

Χρειάζεται η μοριακή ανίχνευση μολυσματικών παραγόντων στο ενδομήτριο ασυμπτωματικών γυναικών με ιστορικό υπογονιμότητας πριν την προσπάθεια εξωσωματικής γονιμοποίησης;



Βάια Γώτα, Μάρυ-Ρόσα Μητροπούλου, Σόνια Τεφτσόγλου και Θεοδόσιος Αρκουλής
Κέντρο Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής «MITΩΣΗ», Πειραιάς

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή/Σκοπός: Μία χρόνια λοίμωξη του γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος από σεξουαλικά μεταδιδόμενους μικροοργανισμούς, που παραμένει αθεράπευτη, μπορεί να οδηγήσει σε φλεγμονή του ενδομητρίου, προκαλώντας έτσι σοβαρές επιπλοκές όπως αποβολή, φραγμό των σαλπίγγων και υπογονιμότητα. Για το λόγο αυτό, στην παρούσα μελέτη ασχοληθήκαμε με την ανίχνευση των βακτηρίων *Chlamydia trachomatis*, *Ureoplasma*, *Mycoplasma hominis* και *Mycoplasma genitalium*, καθώς και του ιού του απλού έρπητα (HSV I/II), έτσι ώστε να προσδιοριστεί το ποσοστό της παρουσίας τους στο ενδομήτριο ασυμπτωματικών γυναικών με ιστορικό υπογονιμότητας.

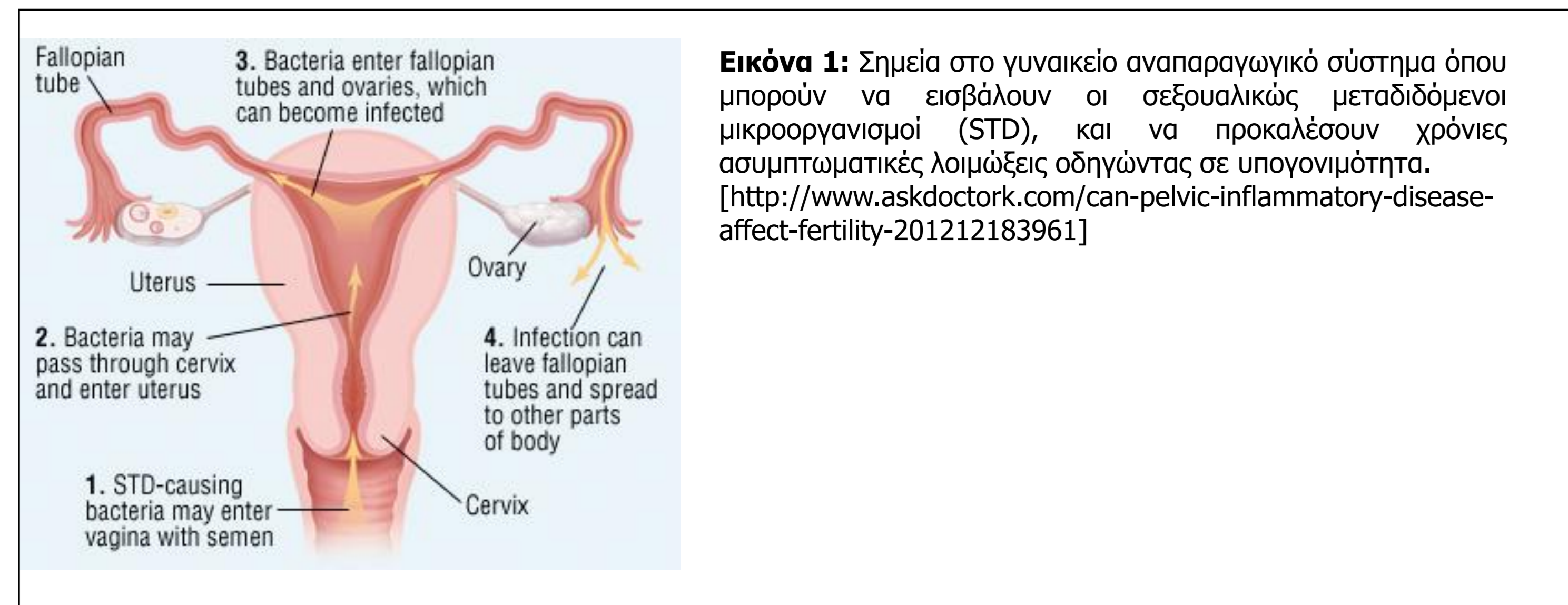
Υλικά/Μέθοδος: Σε 120 γυναίκες με μέσο όρο ηλικίας 37,9 (\pm 5,3), που αντιμετώπιζαν προβλήματα γονιμότητας, έγινε λήψη ιστού ενδομητρίου, το οποίο ελέγχθηκε για την ανίχνευση γενετικού υλικού των βακτηρίων *C. trachomatis*, *Ureoplasma*, *M. hominis*, *M. genitalium* και του ερπητοϊού HSV (I/II) χρησιμοποιώντας την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real time PCR).

Αποτελέσματα: Συνολικά, ανιχνεύθηκαν 3 δείγματα θετικά για το βακτήριο *C. trachomatis* (2.5%), 7 δείγματα θετικά για το βακτήριο *Ureoplasma* (5.8%), 1 δείγμα θετικό για το βακτήριο *M. hominis* (0.8%) ενώ κανένα δείγμα δε βρέθηκε θετικό για το βακτήριο *M. genitalium* και τον ερπητοϊό HSV I/II.

Συμπεράσματα: Ο απευθείας έλεγχος κυττάρων, προερχόμενων από το ενδομήτριο γυναικών με ιστορικό υπογονιμότητας, για την παρουσία σεξουαλικών μεταδιδόμενων μικροοργανισμών χρησιμοποιώντας μεθόδους υψηλής ευαισθησίας, αποτελεί ένα επιπλέον μέσο για τον καλύτερο εντοπισμό «σιωπηλών» μολύνσεων συμβάλλοντας στην επιτυχία ενός κύκλου εξωσωματικής γονιμοποίησης.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ/ΣΚΟΠΟΣ

Η αύξηση της εμφάνισης των σεξουαλικά μεταδιδόμενων μικροοργανισμών έχει συσχετιστεί από πολλές μελέτες, τόσο με την γυναικεία όσο και με την αντρική υπογονιμότητα. Μία χρόνια λοίμωξη του γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος από σεξουαλικά μεταδιδόμενους μικροοργανισμούς, που παραμένει αθεράπευτη, μπορεί να οδηγήσει σε φλεγμονή του ενδομητρίου, προκαλώντας έτσι σοβαρές επιπλοκές όπως αποβολή, φραγμό των σαλπίγγων και κατά συνέπεια υπογονιμότητα (**Εικόνα 1**). Για το λόγο αυτό κρίνεται ιδιαίτερα αναγκαία η έγκαιρη διάγνωσή τους. Σήμερα, η πιο διαδεδομένη μέθοδος ανίχνευσης μικροβίων είναι η καλλιέργεια του κολλοτραχηλικού υγρού. Τα μειονεκτήματα αυτής της μεθόδου είναι το μικρό ποσοστό ανιχνευσιμότητας και ευαισθησίας, καθώς και το μεγάλο χρονικό διάστημα που μεσολαβεί μέχρι το αποτέλεσμα. Επιπλέον, με τον τρόπο αυτό δεν μπορούμε να ανιχνεύσουμε μολύνσεις που έχουν επεκταθεί στο εσωτερικό το τραχήλου και στη μήτρα. Η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) αποτελεί μια τεχνική που χαρακτηρίζεται από υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα ενώ τα αποτελέσματα ανακτώνται σε σύντομο χρονικό διάστημα από τη στιγμή της δειγματοληψίας. Επομένως, στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η ανίχνευση των βακτηρίων *Chlamydia trachomatis*, *Ureoplasma*, *Mycoplasma hominis* και *Mycoplasma genitalium*, καθώς και του ιού του απλού έρπητα (HSV I/II), έτσι ώστε να προσδιοριστεί το ποσοστό της παρουσίας τους στο ενδομήτριο ασυμπτωματικών γυναικών με ιστορικό υπογονιμότητας.



Εικόνα 1: Σημεία στο γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα όπου μπορούν να εισβάλουν οι σεξουαλικά μεταδιδόμενοι μικροοργανισμοί (STD), και να προκαλέσουν χρόνιες ασυμπτωματικές λοιμώξεις οδηγώντας σε υπογονιμότητα. [http://www.askdoctork.com/can-pelvic-inflammatory-disease-affect-fertility-201212183961]

ΥΛΙΚΑ/ΜΕΘΟΔΟΣ

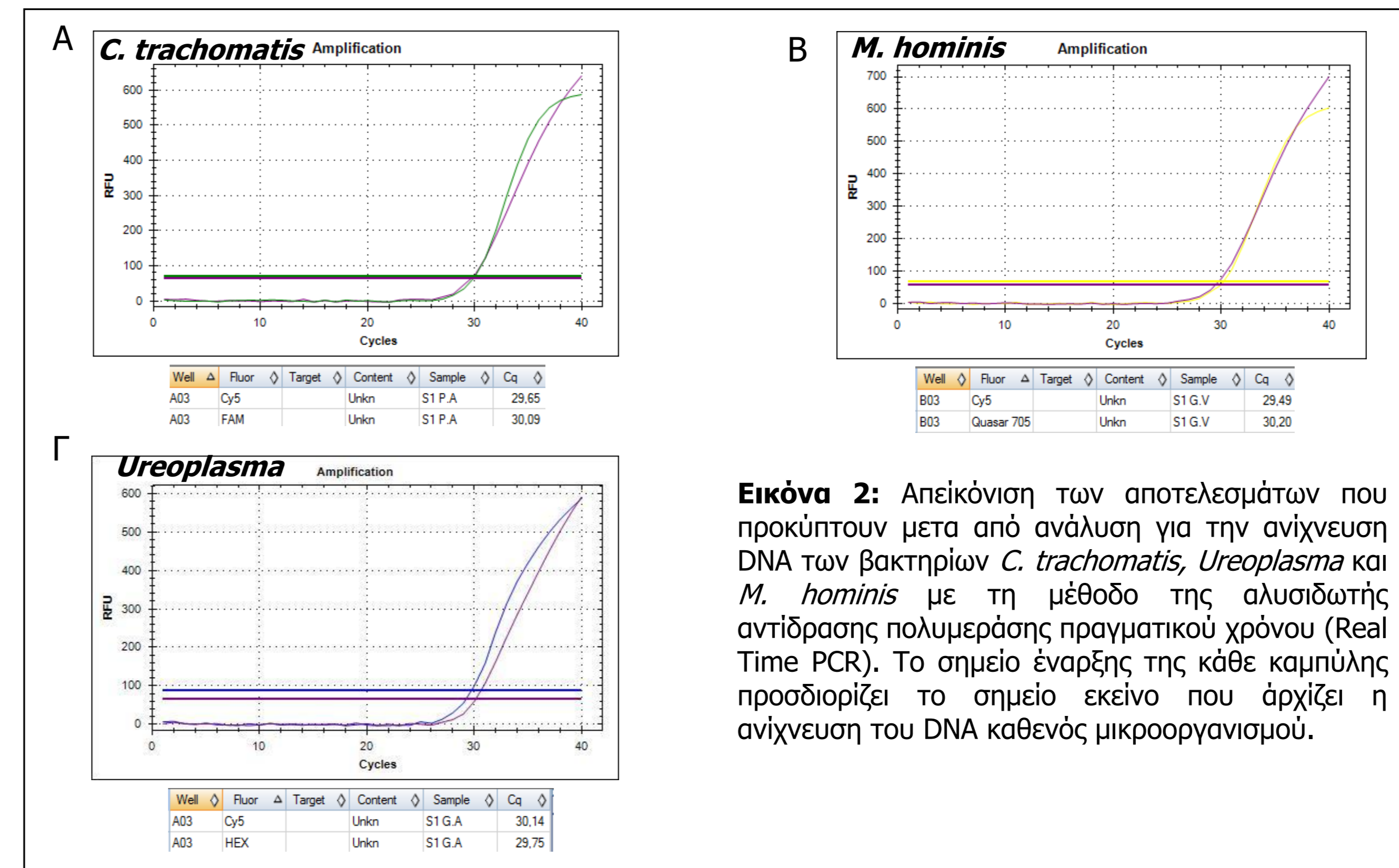
Σε 120 γυναίκες με μέσο όρο ηλικίας τα 37,9 (\pm 5,3) έτη, που αντιμετώπιζαν προβλήματα γονιμότητας, έγινε λήψη ιστού ενδομητρίου, το οποίο ελέγχθηκε για την ανίχνευση γενετικού υλικού των βακτηρίων *C. trachomatis*, *Ureoplasma*, *M. hominis*, *M. genitalium* και του ερπητοϊού HSV (I/II) με μοριακές μεθόδους. Η λήψη του ιστού ενδομητρίου έγινε με τη χρήση καθετήρα τύπου Pipelle, κάτω από αποστειρωμένες συνθήκες, σε οποιαδήποτε μέρα του γυναικείου κύκλου. Μετά τη λήψη το υλικό τοποθετήθηκε σε αποστειρωμένα φιαλίδια, που περιείχαν 2 mL ισοτονικού διαλύματος 1x PBS και διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία 4 °C μέχρι να χρησιμοποιηθούν. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε απομόνωση DNA σύμφωνα με τις οδηγίες του εμπορικού kit (DNA sorb-AM, AMPLICENS). Η ποιότητα και η ποσότητα του DNA αξιολογήθηκε με φασματοφωτομετρική ανάλυση. Για την ανίχνευση του γενετικού υλικού των βακτηρίων *C. trachomatis*, *Ureoplasma*, *M. hominis*, *M. genitalium* και του ερπητοϊού HSV (I/II) εφαρμόστηκε η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time PCR). Ταυτόχρονα, στην ίδια αντίδραση πολλαπλασιάστηκε γονίδιο-μάρτυρας ώστε να επιβεβαιωθεί η επιτυχία απομόνωσης γενετικού υλικού αλλά και η απουσία αναστολέων στην αντίδραση. Επιπλέον, πολλαπλασιάστηκε θετικός μάρτυρας, δηλαδή γενετικό υλικό του καθενός βακτηρίου, ώστε να επιβεβαιωθεί η παρουσία του βακτηρίου σε τυχόν θετικό αποτέλεσμα στο εξετασθέν δείγμα. Μετά το πέρας της Real Time RCR έγινε ανάλυση των αποτελεσμάτων. Ως θετικό αποτέλεσμα θεωρήθηκε οποιοδήποτε δείγμα είχε όριο ανίχνευσης Ct < 33 για το γονίδιο μάρτυρα και Ct > 10 για οποιοδήποτε από τα 4 βακτήρια και τον ιο HSV.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Συνολικά, σε 11/120 (10,9%) δείγματα βρέθηκαν να φέρουν κάποιο από τα 4 βακτήρια που ελέγχθηκαν ενώ σε κανένα δείγμα δε βρέθηκαν οι 2 τύποι του ερπητοϊού HSV I/II. Αναλυτικά, σε ποσοστό 2,5% ανιχνεύτηκε DNA του βακτηρίου *C. Trachomatis*, σε ποσοστό 5,8% ανιχνεύτηκε DNA του βακτηρίου *Ureoplasma*, σε ποσοστό 0,8% ανιχνεύτηκε DNA του βακτηρίου *M. hominis* ενώ σε κανένα δείγμα δεν ανιχνεύτηκε DNA του βακτηρίου *M. genitalium* (**Πίνακας 1**) (**Εικόνα 2**).

ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΠΕΡΙΣΤΑΤΙΚΩΝ	
	N	%
<i>C. Trachomatis</i>	3	2,5
<i>Ureoplasma</i>	7	5,8
<i>M. hominis</i>	1	0,8
<i>M. genitalium</i>	-	-
HSV I/II	-	-

Πίνακας 1: Συνοπτική παρουσίαση των αποτελεσμάτων μετά από έλεγχο 120 γυναικών με ιστορικό υπογονιμότητας. Συνολικά, ανιχνεύθηκαν 3 δείγματα θετικά για το βακτήριο *C. trachomatis* (2.5%), 7 δείγματα θετικά για το βακτήριο *Ureoplasma* (5.8%), 1 δείγμα θετικό για το βακτήριο *M. hominis* (0.8%) ενώ κανένα δείγμα δε βρέθηκε θετικό για το βακτήριο *M. genitalium* και τον ερπητοϊό HSV I/II.



Εικόνα 2:

Απείκνιση των αποτελεσμάτων που προκύπτουν μετά από ανάλυση για την ανίχνευση DNA των βακτηρίων *C. trachomatis*, *Ureoplasma* και *M. hominis* με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time PCR). Το σημείο έναρξης της κάθε καμπύλης προσδιορίζει το σημείο εκείνο που αρχίζει η ανίχνευση του DNA καθενός μικροοργανισμού.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η συσχέτιση της παρουσίας σεξουαλικά μεταδιδόμενων νοσημάτων με την υπογονιμότητα, έχει κάνει όλο και περισσότερο αναγκαία την εφαρμογή σύγχρονων μεθόδων, που θα επιτύχουν μια πιο στοχευμένη και ταχύτερη διάγνωση. Ο απευθείας έλεγχος κυττάρων προερχόμενων από το ενδομήτριο γυναικών με ιστορικό υπογονιμότητας, για την παρουσία μολυσματικών παραγόντων, αποτελεί ένα επιπλέον μέσο για τον καλύτερο εντοπισμό «σιωπηλών» μολύνσεων συμβάλλοντας στην επιτυχία ενός κύκλου εξωσωματικής γονιμοποίησης. Με αυτό τον τρόπο μπορούμε να αναγνωρίσουμε μολύνσεις που έχουν περάσει στη μήτρα, σημείο όπου θα εμφυτευθεί το έμβρυο, και να θεραπευτούν.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Dyer SJ. International estimates on infertility prevalence and treatment seeking: Potential need and demand for infertility medical care. *Hum Reprod* 2009
- Viniker DA. Hypothesis on the role of sub-clinical bacteria of the endometrium (bacteria endometrialis) in gynecological and obstetric enigmas. *Hum Reprod Update* 1999
- Zariffard MR, Saifuddiin M, Sha BE, Spear GT. Detection of bacterial vaginosis-related organisms by real-time PCR for Lactobacilli, Gardenella vaginalis and Mycoplasma hominis. *FEMS Immunol Clin Microb* 2002
- Coutlee F, Ladurantaye M, Tremblay C, Vincelette J, Labrecque L, Roger M. An important proportion of genital samples submitted for Chlamydia trachomatis detection by PCR contain small amounts of cellular DNA as measured by b-globin gene amplification. *J Clin Microbiol* 2000