdurranno programmi di screening di tipo opportunistico per la Chlamydia. In Svezia lo screening è diffuso in tutto lo stato, ma le attività di controllo sono finanziate e realizzate da ciascuna contea e non sono coordinate a livello nazionale. Elevati tassi di screening pro-capite sono realizzati anche in Norvegia, nonostante la mancanza di un programma nazionale.

Un programma di screening deve avere un buon rapporto costo-efficacia e deve essere reso accettabile per il paziente utilizzando procedure non invasive che consentano di raccogliere il campione nel modo meno traumatico e più semplice per il soggetto. Attualmente il metodo più utilizzato per la raccolta del campione è il tampone vaginale o cervico-vaginale, sottoposto a PCR.

3.2. Il nostro studio

L'infezione da Chlamydia non trattata adeguatamente con antibiotici, anche perché spesso misconosciuta, può portare allo sviluppo di una

malattia infiammatoria pelvica (PID) nel 10-40% delle donne colpite, che a sua volta può determinare infertilità, gravidanza ectopica e dolore infiammatorio pelvico.

Questo piccolo e subdolo microrganismo può infettare dapprima le vie genitali femminili inferiori, per poi risalire e danneggiare l'endometrio e l'epitelio tubarico, provocando danni tali da compromettere in maniera, talvolta irreversibile, la fertilità.

Proprio partendo da questi presupposti, ed in particolare dal fatto che queste donne possono presentare notevoli difficoltà nel concepimento, nonostante l'assoluta mancanza di sintomatologia, abbiamo arruolato per il nostro studio 68 donne di età compresa tra i 22 e i 43 anni, afferenti al Centro di Fisiopatologia della Riproduzione Umana dell'Ospedale S. Bambino di Catania dal 2008 a 2011, per sottoporle agli esami del caso.

Abbiamo sottoposto tutte le donne arruolate ad uno screening microbiologico prelevando da ognuna di esse due campioni.

Il primo campione è stato ottenuto mediante un tampone dell'escervice e dell'endocervice, ovvero mediante cytobrush (per la ricerca della Chlamydia il tampone va inserito per 1,5 cm oltre la giunzione squamosa).

Il secondo campione è stato ottenuto mediante screaping, un dispositivo per il prelievo bioptico inserito attraverso la cervice, che consente di ottenere un piccolo frustolo di tessuto endometriale in maniera mininvasiva e davvero veloce.

Lo scopo era quello di individuare l'incidenza dell'infezione in donne con infertilità. Inoltre l'introduzione nello screening di un prelievo di cellule basali di endometrio tramite uno screaper monouso voleva individuare quei casi di infezioni che risultavano negativi al cytobrush e viceversa.

La Chlamydia è stata riscontrata nell'endometrio di pazienti nelle quali la coltura cervicale era negativa, spesso infatti la cervice può apparire normale o avere un ectropion con o senza essudato purulento e perdite ematiche. Lo screaping endometriale è risultato inoltre privo di complicanze significative e di facile esecuzione.

3.2.1. Risultati prelievo endometriale

Abbiamo trovato il 53% dei campioni endometriali positivi per la presenza di agenti patogeni.

Di questi: **il 33,3% è risultato positivo per Chlamydia**, il 19% per Staph. Aureus, il 19% per E. Coli, il 4,8% per la Candida, il 4,8% per l'Enterobacter, il 9,5% per Streptococco; il 4,8% per C. Pneumoniae;

il 4,8% per Str. Agalactiae. Alcune pazienti sono risultate positive a più agenti patogeni.

3.2.2. Risultati prelievo vaginale

Il 65% dei campioni ottenuti mediante striscio vaginale è risultato positivo ad agenti patogeni, di cui: il 25% di questi per la presenza di flora batterica coccacea; il 20% è risultato positivo per la Gardnerella vaginalis, il 10% per la Candida, il 45% era positivo per la presenza di flora batterica vaginale mista.

3.2.3. Prelievo Endometriale vs Prelievo Vaginale

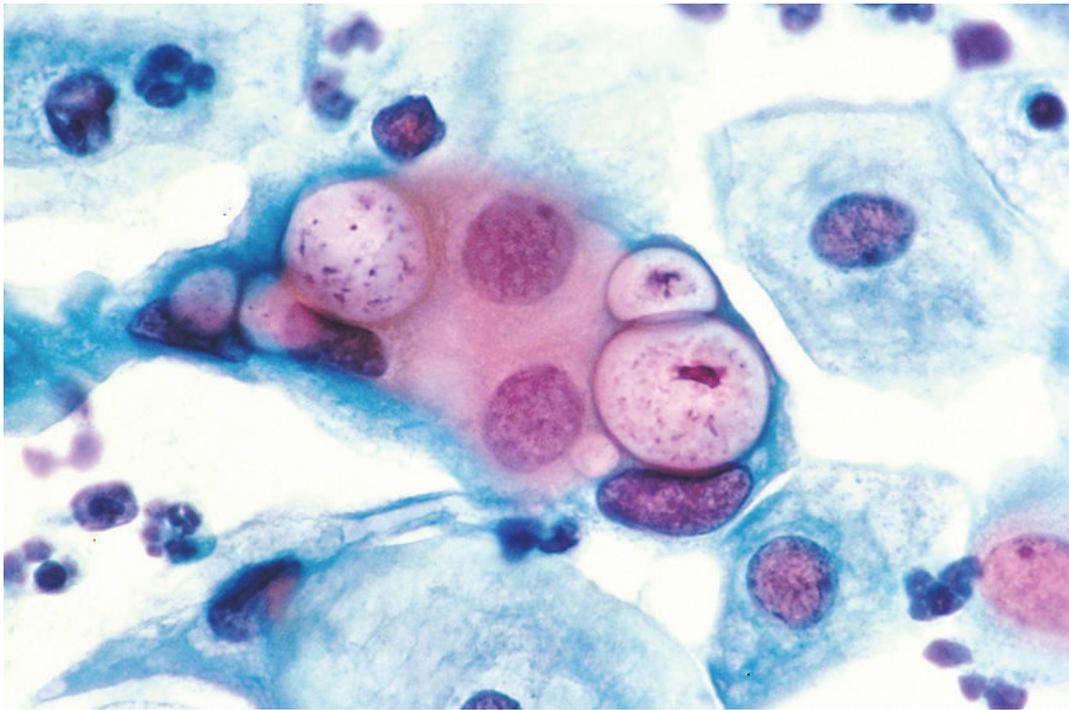
Nel 20,6% dei casi il prelievo endometriale è risultato positivo con striscio vaginale negativo. Mentre nel 32,4% dei casi il prelievo endometriale è risultato negativo con pap test positivo.

Entrambi i prelievi sono risultati positivi nel 32,4% dei casi mentre nel 14,7% erano entrambi negativi.

Volendo trarre velocemente le nostre prime conclusioni possiamo dire che l'85% delle nostre pazienti erano positive per infezioni delle basse vie genitali, evidenziando in tal modo il ruolo centrale di certi agenti

patogeni nel determinare infezioni che possono avere un ruolo centrale nella genesi dell'infertilità.

Inoltre è apparso evidente il ruolo chiave della *C. trachomatis*, spesso presente, anche in forma asintomatica, senza correlazione con un risultato positivo al pap test e come agente patogeno maggiormente presente nell'endometrio di donne affette da infertilità.



Human pap smear showing Chlamydia in the vacuoles at 500x and stained with H&E.

CONCLUSIONI

La Chlamydia è un serio problema di salute pubblica, perché, anche se l'infezione decorre spesso senza sintomi, può determinare gravi conseguenze a lungo termine in un'alta percentuale di casi (Cates W et al., 1991). Nelle donne, la Chlamydia può provocare una malattia infiammatoria pelvica (PID), infertilità tubarica e gravidanza ectopica. Nel Regno Unito è stato stimato che 64.000 casi di PID e 3.000 di gravidanze extrauterine ogni anno sono attribuibili a questa infezione. Queste complicazioni causano notevoli difficoltà per gli individui e, in caso di infertilità, hanno implicazioni importanti anche sui costi per il servizio sanitario (Adams EJ et al., 2007).

Il numero dei casi di Chlamydia diagnosticati continua a crescere in numerosi Paesi dell'Unione Europea (ECDC, 2008), in America ed in tutti i Paesi in cui vanno diffondendosi le numerose campagne di screening. Questo aumento è dovuto in parte alla maggiore sensibilità al problema da parte delle istituzioni che si stanno impegnando per la diffusione delle campagne di screening ed in parte ad una maggiore sensibilità dei test utilizzati per la diagnosi dell'infezione stessa.

Inoltre diventa difficile paragonare l'incidenza dell'infezione nei vari Paesi data la diversa attuazione e diffusione dei programmi di screening. Malgrado l'aumento dell'adesione all'esame da parte delle donne, la maggior parte dei casi rimangono inosservati e quindi non trattati.

Non dimentichiamo inoltre il problema sollevato dal nostro studio, ovvero che sottoponendo la donna al semplice tampone vaginale per l'esame di screening potremmo anche rischiare di sottostimare l'infezione, che potrebbe in realtà essere presente a livello endometriale e/o tubarico e creare nel tempo i danni più temuti per la coppia, fino a mettere a rischio la fertilità.

Ci domandiamo quindi se non sarebbe preferibile attuare una metodica di screening più accurata associando il prelievo endometriale (semplice, non richiedente sedazione, veloce e più accurato) allo striscio o tampone vaginale che da solo fornisce un quadro meno completo e meno veritiero nell'individuazione della Chlamydia, soprattutto se questa si ritrova esclusivamente a livello delle vie genitali superiori (ad esempio in seguito ad auto-meditazioni con lavande vaginali, terapie antibiotiche poco mirate o attuate per altri scopi).

In fondo non sottoporremo la donna ad uno stress maggiore, trattandosi di un esame veloce e poco invasivo (il sistema biotico, screaping, introdotto attraverso la cervice è molto sottile e non richiede anestesia). Con questa procedura saremmo anche più sicuri di non tralasciare un'infezione proprio dove i danni provocati dalla Chlamydia sarebbero più deleteri.

Quindi riteniamo che sia lo screening tradizionale (tampone vaginale) sia lo screaping endometriale debbano essere introdotti negli esami di routine per la prevenzione delle malattie sessualmente trasmesse.

BIBLIOGRAFIA

- Adams EJ, Turner KM, Edmunds WJ. The cost effectiveness of opportunistic chlamydia screening in England. *Sex Transm Infect* 2007; 83:267-74.
- Adams EJ, Turner KM, Edmunds WJ. The cost effectiveness of opportunistic chlamydia screening in England. *Sex Transm Infect*. 2007; 83:267-74.
- Agence Nationale d'Accreditation et d'Evaluation en Santé (ANAES). Évaluation du dépistage des infections uro-génitales basses à *Chlamydia trachomatis* en France. Paris: ANAES; 2003.
- Akande V (2002) Tubal pelvic damage: prediction and prognosis. *Hum Fertil (Camb)* 5,S15-S20.
- Baczynska A, Funch P, Fedder J, Knudsen HJ, Birkelund S and Christiansen G (2006) Morphology of human Fallopian tubes after infection with *Mycoplasma genitalium* and *Mycoplasma hominis*—in vitro organ culture study. *Hum Reprod* 22, No.4 pp. 968-979.
- Baczynska A, Svenstrup HF, Fedder J, Birkelund S and Christiansen G (2004) Development of real-time PCR for detection of *Mycoplasma hominis*. *BMC Microbiol* 4,35.
- Baczynska A, Svenstrup HF, Fedder J, Birkelund S and Christiansen G (2005) The use of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Mycoplasma hominis* antibodies in infertile women serum samples. *Hum Reprod* 20,1277-1285.

- Barbeyrac de B, Papaxanthos Roche A, Mathieu C et al. Chlamydia trachomatis in subfertile couples undergoing an in vitro fertilization program: a prospective study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2006; 129:46-53.
- Barbeyrac de B, Raheison S, Bernabeu A et al. Dépistage de l'infection à Chlamydia trachomatis dans la population d'étudiantes des universités de Bordeaux, France, 2004. *Bull Epidemiol Hebd* 2006; 38: 288-290.
- Baud D, Jaton K, Bertelli C, Kulling JP, Greub G. Low prevalence of Chlamydia trachomatis infection in asymptomatic young Swiss men. *BMC Infect Dis* 2008; 8: 45.
- Beatty WL, Morrison RP, Byrne GI. Persistent chlamydiae: from cell culture to a paradigm for chlamydial pathogenesis. *Microbiol Rev* 1994; 58: 686-699.
- Bébéar C. and de Barbeyrac B. Review. Genital Chlamydia trachomatis infections. *Clin Microbiol Infect* 2009; 15: 4-10.
- Belland RJ, Scidmore MA, Crane DD, Hogan DM, Whitmire W, McClarty G and Caldwell HD (2001) Chlamydia trachomatis cytotoxicity associated with complete and partial cytotoxin genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 98,13984-13989.
- Belland RS, Sudmoze MA, Carne DD et al. Chlamydia trachomatis cytotoxicity associated with complete and partial cytotoxin genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 98: 13984-13989.
- Black CM. Current methods of laboratory diagnosis of Chlamydia trachomatis infections. *Clin Microbiol Rev* 1997; 10: 160-184.

- Cates W, Wasserheit JN. Genital chlamydial infections: epidemiology and reproductive sequelae. *Am J Obstet Gynecol.* 1991; 164:1771-81.
- CDC. Sexually transmitted disease surveillance, 2007. Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services, CDC; 2009. Available at www.cdc.gov/std/stats07/toc.htm.
- Centers for Disease and Control and Prevention. Sexually transmitted diseases treatment guidelines 2006. *MMWR* 2006; 55(RR11): 1-80.
- Centers for Disease Control and Prevention. Expedited partner therapy in the management of sexually transmitted diseases. Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services, 2006.
- Clausen HF, Fedder J, Drasbek M, Nielsen PK, Toft B, Ingerslev HJ, Birkelund S and Christiansen G (2001) Serological investigation of *Mycoplasma genitalium* in infertile women. *Hum Reprod* 16,1866-1874.
- Cohen CR, Mugo NR, Astete SG, Odondo R, Manhart LE, Kiehlbauch JA, Stamm WE, Waiyaki PG and Totten PA (2005) Detection of *Mycoplasma genitalium* in women with laparoscopically diagnosed acute salpingitis. *Sex Transm Infect* 81,463-466.
- Cooper MD, Rapp J, Jeffery-Wiseman C, Barnes RC and Stephens DS (1990) Chlamydia trachomatis infection of human fallopian tube organ cultures. *J Gen Microbiol* 136,1109-1115.

- Coutinho RA, Riksdijk AJ, van den Hoek JA, Leentvaar-Kuijpers A. Decreasing incidence of PID in Amsterdam. *Genitourinary Medicine*. 1992; 68:353-5.
- Crossman SH (2006) The challenge of pelvic inflammatory disease. *Am Fam Physician* 73,859-864.
- Darville T. *Chlamydia* spp. In: Nataro JP, Blaser J, Cunningham-Rundles S, eds, *Persistent bacterial infections*. Washington, DC: ASM Press, 2000; 229-261.
- de Barbeyrac B, Raheison S, Cado S et al. French situation concerning the Swedish *Chlamydia trachomatis* variant. *Euro Surveill* 2007; 12: E11-E12.
- Dean D, Suchland RJ, Stamm WE. Evidence for long-term cervical persistence of *Chlamydia trachomatis* by *omp1* genotyping. *J Infect Dis* 2000; 182: 909-916.
- Department of Health. National *Chlamydia* screening programme. Core requirements. London: Department of Health; 2006.
- Donnez J, Casanas-Roux F, Caprasse J, Ferin J and Thomas K (1985) Cyclic changes in ciliation, cell height, and mitotic activity in human tubal epithelium during reproductive life. *Fertil Steril* 43,554-559.
- Donnez J, Casanas-Roux F, Ferin J and Thomas K (1984) Fimbrial ciliated cells percentage and epithelial height during and after salpingitis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 17,293-299.
- ECDC. Review of *chlamydia* control activities in EU countries. ECDC Technical Report, Stockholm 2008.

- Edwards JL, Shao JQ, Ault KA and Apicella MA (2000) *Neisseria gonorrhoeae* elicits membrane ruffling and cytoskeletal rearrangements upon infection of primary human endocervical and ectocervical cells. *Infect Immun* 68,5354-5363.
- ESHRE (1996) Infertility revisited: the state of the art today and tomorrow, The ESHRE Capri Workshop, European Society for Human Reproduction and Embryology. *Hum Reprod* 11,1779-1807.
- Essig A. Chlamydia and Chlamydozoa. In: Murray PR, Baron EJ, Tenover JC, Tenover FC, eds. *Manual of clinical microbiology*, 9th edn. Washington, DC: ASM Press, 2007; 1021-1035.
- ESSTI. Sexually transmitted infections in Europe. Health Protection Agency, 2008. No.3.
- European Centre for Disease Prevention and Control: Annual epidemiological report on communicable diseases in Europe 2009. Stockholm: European Centre for Disease Prevention and Control. In press 2009.
- Fleming DT, Wasserheit JN. From epidemiological synergy to public health policy and practice: the contribution of other sexually transmitted diseases to sexual transmission of HIV infection. *Sex Transm Infect.* 1999; 75:3-17.
- Gaydos CA, Ferrero DV, Papp J. Laboratory aspects of screening men for *Chlamydia trachomatis* in the new millennium. *Sex Transm Dis* 2008; 35: 545-550.

- Giertz G, Kallings I, Nordenvall M, Fuchs T. A prospective study of Chlamydia trachomatis infection following legal abortion. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 1987; 66:107-109.
- Gray JA. New concepts in screening. *Br J Gen Pract.* 2004; 54:292-8.
- Hammerschlag MR. Chlamydia trachomatis in children. *Pediatr Ann* 1994; 23: 349-353.
- Hammerschlag MR. Chlamydial infections in infants and children. In: Holmes KK, Mardh PA, Sparling PF, editors. *Sexually transmitted diseases.* 3rd ed. New York: McGraw Hill; 1999. p. 593.
- Harvey HA, Ketterer MR, Preston A, Lubaroff D, Williams R and Apicella MA (1997) Ultrastructural analysis of primary human urethral epithelial cell cultures infected with *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect Immun* 65,2420-2427.
- Hicks D. Complications of Chlamydia trachomatis infection in men. In: Moss TR, ed. *International handbook of Chlamydia*, 3rd edn. Haslemere, UK: Alden Press, 2008; 99-109.
- Hoffmann S, Jensen JS. Mutant Chlamydia trachomatis in Denmark. *Euro Surveill* 2007; 12: E7-E8.
- Jones R, Boag F. Screening for Chlamydia trachomatis—opportunistic approaches have little evidence to support them. *BMJ* 2007; 334: 703-704.
- Leber AL, Hall GS, LeBar WD. Nucleic acid amplification tests for detection of Chlamydia trachomatis and *Neisseria gonorrhoeae*. In: Sharp SE, ed. *Cumitech 44*. Washington, DC: ASM Press, 2006, pp. 1-38.

- Low N, Bender N, Nartey L, Redmond S. Revised rapid review of effectiveness — chlamydia screening. Available from: www.nice.org.uk.
- Low N, Bender N, Nartey L, Shang A, Stephenson JM. Effectiveness of chlamydia screening: systematic review. *Int J Epidemiol*. 2008; 1-14. doi:10.1093/ije/dyn222.
- Low N, McCarthy A, Macleod J, Salisbury C, Campbell R, Roberts TE, et al. Epidemiological, social, diagnostic and economic evaluation of population screening for genital chlamydial infection. *Health Technol Assess* 2007; 11:8.
- Low N, McCarthy A, Macleod J. Epidemiological, social, diagnostic and economic evaluation of population screening for genital chlamydial infection. *Health Technol Assess*. 2007; 11:1-184.
- Low N. Current status of chlamydia screening in Europe. *Euro Surveill*. 2004; 8.
- Low N. Screening programmes for chlamydial infection: when will we ever learn? *BMJ* 2007; 334: 725-728.
- Low N. Screening programmes for chlamydial infection: when will we ever learn? *BMJ* 2007; 334:725-8.
- Lynagh Y, Walsh A, Crowley B. First report of the new variant strain of *Chlamydia trachomatis* in Ireland. *Epi-Insight* 2007; 8: 4.
- Macleod J, Salisbury C, Low N. Coverage and uptake of systematic postal screening for genital *Chlamydia trachomatis* and prevalence of infection in the United Kingdom general population: cross sectional study. *BMJ*. 2005; 330:940-2.

- Manavi K. A review on infection with *Chlamydia trachomatis*. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2006; 20: 941-951.
- Mårdh PA and Weström L (1970a) Tubal and cervical cultures in acute salpingitis with special reference to *Mycoplasma hominis* and T-strain mycoplasmas. *Br J Vener Dis* 46,179-186.
- Mårdh PA and Weström L (1970b) Antibodies to *Mycoplasma hominis* in patients with genital infections and in healthy controls. *Br J Vener Dis* 46,390-397.
- Mårdh PA, Weström L, von Mecklenburg C and Hammar E (1976) Studies on ciliated epithelia of the human genital tract. I. Swelling of the cilia of Fallopian tube epithelium in organ cultures infected with *Mycoplasma hominis*. *Br J Vener Dis* 52,52-57.
- McGee ZA and Woods ML, Jr (1987) Use of organ cultures in microbiological research. *Annu Rev Microbiol* 41,291-300.
- Melly MA, Gregg CR and McGee ZA (1981) Studies of toxicity of *Neisseria gonorrhoeae* for human fallopian tube mucosa. *J Infect Dis* 143,423-431.
- Melly MA, McGee ZA and Rosenthal RS (1984) Ability of monomeric peptidoglycan fragments from *Neisseria gonorrhoeae* to damage human fallopian-tube mucosa. *J Infect Dis* 149,378-386.
- Meyers DS, Halvorson H, Luckhaupt S. Screening for chlamydia infection: an evidence update for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med.* 2007; 147:135-42.

- Michel CE, Solomon AW, Magbanua JP et al. Field evaluation of a rapid point-of-care assay for targeting antibiotic treatment for trachoma control: a comparative study. *Lancet* 2006; 367: 1585-1590.
- Michel CEC, Sonnex C, Carne CA et al. Chlamydia trachomatis load at matched anatomic sites: implications for screening strategies. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 1395-1402.
- Moghaddam A, Reinton N. Identification of the Swedish Chlamydia trachomatis variant among patients attending a STI clinic in Oslo, Norway. *Euro Surveill* 2007; 12: E070301.
- Møller BR, Taylor-Robinson D, Furr PM, Toft B and Allen J (1985) Serological evidence that chlamydiae and mycoplasmas are involved in infertility of women. *J Reprod Fertil* 73,237-240.
- National Chlamydia Screening Programme in England: Programme overview. Available from: www.dh.gov.uk/assetRoot/04/09/26/48/04092648.pdf.
- New frontiers: annual report of the National Chlamydia Screening Programme in England. 2005/06. London: Health Protection Agency; 2006.
- Paavonen J, Eggert-Kruse W. Chlamydia trachomatis: impact on human reproduction. *Hum Reprod Update* 1999; 5: 433-447.
- Paget WJ, Zbinden R, Ritzler E et al. National laboratory reports of Chlamydia trachomatis seriously underestimate the frequency of genital chlamydial infections among women in Switzerland. *Sex Transm Dis* 2002; 29: 715-720.

- Patton DL, Moore DE, Spadoni LR, Soules MR, Halbert SA and Wang SP (1989) A comparison of the fallopian tube's response to overt and silent salpingitis. *Obstet Gynecol* 73,622-630.
- Peipert JF. Clinical practice. Genital chlamydial infections. *NEJM*. 2003; 349:2424-30.
- Peipert JF. Clinical practice. Genital chlamydial infections. *N Engl J Med* 2003; 349: 2424-2430.
- Persson K. The role of serology, antibiotic susceptibility testing and serovar determination in genital chlamydial infections. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2002; 16: 801-814.
- Razin S, Yogev D and Naot Y (1998) Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol Mol Biol Rev* 62,1094-1156.
- Ripa T, Nilsson P. A variant of *Chlamydia trachomatis* with deletion in cryptic plasmid: implications for use of PCR diagnostic tests. *Euro Surveill* 2006; 11: E061109.
- Rogstad K. Complications in the female and their management. In: Moss T, ed. *International handbook of Chlamydia*, 3rd edn. Haslemere, UK: Alden Press, 2008; 111-121.
- Schachter J, Chernesky MA, Willis DE et al. Vaginal swabs are the specimens of choice when screening for *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*: results from a multicenter evaluation of the APTIMA assays for both infections. *Sex Transm Dis* 2005; 32: 725-728.

- Schachter J, Chow JM, Howard H, Bolan G, Moncada J. Detection of Chlamydia trachomatis by nucleic acid amplification testing: our evaluation suggests that CDC-recommended approaches for confirmatory testing are ill-advised. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 2512-2517.
- Scholes D et al. Prevention of pelvic inflammatory disease by screening for cervical chlamydia infection *N Engl J Med* 1996; 334:1362-6.
- Stenberg K, Mardh PA. Persistent neonatal chlamydial infection in a 6-year-old girl. *Lancet* 1986; 2: 1278-1279.
- Suchland RJ, Geisler WM, Stamm WE. Methodologies and cell lines used for antimicrobial susceptibility testing of Chlamydia spp. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 636-642.
- Trelle S, Shang A, Nartey L, Cassell JA, Low N. Improved effectiveness of partner notification for patients with sexually transmitted infections: systematic review. *BMJ*. 2007; 334:354-357.
- Tully JG, Taylor-Robinson D, Cole RM and Rose DL (1981) A newly discovered mycoplasma in the human urogenital tract. *Lancet* 1,1288-1291.
- Turner KME, Adams EJ, LaMontagne DS, Emmett L, Baster K, and Edmunds WJ. Modelling the effectiveness of chlamydia screening in England. *Sex Transm Infect*. 2006; 82:496-502.
- van Bergen J, Gotz HM, Richardus JH, Hoebe CJ. Prevalence of urogenital Chlamydia trachomatis increases significantly with level of urbanisation and suggests targeted screening approaches: results from the first national population based study in the Netherlands. *Sex Transm Infect*. 2005; 81:17-23.

- van de Laar MJ, Fenton KA, Ison C. Update on the European lymphogranuloma venereum epidemic among men who have sex with men. *Euro Surveill* 2005; 10: E050602.
- van de Laar MJ, Morre SA. Chlamydia: a major challenge for public health. *Euro Surveill* 2007; 12: E1-E2. Available at: www.eurosurveillance.org/em/v12n10/1210-221.asp.
- Ward ME. Mechanisms of Chlamydia-induced disease. In: Stephens RS, ed. *Chlamydia*. Washington, DC: ASM Press, 1999; 171-210.
- Warford A, Chernesky M, Peterson EM. Laboratory diagnosis of Chlamydia trachomatis infections. In: Gleaves CA, ed. *Cumitech 19A*. Washington, DC: ASM Press, 1999, pp. 1-18.
- Warszawski J. Dépistage systématique des infections à Chlamydia trachomatis: il est temps d'agir. *Bull Epidémiol Hebd* 2006; 38: 275-276.
- Witkin SS, Kligman I, Grifo JA and Rosenwaks Z (1995) Ureaplasma urealyticum and Mycoplasma hominis detected by the polymerase chain reaction in the cervixes of women undergoing in vitro fertilization: prevalence and consequences. *J Assist Reprod Genet* 12,610-614.
- World Health Organization Task Force on the Prevention and Management of Infertility (1995) Tubal infertility: serologic relationship to past chlamydial and gonococcal infection. *Sex Trans Dis* 22,341-346.

Sitografia

- www.cdc.gov
- www.dh.gov.uk
- www.ecdc.europa.eu
- www.epicentro.iss.it
- www.eurosurveillance.org
- www.nice.org.uk