

MAGDALENA FREJ-MĄDRZAK¹, IRENA CHOROSZY-KRÓL¹, DOROTA TERYKS-WOŁYNYEC²

Cytokiny zapalne i prozapalne w przewlekłych i nawracających zakażeniach wywołanych przez *Chlamydia trachomatis*

Inflammatory and Pro-inflammatory Cytokines During the Course of Prolonged and Recurrent *Chlamydia trachomatis* Infections

¹ Zakład Nauk Podstawowych AM we Wrocławiu

² Katedra i Zakład Mikrobiologii AM we Wrocławiu

Streszczenie

W artykule przedstawiono nowe opinie na temat wytwarzania cytokin pro- i antyzapalnych podczas przewlekłych i nawrotowych zakażeń *C. trachomatis*. Sekwencje aminokwasów w białkach szoku termicznego pozostały bardzo konserwatywne u wszystkich organizmów, od bakterii do ssaków, krzyżowa reakcja odpowiedzi immunologicznej między chlamydialnymi i ludzkimi homologami implikuje patologie zakażeń chlamydialnych. Równowaga między swoistymi cytokinami (IFN- γ , IL-10, IL-12, IL-18) może wpływać niszcząco na tkanki, powodując niedrożność jajowodów, TFI (*tubal factor infertility*), a to wiąże się z niepowodzeniem IVF (*in vitro fertilization*) i nawykową autoaborcją (Adv Clin Exp Med 2005, 14, 6, 1237–1242).

Słowa kluczowe: *Chlamydia trachomatis*, cHSP60, IFN- γ , IL-10.

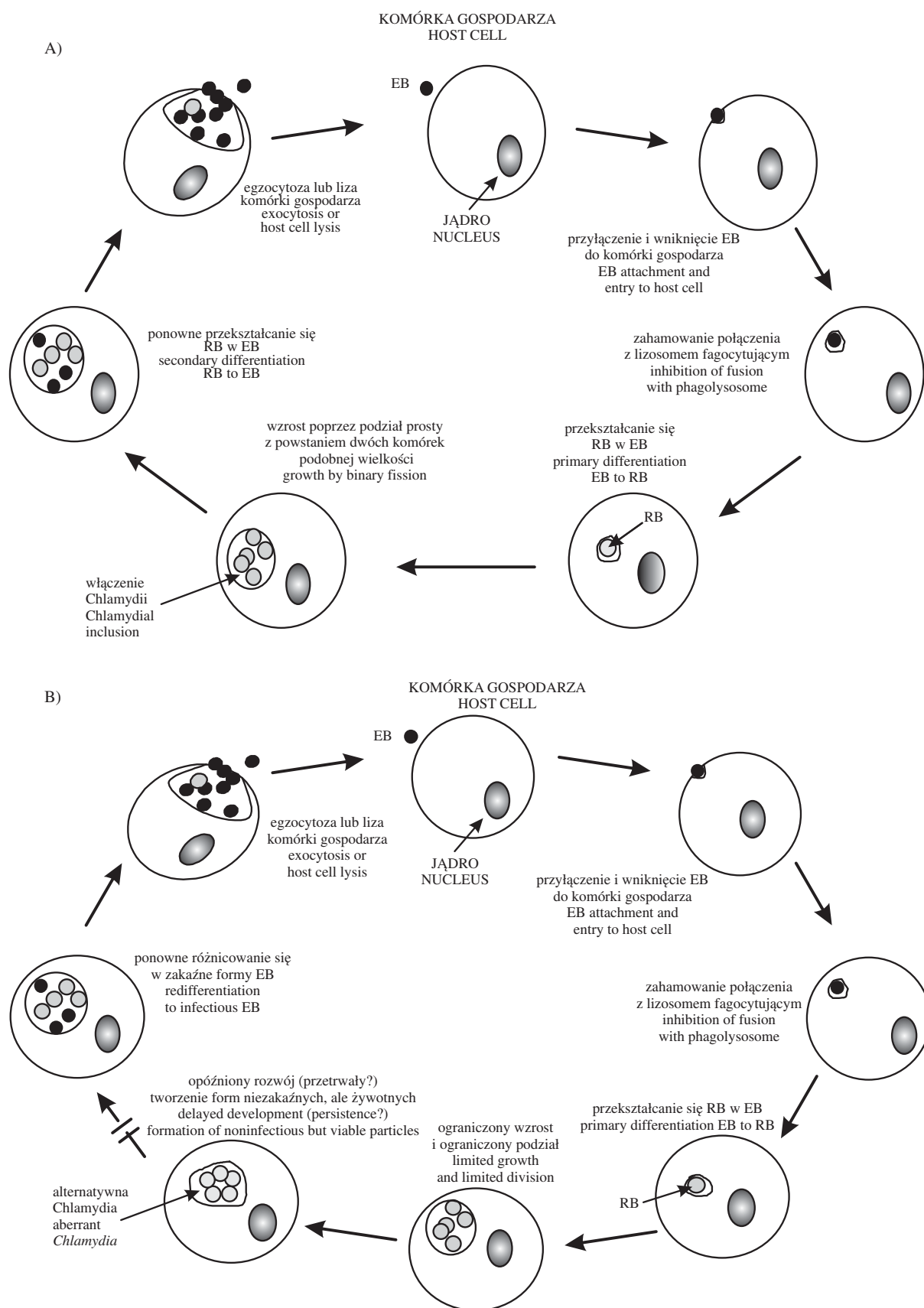
Abstract

In this article the new views on production of pro- and anti-inflammatory cytokines during the course of prolonged and repeated *C. trachomatis* infection are described. The amino acid sequences of HSP60 have been highly conserved in every organism, from bacteria to man and cross-reactive immune response between the chlamydial and human homologues has been implicated in chlamydial infection pathology. Specific cytokines (INF- γ , IL-10, IL-12 and IL-18) balance present at the site of inflammation may influence the tissue damage leading to tubal occlusion, TFI (tubal factor infertility), and is also associated with IVF (in vitro fertilization) failure and spontaneous abortion (Adv Clin Exp Med 2005, 14, 6, 1237–1242).

Key words: *Chlamydia trachomatis*, cHSP60, IFN- γ , IL-10.

Chlamydia trachomatis (*C. trachomatis*) jest coraz częściej diagnozowanym patogenem wywołującym liczne schorzenia układu moczowo-płciowego. Zakażenie tymi bakteriami może być zarówno głównym powodem wielu schorzeń, jak i towarzyszyć różnym zmianom, np. wadom rozwojowym układu moczowo-płciowego u dzieci. Dotychczas brano pod uwagę tylko kontakt płciowy jako drogę przenoszenia, liczba pacjentów jednak, u których taką możliwość wykluczono, świadczy o innych sposobach zakażenia. W literaturze są opisywane przypadki zakażeń *C. trachomatis* w wyniku kąpieli na krytych i otwartych ba-

senach, a także używania wspólnych ręczników lub bielizny z osobami już zakażonymi tym patogenem. *C. trachomatis*, serotypy od A do C, są główną przyczyną jaglicy, a serotypy od D do K (szczepu okulo-genitalne), w zależności od płci i od wieku mogą być powodem wielu różnych schorzeń. U mężczyzn *C. trachomatis* wywołuje zapalenie cewki moczowej, gruczołu krokowego, najądrzy i odbytnicy. Może także prowadzić do reaktywnego zapalenia stawów lub niepełnego zespołu Reitera, czyli jednoczesnego zapalenia spojówek, cewki moczowej i reaktywnego zapalenia stawów. U kobiet *C. trachomatis* wywołuje zapa-



Ryc 1. A – Cykl rozwojowy Chlamydii, B – alternatywny cykl rozwojowy (wg Beatty et al. 1994a)

Fig 1. A – Chlamydial developmental cycle, B – altered Chlamydial development cycle (acc. Beatty et al. 1994a)

lenie cewki moczowej, szyjki macicy, jajowodów i narządów miednicy małej (PID – *pelvic inflammatory disease*). Przewlekłe lub nawracające zakażenia mogą spowodować bezpłodność na skutek niedrożności jajowodów, a u ciężarnych kobiet mogą też doprowadzić do poronień lub porodów przedwczesnych [1]. U dzieci chlamydie są główną przyczyną zakażeń okołoporodowych i wywołują zapalenie spojówek, gardła, płuc, pochwy, wsierdza, mięśnia sercowego, ucha środkowego oraz żołądka i jelit.

C. trachomatis to drobnoustroj mający zarówno cechy upodabniające go do bakterii Gram-ujemnych, jak i do wirusów. Najważniejsze cechy bakteryjne to: ściana komórkowa podobna do bakterii Gram-ujemnych, obecność DNA i RNA w komórce i podobna wrażliwość na niektóre antybiotyki. Wirusowe cechy to: mniejszy rozmiar niż u większości bakterii oraz brak mechanizmów pozwalających na wytwarzanie własnego ATP (adenozynotrójfosforanu). *Chlamydia trachomatis* charakteryzuje się swoistym cyklem rozwojowym, co pozwala jej korzystać z ATP gospodarza. Bakterie te występują w postaci ciała elementarnego (EB – *elementary body*), który jest formą zakaźną, nieczynną metabolicznie oraz ciała siateczkowatego (retikularnego) (RB – *reticulate body*), który jest formą metabolicznie aktywną, lecz niezakaźną.

Cykl rozwojowy chlamydii przebiega dwufazowo (ryc. 1). W pierwszej fazie EB przyczepia się do komórki gospodarza i wnika do wnętrza za pomocą endocytozy. Pozostaje tam w fagosomie, otoczone błoną plazmatyczną. Forma zakaźna EB przechodzi w formę metabolicznie aktywną RB, która dzieli się przez podział. Po 36 godz. cyklu rozwojowego RB ulegają reorganizacji i przekształcają się w formy nieczynne metabolicznie (EB), które w czasie 48–72 godz. zostają uwolnione na zewnątrz komórki. Odbywa się to za pomocą cytolizy lub endocytozy w wyniku uszkodzenia komórki gospodarza. Coraz częściej jednak spotyka się *C. trachomatis* występujące w formie przetrwałej (chronicznej), która powstaje podczas cyklu rozwojowego pod wpływem różnych, zewnętrznych czynników. Formy replikacyjne RB, będące w fagosomie, po podziałach przechodzą w formy przetrwałe. Ta aberracja podczas cyklu rozwojowego skutkuje powstaniem form nieinfekcyjnych, ale zdolnych do życia [2]. Formy te mogą być przyczyną przewlekłych lub nawracających zakażeń.

Wśród tych czynników wpływ taki może mieć np. interferon- γ (IFN- γ) i prozapalne cytokiny, które są wytwarzane pod wpływem aktywacji systemu immunologicznego gospodarza przez chlamydialne ciała elementarne (EB). Komórki fago-

cytarne gospodarza ograniczają rozprzestrzenianie się zakażenia. Działanie IFN- γ na EB *C. trachomatis* doprowadza do przewlekłych zakażeń chlamydialnych. IFN- γ blokuje replikację ciałek siateczkowatych (duże, zniekształcone formy takich chlamydii można zaobserwować w komórkach z IFN- γ w warunkach *in vitro*). Takie formy replikacyjne RB są jednak zdolne do życia, a zmniejszenie wytwarzania IFN- γ , wynikające ze zmniejszającej się liczby drobnoustrojów, może przywrócić zdolności podziału tym formom ciałek chlamydialnych. Podobne działanie może mieć także stosowanie nieskutecznej terapii antybiotykowej [3].

U kobiet przewlekłe zakażenie *C. trachomatis* może doprowadzić do niedrożności jajowodów i bezpłodności, co podkreślono w opisie cyklu rozwojowego. Długie utrzymywanie się chronicznych zakażeń prowadzi do wytwarzania chlamydialnego białka szoku termicznego (cHSP60 – *chlamydial heat shock protein 60 kDa*), które utrzymuje się na wysokim poziomie i jest głównym celem odpowiedzi immunologicznej [4]. W tym samym czasie są wytwarzane przez komórki gospodarza ludzkie białka szoku termicznego (hHSP60 – *human heat shock protein 60 kDa*), które w około 50% mają homologiczną sekwencję aminokwasów z cHSP60. Sekwencje aminokwasów w białkach szoku termicznego pozostały bardzo konserwatywne i podczas ewolucji od bakterii do ssaków niewiele się zmieniły. Krzyżowa reakcja odpowiedzi immunologicznej między chlamydialnymi i ludzkimi homologami implikuje patologie zakażeń chlamydialnych [5]. Skutkiem chlamydialnego zakażenia, między innymi jajowodów, może być wywołanie odpowiedzi immunologicznej i wytwarzanie autoprzeciwciał skierowanych przeciwko własnym, ludzkim białkom hHSP60. Ludzkie białka szoku termicznego 60 kDa są jako jedne z pierwszych wytwarzane po zapłodnieniu, a także później ulegają ekspresji w komórkach nabłonkowych błony doczesnej. Wzmoczone wytwarzanie hHSP60 w pierwszych dniach ciąży może reaktywować limfocyty wrażliwe na cHSP60, dlatego może dochodzić do immunologicznego odrzucenia (poronienia) embrionu na etapie wczesnej ciąży [6]. Sugeruje się, że działa tu następujący mechanizm: w pierwszym etapie, podczas utrzymujących się zakażeń, oba wytwarzane HSP60, pochodzenia chlamydialnego i ludzkiego, uwrażliwiają system immunologiczny gospodarza – kobiety. hHSP60 jest fizjologicznie wytwarzane przed i podczas implantacji zarówno przez embrion, jak i błonę doczesną matki. Kolejnym etapem jest aktywacja limfocytów przez wzmoczoną ekspresję ludzkiego HSP60, które poprzednio były uwrażliwione przez chlamydialne HSP60. Ak-

tywowane limfocyty uwalniają prozapalne cytokiny, które indukują inne komórki limfoidalne do uwalniania mediatorów cytotoksycznych i zapalnych. Mechanizm ten powoduje, że aktywowany, humoralny i komórkowy system immunologiczny zakłóca mechanizm działania regulatorów niezbędnych do implantacji i utrzymania zarodka. Przeciwciała skierowane przeciwko HSP60 blokują rozwój embrionu, który niewystarczająco chroniony przed działaniem czynników środowiskowych jest bardziej narażony na zwyrodnienia i odrzucenie – autoaborcję [7].

Około 25% kobiet z PID zostaje bezpłodnych w wyniku niedrożności jajowodów [8]. Można więc powiedzieć, że PID jest jedną z głównych przyczyn niepłodności jajowodowej (TFI – *tubal factor infertility*). TFI ma ścisły związek z nawrotowymi i przewlekłymi zakażeniami *C. trachomatis*, które z kolei mogą wywołać chroniczne zapalenie jajowodów. Podczas takich zakażeń odpowiedź zapalna jest kierowana i podtrzymywana przez limfocyty mononuklearne (jednojądrzaste). Prognozowanie zapłodnienia *in vitro* (IVF – *in vitro fertilization*) w przypadku pacjentek z TFI jest trudniejsze niż w grupie kobiet, u których bezpłodność została wywołana innymi czynnikami. Na skuteczność właściwej chemioterapii przeciwbakteryjnej i pomyślnej eradykacji zakażenia *C. trachomatis* ma wpływ mechanizm immunologiczny pośredniczących limfocytów T i wydzielanie IFN- γ . Istnieje korelacja między podniesionym poziomem przeciwciał anti-cHSP60 a chronicznymi zakażeniami chlamydialnymi, PID i TFI. Prolifercja limfocytów w odpowiedzi immunologicznej na cHSP60 występuje dużo częściej u pacjentek z PID niż u kobiet zdrowych z grupy kontrolnej. Zwierzęce modele zakażeń chlamydialnych pokazały, że CD4⁺ limfocytów T mają kluczowe znaczenie w kierowaniu odpowiedzią immunologiczną i ochronie przed tymi zakażeniami. Są także implikowane w patogenezie następstw choroby. Wywoływanie patologicznych zmian w tkance jajowodów jest najmniej znanym procesem, ale sądzi się, że przyczyną są stany nawracających i przewlekłych zakażeń [9]. Eksperymentalne modele zwierzęce zakażeń u małp zasugerowały swoistą rolę cHSP60 w patogenezie zapalenia jajowodów [8, 10]. cHSP60 wszczepione podskórnio małpom, które zostały „uważliwe” na *C. trachomatis*, wywoływało intensywną odpowiedź zapalną, podobną do tej, która występuje u kobiet z chlamydialnym zapaleniem jajowodów. Ostatnio wykazano, że znaczący odsetek komórek T-swoistych wobec *C. trachomatis*, obecnych w jajowodach kobiet z TFI, docelowo jest ukierunkowany na cHSP60 jako antygen. IFN- γ , który należy do cytokin prozapalnych, może modulować odpow-

wieź immunologiczną skierowaną na cHSP60. Zwiększenie ekspresji cHSP60 przy niskim poziomie IFN- γ , obserwowany *in vitro*, oraz intensywna odpowiedź immunologiczna na cHSP60 podczas przetrwałych zakażeń *C. trachomatis* pozwalają przypuszczać, że podobne reakcje zachodzą *in vivo* i odgrywają istotną rolę. Inną sytuację zaobserwowano jednak na zwierzęcych modelach chronicznych zakażeń u myszy. W tym przypadku nastąpiła zmiana z dominującej odpowiedzi IFN- γ , jak np.: u małp, na dominującą rolę odpowiedzi interleukiny 10 (IL-10). cHSP60 może aktywować zapalną odpowiedź przez makrofagi. Wykazano, że cHSP60 wywołuje odpowiedź ludzkich limfocytów zarówno Th1, jak i Th2 [11], sugerując, że cHSP60 ma zdolność wpływania na odpowiedź immunologiczną przez stymulowanie wytwarzania IL-10 lub innych antyzapalnych cytokin podczas przewlekłych zakażeń *C. trachomatis*. Aby ocenić rolę cHSP60 w odpowiedzi immunologicznej w TFI, mierzono także poziom proliferacji i wydzielania IFN- γ , IL-10 i IL-12 (interleukina 12) mononuklearnych limfocytów, porównując wpływ cHSP60 i antygenu EB *C. trachomatis* u dwóch grup kobiet. Pierwsza z nich to kobiety z TFI, a druga grupa to kobiety z niepłodnością wywołaną innymi czynnikami [8]. Badania te wstępnie wykazały, że stymulacja komórek PBMCs (*peripheral blood mononuclear cells*) za pomocą cHSP60 wywołuje wytwarzanie IL-10 i odpowiedź swoistą, a stymulacja z udziałem EB wzmacnia odpowiedź prozapalną. Te dane sugerują, że cHSP60 może odgrywać rolę głównego regulatora odpowiedzi immunologicznej podczas chronicznych zakażeń *C. trachomatis*. Równowaga między swoistymi cytokinami w stanie zapalnym, a zwłaszcza prozapalnego IFN- γ i antyzapalnej IL-10, może wpływać niszcząco na tkanki, powodując bliznowacenie, co z kolei skutkuje TFI, a to może mieć wpływ na niepowodzenie IVF [12].

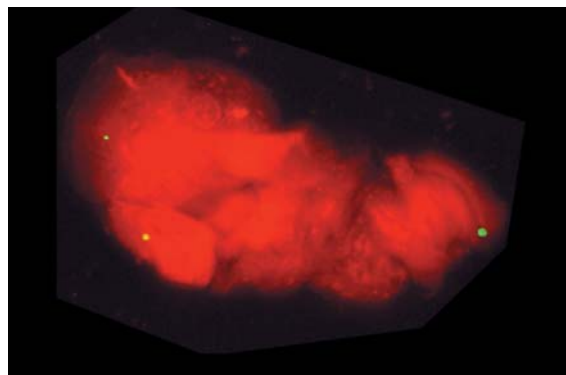
Wraz z IL-12 duży wpływ na wydzielanie INF- γ CD4 komórek T ma IL-18, a wydzielanie, przez komórki Th1, INF- γ jest szczególnie ważne w obronie immunologicznej skierowanej przeciwko wewnątrzkomórkowym patogenom, jakimi są Chlamydie. Badanie wydzielania IL-18 w liniach ludzkich komórek nabłonkowych potwierdziło, że komórki ukonstytuowane do ekspresji pro-IL-18 pod wpływem zakażenia *C. trachomatis* wydzielają dojrzałe formy IL-18. Obserwowano takie zjawisko dla kilku różnych serowarów i biowarów *C. trachomatis*. Indukowane przez Chlamydie wydzielanie IL-18 jest regulowane jej poziomem po transkrypcji i zależy od aktywacji kaspazy 1, enzymu proteolitycznego, kontrolującego apoptozę. Aktywacja kaspazy 1 i zwiększenie wydzielania dojrzałych form IL-18 koreluje z syntezą chlamydial-

nych białek, nie ma jednak związku z syntezą białek gospodarza. Dla porównania, zjawisko chlamydialnej indukcji wydzielania dojrzałych form IL-18 nie występuje w fibroblastach, które wytwarzają pro-IL-18, pomimo aktywacji kaspazy 1 [13]. Wpływ czynników chlamydialnych na aktywację kaspazy 1 i wydzielanie dojrzałych form IL-18 w zakażonych komórkach nabłonkowych w patogenie nawrotowych i przewlekłych zakażeń wymaga jeszcze wyjaśnienia. Na temat wpływu *C. trachomatis* na bezpłodność u mężczyzn również należy jeszcze przeprowadzić badania.

Ponieważ większość zakażeń chlamydialnych przebiega objawowo lub skąpoobjawowo, dlatego też jedynie badania przesiewowe przeprowadzone u kobiet w wieku rozrodczym mogą być pomocne w ujawnieniu zakażeń bezobjawowych. Odpowiednie leczenie pierwotnych i nawracających zakażeń może zapobiec rozwojowi autoodpowiedzi immunologicznej, stanów zapalnych i niedrożności jajowodów, co może uchronić kobiety np. przed ciążą ektopową.

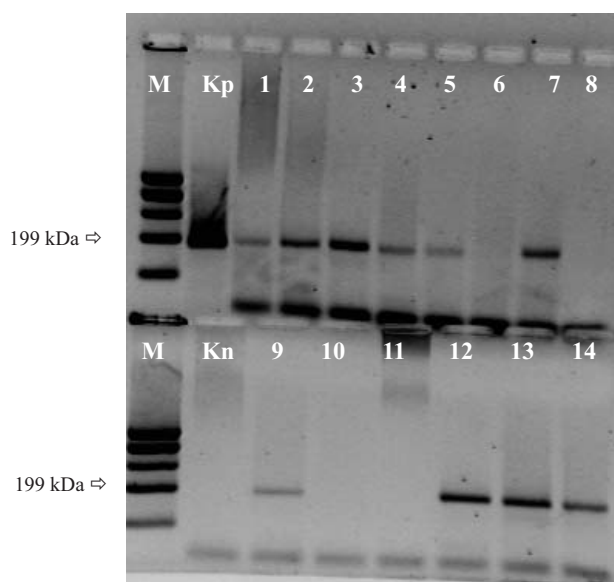
C. trachomatis ma antygeny grupowo i gatunkowo swoiste, które mogą posłużyć do jej identyfikacji. Antygen grupowo swoisty stanowi kompleks lipopolisacharydowy (LPS). Antygen gatunkowo swoisty jest głównym białkiem błony zewnętrznej (MOMP) wykrywanym testem mikroimmunofluorescencji (MIF). Testy immunofluorescencji bezpośredniej (DIF – *direct immunofluorescence*) opierają się na wykrywaniu fluoryzujących ciałek elementarnych w bezpośrednich rozmazach materiałów od chorych [14]. Na preparat nakłada się koniugat z przeciwciałami anti-*C. trachomatis* znakowanymi izotiocyanianem fluoresceiny (ITCF). U *C. trachomatis* można wyróżnić 18 serologicznych typów. Serowary te oznaczają się A, B, Ba, C, D, Da, E, F, G, H, I, Ia, J, K, L1, L2, L2a i L3. Przeciwciała w koniugacie reagują z głównymi zewnętrznymi białkami błonowymi, ciałek elementarnych i siateczkowatych, wykrywając wszystkie 18 serowarów. Według zaleceń producentów testu, liczbę ≥ 10 ciałek elementarnych, mających jasnozielony kolor na tle ciemnoczerwonych komórek nabłonkowych, uznaje się jako wynik dodatni (ryc. 2). Druga metoda to testy immunofluorescencji pośredniej (IIF – *indirect immunofluorescence*), w której materiałem od pacjenta zakaża się hodowle komórkowe, a następnie robi się preparat i barwi się tak, jak w wyżej opisanej metodzie DIF. Ostatnio w badaniach diagnostycznych wykorzystuje się antygen, który jest chlamydialnym białkiem szoku termicznego o masie 60 kDa (cHSP60).

Diagnostyczne badania w kierunku *C. trachomatis* obejmują różne metody, które zostały opracowane dla konkretnych antygenów tego patoge-



Ryc. 2. Test immunofluorescencji bezpośredniej – EB *C. trachomatis*

Fig. 2. Direct immunofluorescence test – EB *C. trachomatis*



Ryc 3. Detekcja produktów PCR, fragmentów genu *crp* DNA *C. trachomatis* w żelu agarozowym, produkt PCR IN 199 kDa. M – marker, Kp – kontrola pozytywna, Kn – kontrola negatywna, 1–14 – próby badane

Fig. 3. PCR analysis of the fragment of the gene *crp* DNA *C. trachomatis* in agarose gel, product PCR IN 199 kDa. M – marker, Kp – positive sample, Kn – negative sample, 1–14 – tested samples

nu. Zestawy diagnostyczne PCR do wykrywania DNA *C. trachomatis* mogą opierać się na wykrywaniu różnych fragmentów genów. Amplifikacji poddaje się np. fragment genu *crp* (*cystein rich protein*) *C. trachomatis* w układzie *nested-PCR* [15]. Metoda *nested-PCR* opiera się na dwóch zestawach primerów i reakcjach, PCR OUT i PCR IN. W PCR OUT powstaje produkt o wielkości 318 kDa i stanowi matrycę do drugiej reakcji PCR IN, w wyniku której powstaje produkt 199 kDa. Rezultaty reakcji uwidacznia się przez rozdział elektroforetyczny na żelu agarozowym z bromkiem etydydny w obecności markera (ryc. 3). DNA *C. tra-*

chomatis można uzyskiwać z moczu, świeżych tkanek i wymazów.

Toczy się obecnie dyskusja nad tym, czy leczyć antybiotykami pacjentki, które są bezpłodne, a przebyły zakażenie *C. trachomatis*, czy tylko te, u których stwierdzi się występowanie form przetrwałych. U tej ostatniej grupy kobiet sugeruje się wykonywanie badań na obecność przeciwciał klasy IgA w wydzielinie z układu rozrodczego, która

może być najlepszym materiałem do badań, wykazującym obecność tego patogenu w drogach płciowych. Jako badanie wspomagające, potwierdzające występowanie form przetrwałych, proponuje się stwierdzenie obecności przeciwciał klasy IgG skierowanych przeciwko cHSP60 [16]. Bada się również immunogenetyczną korelację między zakażeniami *C. trachomatis* a TFI [17].

Piśmiennictwo

- [1] Choroszy-Król I, Ruczkowska J: Laboratoryjna diagnostyka chlamydioz. AM we Wrocławiu, Wrocław 2002
- [2] Beatty WL, Byrne GI, Morrison RP: Repeated and persistent infection with Chlamydia and the development of chronic inflammation and disease. Trends Microbiol 1994a, 2, 94–98.
- [3] Beatty WL, Morrison RP, Byrne GI: Immunoelectronmicroscopic quantitation of differential levels of chlamydial proteins in a cell culture model of persistent *Chlamydia trachomatis* infection. Infect Immun 1994b, 62, 4059–4062.
- [4] Yuan Y, Lyng K, Zhang YX, Rockey DD, Morrison RP: Monoclonal antibodies define genus – specific, species – specific, and cross – reactive epitopes of the chlamydial 660 – kilodalton heat shock protein (HSP60): specific immunodetection and purification of chlamydial HSP60. Infect Immun 1992, 60, 2288–2296.
- [5] Sziller I, Witkin SS, Ziegert M, Csapó Z, Ujházy A, Papp Z: Serological responses of patients with ectopic pregnancy to epitopes of the *Chlamydia trachomatis* 60 kDa heat shock protein. Hum Reprod 1998, 13, 1088–1093.
- [6] Witkin SS: Immunity to shock proteins and pregnancy outcome. Infect Dis Obstet Gynecol 1999, 7, 35–38.
- [7] Neuer A, Spandorfer SD, Giraldo P, Dieterle S, Rosenwaks Z, Witkin SS: The role of heat shock proteins in reproduction. Hum Reprod 2000, 6, 149–159.
- [8] Kinnunen A, Surcel HM, Halttunen M, Tiffinen A, Morrison RR, Morrison SG, Koskela P, Lehtinen M, Paavonen J: *Chlamydia trachomatis* heat shock protein-60 induced interferon- γ and interleukin-10 production in infertile woman. Clin Exp Immunol 2003, 131, 299–303.
- [9] Kinnunen A: Chlamydial heat shock protein 60 and cell-mediated immunity in tubal factor infertility. Oulu, Finland 2002.
- [10] Lichtenwalner AB, Patton DL, Van Voorhis WC, Cosgrove YT, Sweeney YT, Kuo CC: Heat shock protein 60 is the major antigen which stimulates delayed – type hypersensitivity reaction in the macaque model of *Chlamydia trachomatis* salpingitis. Infect Immun 2004, 1159–1161.
- [11] Choroszy-Król I: Odpowiedź immunologiczna na chlamydialne białko HSP60. Pro scientia caritas. Centaur Lubuski 1998, 36, 8–10.
- [12] Idahl A, Boman J, Kumlin U, Olofsson JI: Demonstration of *Chlamydia trachomatis* IgG antibodies in the male partner of the infertile couple is correlated with a reduced likelihood of achieving pregnancy. Hum Reprod 2004, 19, 1121–1126.
- [13] Hang L, Caixia S, Brunham RC: *Chlamydia trachomatis* infection of epithelial cells induces the activation of caspase-1 and release of mature IL-18. J Immunol, 2000, 165, 1463–1469.
- [14] MicroTrack® *Chlamydia trachomatis* Direct Specimen Test, Trinity Biotech plc.Ireland.
- [15] DNA Gdańsk, Zestaw do PCR dla *Chlamydia trachomatis* PK15.
- [16] Witkin SS, Linhares JM: *Chlamydia trachomatis* in subfertile woman undergoing uterine instrumentation an alternative to direct microbial testing or prophylactic antibiotic treatment. Hum Reprod 2002, 17, 1938–1941.
- [17] Cohen CR, Gichui J, Rukaria R, Sinei SS, Gaur LK, Brunham RC: Immunogenetic correlates for *C. trachomatis* – associated tubal infertility. Obstet Gynecol 2003, 101, 438–444.

Adres do korespondencji:

Magdalena Frej-Mądrzak
Zakład Nauk Podstawowych AM
ul. Chałubińskiego 4
50-368 Wrocław

Praca wpłynęła do Redakcji: 31.01.2005 r.

Po recenzji: 24.02.2005 r.

Zaakceptowano do druku: 28.02.2005 r.

Received: 31.01.2005

Revised: 24.02.2005

Accepted: 28.02.2005