

Universitatea de Medicină și Farmacie din Craiova
Școala Doctorală

TEZĂ DE DOCTORAT

**INFECȚII CU TRANSMITERE SEXUALĂ DETERMINATE DE
CHLAMYDIA, UREAPLASMA, MYCOPLASMA
– IMPLICAȚII ÎN NAȘTEREA PREMATURĂ**

-REZUMAT-

**Conducător științific,
Prof. Univ. Dr. Nicolae Cernea**

**Student doctorand,
Tiberiu Dăianu**

**CRAIOVA
2012**

CUPRINS

Introducere	3
-------------------	---

PARTEA SPECIALĂ - CONTRIBUȚII PROPRII

Obiective.....	4
Material și metode.....	5
Rezultate și discuții.....	8
Infecția vaginală determinată de Chlamydia, Mycoplasma și Ureaplasma cu implicare în nașterea prematură.....	9
Valoarea interleukinei 6 în nașterea prematură	11
Concluzii.....	13
Bibliografie selectivă.....	17

Cuvinte cheie: naștere prematură, infecție vaginală, interleukina 6, fibronectina fetală, lungimea canalului cervical

REZUMAT

INTRODUCERE

Nașterea prematură, definită de OMS în anul 1961 ca fiind nașterea sub 37 de săptămâni de vârstă gestațională, afectează 7-13% din sarcini, fapt care a condus la încercarea de a elabora programe de prevenție cât mai eficiente (1, 2).

Nașterea prematură (NP) este una din marile probleme aduse în obstetrică și în medicina modernă, prin impactul deosebit asupra mortalității și morbidității neonatale, prin complicațiile pe care le dezvoltă copiii născuți fără malformații congenitale, cât și prin consecințele pe termen lung asupra sănătății populației.

Complicațiile pe termen scurt includ: sindromul de detresă respiratorie, displazia bronhopulmonară, sindromul de răspuns inflamator fetal, hemoragia intraventriculară, retinopatia prematurității, anemia precoce a prematurului, deficitul neuro-psihiatric, enterocolita necrotizantă și alte disfuncții organice. Complicațiile pe termen lung includ: paralizia cerebrală și deficitul cognitive și comportamentale (3).

Modificarea florei vaginale normale cu microorganisme proinflamatorii duce la inițierea unei cascade de evenimente cu riscul de declanșare prematură a nașterii. Mycoplasmele genitale sunt suspectate pentru dezvoltarea acestei condiții patologice (4).

Infecția vaginală este singurul proces patologic demonstrat a fi corelat direct cu nașterea prematură (5). Infecția ascendentă a tractului genital are un impact major atât asupra prematurității la naștere cât și asupra complicațiilor neonatale.

Se stimulează astfel producerea unor mediatori ai inflamației precum interleukina 6 (IL-6), modulator major al răspunsului gazdei față de infecție și/sau agresiune tisulară (5).

Chiar polimorfismul funcțional al genei interleukinei-6 este factor de risc pentru paralizia cerebrală (6).

Inflamația în teritoriul fetal se află în legătură cu debutul travaliului la pacientele cu infecție intrauterină ascendentă, în special cu Chlamydia trachomatis (Chl), Ureaplasma spp. sau Mycoplasma hominis (My/Uu) (7).

OBIECTIVE

Lucrarea de față își propune elaborarea unui protocol care să faciliteze atât urmărirea cât și atitudinea terapeutică a gravidei, coroborând elementele etiopatogenice cu noile metode de prevenție și predicție a nașterii premature.

Totodată, studiul își propune reorientarea atitudinii medicilor spre prevenția nașterii premature, urmărind scăderea incidenței, creșterea eficienței metodelor terapeutice, scăderea ratei complicațiilor imediate și tardive prin monitorizarea corectă a gravidelor care prezintă risc de naștere prematură.

Obiectivul studiului îl constituie relația dintre modificarea florei vaginale prin prezența anumitor agenți patogeni precum mycoplasmele genitale și Chlamydiei și riscul de naștere prematură.

Determinarea concentrației interleukinei 6 din lichidul cervico-vaginal (IL-6_{CV}) la gravidele cu risc de naștere prematură (NP) comparativ cu sarcina normală, constituie un alt obiectiv al acestui studiu.

Am verificat dacă interleukina-6, componentă a răspunsului imun, este utilă singură sau într-o combinație de alte testări efectuate (ecografie transvaginală sau testul fibronectinei fetale din lichidul cervico-vaginal), în predicția nașterii înainte de 37 de săptămâni de gestație.

Originalitatea studiului a constat în determinarea IL-6 în lichidul cervico-vaginal la 24 de ore de la recoltare, metodă care nu a mai fost regăsită în nici un studiu publicat până acum în literatura de specialitate.

Noutatea lucrării a constat în studierea celor mai importante microorganisme care pot fi implicate în nașterea prematură și corelarea cu creșterea IL-6_{CV}, aspect care nu l-am regăsit în literatura de specialitate.

A fost realizat astfel un protocol de studiu longitudinal prospectiv de urmărire a gravidelor în care s-au urmărit:

- Incidența infecțiilor tractului genital cu *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma* spp. și *Chlamydia trachomatis* în săptămânile 22-34 de sarcină;
- Asocierea acestor infecții atât cu creșterea nivelului IL-6 în lichidul cervico-vaginal cât și cu nașterea prematură;
- Coroborarea rezultatelor obținute cu etiologia și cu alte infecții depistate;
- Identificarea unor agenți patogeni precum *Chlamydia trachomatis*, la femeile de vârstă tânără infertile, dar și la cele fertilizate (lot de paciente supuse fertilizării „in vitro”) și urmărirea celor

însărcinate prin includerea lor în grupul de femei compliante la protocolul diagnostic și terapeutic adresat prevenției nașterii premature;

- Predicția nașterii premature sub forma unui protocol prin determinarea sensibilității, specificității și valorilor predictive a factorilor de risc prezenți în cadrul gravidelor selectate;
- Aplicarea unor măsuri terapeutice în urmărirea reducerii riscului nașterii premature prin tratamentul infecțiilor genitale, repaus fizic, tratament progestativ, cerclaj al colului

MATERIAL ȘI METODE

Studiul clinic observațional a fost efectuat pe un grup de 262 femei de vârstă fertilă, evaluate prospectiv pentru infertilitate sau pentru riscul de naștere prematură în perioada 17.11.2009 – 30.07.2012. Pacientele cu antecedente de naștere prematură și/sau modificări de naștere prematură decelate ecografic, au fost urmărite în secțiile de Obstetrică-Ginecologie ale Spitalului Clinic Județean de Urgență și ale Spitalului Clinic Municipal Filantropia din Craiova precum și în unele clinici particulare de ginecologie.

Lotul de gravide a fost strict selectat după următoarele criterii:

- Sarcina monofetală;
- Vârsta gestațională certificată prin evaluare ecografică în primele 16 săptămâni cu măsurarea LCC în săptămâna 7-13 și/sau a DBP și lungimii femurului între săptămânile 13-16;
- Absența anomaliilor morfologice fetale sau ale organelor genitale materne;
- Consimțământul informat privind participarea la studiu.

Criterii de excludere:

- Sarcini multiple sau cu feți anormali;
- Întreruperea gestației înaintea vârstei de 24 săptămâni din considerente care exclud patologia infecțioasă;
- Efectuarea amniocentezei genetice;
- Cerclaj cervical profilactic efectuat înainte de 14 săptămâni;
- Naștere prematură electivă datorită unor indicații medicale sau complicații obstetricale de altă cauză decât cea infecțioasă.

Lotul de femei a fost împărțit în mai multe grupuri:

- un grup de control (lotul martor) care a cuprins gravide urmărite și investigate pe parcursul sarcinii, dar la care nu s-au decelat factori semnificativi de risc pentru nașterea prematură;

- un grup de femei care timp de peste 1,5 ani nu au rămas însărcinate fără să utilizeze mijloace de contracepție și care au apelat la o clinică de ginecologie în vederea fertilizării „in vitro”;
- un grup de gravide cu risc de naștere prematură împărțit în două subgrupuri:
 - femei compliante la protocolul diagnostic și terapeutic adresat prevenției nașterii premature,
 - gravide care nu se prezintă la controalele ulterioare, dar a căror naștere se produce în secțiile de Obstetrică – Ginecologie ale spitalelor din Craiova.

Din totalul de 262 de femei, s-au luat în studiu: un grup de 106 gravide cu vârsta gestațională între 22-34 săptămâni, pentru investigarea implicării mycoplasmelor genitale și Chlamydiei în NP; un grup de 64 gravide la care s-au analizat cei mai potenți markeri cunoscuți până în prezent în estimarea NP (IL-6 și fibronectina fetală determinate în lichidul cervico-vaginal precum și lungimea colului uterin determinată prin ecografie transvaginală); un grup de 78 gravide cu infecție genitală bacteriană dintre care 30 asociau tulpini fungice, la care s-a urmărit importanța antifungigramei și implicarea în NP; un grup de 126 gravide care prezentau infecție genito-urinară cu alte microorganisme precum bacili Gram negativi aparținând familiei Enterobacteriaceae, Pseudomonas, Streptococ de grup B, Enterococ, Stafilococ, la care s-a urmărit importanța antibiogrammei prin evidențierea rezistenței marcate a unor tulpini la diverse chimioterapice antibacteriene.

La lotul selectat, s-au recoltat probe de sânge la prima vizită, pentru cele care se prezintă pentru infertilitate și în săptămânile 22-34 de sarcină, pentru evaluarea următorilor parametrii: IL-6, Proteina C Reactivă și investigațiile standard: hemoleucograma, grup sanguin, Rh, uree, creatinina, acid uric, glicemie, VDRL, TPHA, serologie HIV. De asemenea, protocolul de urmărire a infecției a cuprins urocultura, probe din endocol pentru investigarea etiologiei infecțioase (Chlamydia trachomatis, germeni anaerobi, cultivarea, identificarea, aprecierea cantitativă și testarea susceptibilității la antibiotice a Ureaplasma spp., Mycoplasma hominis, Streptococul de grup B, Escherichia coli, Candida) alături de citologia Pap și frotiuri colorate Gram, completat cu evaluarea ecografică, cu scopul de a determina asocierea dintre factorii de risc propuși ca screening în patologia infecțioasă genitală a nașterii premature.

De asemenea, au fost prelevate probe din endocol pentru determinarea IL-6 și fFN din lichidul cervico-vaginal. Produsul recoltat a fost termostatat la 37°C, timp de 24 ore după prima determinare a IL-6 în același recipient în care a fost transportată proba.

S-a alcătuit un algoritm de identificare și tratare a unor agenți patogeni sau condiționat patogeni prezenți în sfera uro-genitală și, la femeile însărcinate, s-a urmărit relația dintre prezența

acestor microorganisme, pozitivarea testului fibronectinei fetale, creșterea valorilor IL-6 în lichidul cervico-vaginal, scăderea lungimii colului uterin și apariția NP.

Utilitatea determinării IL-6 în lichidul cervico-vaginal rezultă din asocierea sa cu procesul de colonizare microbiană intrauterină.

S-a urmărit relația dintre vaginoza bacteriană, creșterea IL-6, eficacitatea protocolului terapeutic și apariția nașterii premature.

La femeile infertile, în vederea fertilizării in vitro, recoltarea probelor s-a făcut la jumătatea ciclului menstrual, întrucât variațiile hormonilor sexuali pot influența concentrația unor citokine (IL-6).

Pentru a arăta superioritatea testării IL-6cv la 24 ore, ca predictor independent al NP, din grupul de 106 gravide cu vârsta sarcinii cuprinsă între 22 și 34 săptămâni, am ales un grup de 36 gravide cu vârsta medie 30,6 ani (interval 18-40 ani) la care s-au decelat 2 sau mai mulți factori semnificativi de risc pentru nașterea prematură:

- Sângerări vaginale în timpul sarcinii
- Conracții premature
- Antecedente de avort spontan sau naștere prematură
- Lungimea colului uterin <20 mm
- Testul fFN pozitiv (>50 ng/ml)
- Nivelul IL-6 în lichidul cervico-vaginal >58 ng/L
- Prezența Mycoplasmei, Ureaplasmei și/sau Chlamydiei în tractul urogenital

Pentru identificarea germenilor am folosit:

- Test pentru identificarea fibronectinei fetale (Adeza™ Fetal Fibronectin Kit);
- Test pentru diagnosticul Mycoplasmei și Ureaplasmei din tractul urogenital (cultivare, identificare, aprecierea cantitativă, testarea susceptibilității la antibiotice) - Mycoplasma IST 2 sau Mycoview. Antibiograma a furnizat simultan rezultate pentru identificarea, aprecierea cantitativă și testarea susceptibilității mycoplasmelor la 11 antibiotice.
- Test pentru diagnosticul rapid al Chlamydiei din lichidul cervico-vaginal - Testul QuickVue Chlamydia / "Diaquick" Chlamydia;
- Kituri pentru identificarea Interleukinei 6 din produse patologice - Elecsys IL-6 test (metoda ECLIA - Roche) și Human IL-6 (metoda ELISA - Invitrogen).
- Sonda ecografică transvaginală a echipamentului Medison Sonoace 6000C pentru determinarea lungimii colului uterin.
- Asociațiile microbiene s-au izolat pe medii îmbogățite și selective, antibiograma fiind efectuată

numai pentru speciile bacteriene aerobe.

Prelucrarea statistico-matematică

Pentru prelucrarea datelor și evidențierea grafică s-au folosit modulul Data Analysis al programului Microsoft Excel, software Epi Info distribuit de OMS și SPSS for Windows specializat în calcule statistice științifice.

Înregistrarea datelor despre pacientele incluse în studiu cu ajutorul programului Microsoft Excel a constituit baza de date inițială din care s-au extras aspectele semnificative ale acestui studiu.

Pentru fiecare variabilă s-a calculat riscul relativ (RR) și rația de risc (OR). S-au efectuat teste parametrice și neparametrice în vederea calculării semnificației statistice (p) și a intervalului de confidență 95%.

Au fost folosite:

Testul t al lui Student de comparare a mediilor pentru 2 loturi propune 2 ipoteze statistice:

-Ipoteza H_0 (sau ipoteza de nul)- diferența între medii este întâmplătoare

-Ipoteza H_1 – diferența între medii este semnificativă statistic

Testul analizei varianței ANOVA presupune testarea mediilor mai multor loturi pentru a găsi diferențe semnificative iar testul F , al lui Fisher compară dispersiile dintre două loturi pentru a decide dacă diferă semnificativ.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

La nivelul tractului genital al gravidei se produc o serie de reacții inflamatorii care vor iniția travaliul atât în nașterea prematură cât și în sarcina spontană, la termen.

Observațiile recente arată că în sarcină, celulele inflamatorii invadează corionul și amniosul, fiind sursă de mediatori ai inflamației.

În acest studiu am constatat că există posibilitatea ca stimulii produși de unele bacterii (în special mycoplasmele) să producă reacții inflamatorii în uterul gravid prin eliberarea unor citokine, inițiind astfel o cascadă de evenimente finalizate ulterior cu NP (8).

Infecția vaginală determinată de Chlamydia, Mycoplasma și Ureaplasma cu implicare în nașterea prematură

Pentru investigarea implicării Chlamydiei și mycoplasmelor genitale în NP, pacientele luate în studiu au fost împărțite în două grupuri:

- I. un grup martor (M) care a cuprins 40 de gravide cu vârsta medie 26,8 ani (interval 18-36 ani);
- II. un grup de 66 gravide cu vârsta medie 32,3 ani (interval 18-40 ani) la care s-au decelat factori semnificativi de risc pentru nașterea prematură: prezența vaginitei/vaginozei bacteriene, antecedente de avort spontan sau antecedente de naștere prematură.

Grupul de 66 gravide a fost împărțit în două subgrupuri:

- a. Subgrupul 1 (R1)- cu factori de risc în antecedente +/- vaginită/vaginoză bacteriană (35 de paciente);
- b. Subgrupul 2 (R2)- fără factori de risc în antecedente, dar cu prezența vaginozei/vaginitei de cauză bacteriană (31 de paciente).

Cele două subgrupuri au fost stratificate după prezența mycoplasmelor genitale și/sau Chl pentru a observa dacă aceste microorganisme, luate separat sau în asociere, determină creșterea semnificativă a valorilor IL-6_{CV}, față de grupul de control sau față de subgrupurile care prezintă vaginoză/vaginită cu alte bacterii.

Prezența mycoplasmelor și a chlamydiei, dar mai ales asocierea acestora la subgrupurile 1 și 2, a aratat niveluri ale IL-6_{CV} semnificativ mai mari ($p < 0,05$) comparativ cu grupul de control. Între cele două subgrupuri, se observă că valoarea medie a IL-6_{CV} a fost mai mare la subgrupul 1, ceea ce poate semnifica faptul că persoanele cu factori de risc în antecedente au o predispoziție mai mare la o naștere prematură.

Am observat că prezența mycoplasmelor și/sau Chlamydiei în grupul de femei cu risc de NP crește semnificativ nivelul IL-6_{CV}, fiind astfel incriminate în patogeniza nașterii premature.

Subgrupul R2 a cuprins și o pacientă la care s-a evidențiat prezența Chlamydiei, însă valoarea IL6_{CV} nu a diferit statistic de valoarea medie înregistrată la grupul de control. La subgrupul R1, în prezența Chl, valoarea medie a IL6_{CV} a diferit statistic ($P < 0,05$) față de grupul martor și față de subgrupul R1 fără vaginită/vaginoză bacteriană. Creșterea semnificativă a concentrației IL6_{CV} la gravidele cu factori de risc în antecedente și prezența Chlamydiei față de grupurile M și R2 pune semne de întrebare dacă invazia microbiană cu această bacterie poate fi considerată un proces cronic.

Surprinzător, prezența izolată a Uu a determinat creșterea semnificativă a IL6_{CV} numai la subgrupul fără factori de risc în antecedente. La subgrupul cu factori de risc în antecedente prezența Uu nu crește semnificativ IL6_{CV}, deci nu ar influența durata sarcinii.

În cazul aceluiași subgrup R2, prezența izolată a Uu a determinat creșterea valorilor medii ale IL6_{CV} chiar mai mult decât la subgrupul cu antecedente, dar cu diferențe ne semnificative.

Prezența Uu asociată cu infecția chlamydiană conduce la creșterea semnificativă a concentrației IL6_{CV}, prin comparație cu grupurile la care My/Uu/Chl au fost absente.

Asocierea Uu la infecția cu My a produs creșterea semnificativă a concentrației IL6_{CV}, doar la grupurile la care nu s-a constatat prezența vaginozei/vaginitei de cauză bacteriană, ceea ce poate însemna că, în prezența infecției, My nu influențează cronologia normală a sarcinii.

Prezența mycoplasmelor și a Chlamydiei, dar mai ales asocierea acestora la subgrupurile R1 și R2, a arătat niveluri ale IL-6_{CV} semnificativ mai mari ($p < 0,05$) comparativ cu grupul de control (Tabel 8).

Valorile medii ale IL-6_{CV} au fost înalt semnificative atunci când colonizarea epiteliului vaginal a inclus asocierea Ureaplasmei spp. cu Chlamydia și/sau Mycoplasma hominis la subgrupul cu antecedente. Mai mult, prezența Chlamydiei și Mycoplasmei la gravidele cu niveluri IL-6_{CV} crescute a coincis cu NP sub 33 de săptămâni, cele două specii putând fi considerate factori de risc independenți pentru această vârstă gestațională.

La aceste subgrupuri, prezența Uu/My/Chl în lichidul cervico-vaginal a fost înalt semnificativă ($p < 0,001$), aspect care m-a determinat să includ prezența acestor bacterii între factorii de risc asociați NP.

S-au identificat și alte specii bacteriene incriminate în dezvoltarea vaginozei bacteriene însă valorile IL-6_{CV} au fost fără semnificație statistică la aceste gravidele, comparativ cu grupul de control, rezultatele fiind comparabile cu cele din literatura de specialitate (9) .

La lotul studiat, este de menționat colonizarea bacteriană frecventă cu streptococ de grup B (35,9%) între agenții microbieni identificați în secreția vaginală, urmată de Ureaplasma urealyticum (19,23%), Enterococ (12,82%), Mycoplasma hominis, Chlamydia trachomatis, și enterobacteriacee, fiecare cu 6,41%. Streptococul de grup B (35,9%) este cauza infecțiilor invazive la nou-născuți prin transmiterea verticală de la mamă la făt după ruperea membranelor sau debutul travaliului (10, 11).

Am evaluat sensibilitatea la antibiotice a mycoplasmelor identificate. Tulpinile studiate au prezentat rezistență crescută la fluorochinolone și azithromycin și sensibilitate maximă la streptogramine.

Fluoroquinolonele acționează prin blocarea topoizomerazei IV și ADN girazei, necesară în spiralarea cromozomului bacterian. Rezistența la fluorochinolone a fost descrisă la speciile de Mycoplasme și Ureaplasme urogenitale prin apariția mutațiilor în regiunile care codifică genele topoizomerazei IV și ADN-girazei (12). Rezistența multiplă la antibiotice a fost explicată prin fenomenul de eflux activ la nivelul membranei bacteriene prin pompele de eflux (13). Rezistența la macrolide s-a atribuit mutațiilor proteinelor ribosomale L4 și L22 ale subunității 50S și mutației la poziția C2243N în ARNr 23S (14). Pereyre et al. au emis ipoteza că mai multe mutații prezente atât pe subunitățile ARNr cât și la nivelul proteinelor ribozomale sunt condiții necesare pentru apariția rezistenței crescute la macrolide (15, 16).

Mycoplasmele prezintă rezistență naturală la câteva clase de antibiotice, precum betalactaminele și glycopeptidele. Rezistența dobândită a mycoplasmelor și chlamydiei la macrolide și fluoroquinolone cauzată în principal prin folosirea abuzivă sau incorectă, conduce la eșecul terapeutic.

Valoarea interleukinei 6 în nașterea prematură

Nivelurile crescute ale IL-6_{CV} în grupul gravidelor cu risc de NP la care s-au identificat mycoplasme genitale sau Chlamydia, au impus verificarea relației stabilite între concentrațiile acesteia, fibronectina fetală (fFN) și lungimea colului uterin. De asemenea am evaluat relația dintre NP și prezența inflamației în teritoriul genital cauzată de înlocuirea florei vaginale și cervicale cu mycoplasme genitale și/sau Chlamydii.

Din grupul de 106 gravide cu vârsta sarcinii cuprinsă între 22 și 34 săptămâni, am investigat 64 de paciente prin determinarea nivelului IL-6 și prezenței fibronectinei fetale în lichidul cervico-vaginal după săptămâna 24 de sarcină și prin măsurarea lungimii colului uterin (LCU).

Produsul de secreție a fost recoltat în recipientul de transport inclus în kitul fFN și, după determinarea fFN și IL-6_{CV}, a fost termostatat la 37°C, timp de 24 ore în același recipient, pentru a doua determinare a IL-6_{CV}.

Stabilitatea IL-6_{CV} în mediul de transport al fFN a fost determinată într-un studiu anterior prin determinarea concentrației acesteia în triplicat la 0, 4, 24 și 72 ore, proba fiind menținută la temperatura camerei, la 4°C și la -20°C.

După termostatarea probei la 37°C, am constatat că valorile IL6_{CV} diferă de la o pacientă la alta, astfel, la grupul martor, media valorilor IL6_{CV} obținute are o ușoară tendință de scădere, la pacientele din grupul de risc compliante la protocolul terapeutic și care au născut la termen, media

valorilor IL6_{CV} crește ușor în 24 ore de la recoltare dar ne semnificativ, în timp ce valorile IL6_{CV} în grupul care nu s-a prezentat la controalele ulterioare sunt crescute semnificativ ($p < 0,05$).

Interesant, la grupul de paciente cu vârsta mai mare de 30 ani care aveau prezentă fFN, valorile IL6_{CV} obținute la recoltare, nu au diferit statistic de valorile IL6_{CV} la 24 ore ($p > 0,05$), dar au diferit semnificativ imediat după recoltare față de grupul de gravide sub 30 ani cu vârsta sarcinii mai mică de 30 săptămâni și fFN prezentă. Acest aspect sugerează că factorii de risc care acționează la tinerele sub 30 de ani și la vârste gestaționale timpurii, sunt mai predispuse la riscul de naștere prematură.

Diferențe înalt semnificative ($p < 0,01$) au fost observate la grupurile cu VG < 30 săptămâni în raport cu grupurile la care fFN a fost pozitivă.

Pentru determinarea IL-6 din lichidul cervico-vaginal am propus ca nivel limită, cut-off, valoarea de 58 ng/ml, nivel peste care probabilitatea unei nașteri premature este semnificativ statistic mai mare.

La aceste paciente, o specificitate mare a testării s-a obținut când lungimea colului a fost sub 20 mm (93%) iar testul fibronectinei a fost pozitiv (93%), rezultate care sunt în concordanță cu datele din literatura de specialitate (17). Datorită valorii predictive negative mari (78%) LCU poate fi folosit cu succes în protocolul diagnostic al estimării riscului de naștere prematură (Tabel 15).

De asemenea, datorită sensibilității ridicate (95%) la grupul cu factori de risc pentru NP, determinarea IL-6 la 24 ore de la recoltare poate fi utilizată ca test screening. Se observă în acest caz că nu numai sensibilitatea este excelentă ci și valoarea predictivă negativă (90%).

Rezultatele obținute sunt în concordanță cu literatura de specialitate. Prin urmărirea în dinamică a LCC și a IL-6_{CV} la pacientele care au născut prematur, Kurkinen et colab. arată că numai IL-6 determinat în lichidul cervico-vaginal are tendința de a crește (18).

În prezența vaginozei bacteriene, creșterea IL-6_{CV} s-a corelat cu creșterea fFN, test utilizat pentru aprecierea travaliului prematur.

La ora actuală, țesuturile responsabile de creșterea producției de IL-6 nu sunt cunoscute pe deplin. Această citokină joacă un rol important în mecanismul de apărare al gazdei, fiind implicată în recrutarea limfocitelor T la locul inflamator, prin creșterea adeziunii dintre endoteliu și limfocit (19).

Există posibilitatea ca stimulii produși de unele bacterii (în special mycoplasmele) să producă reacții inflamatorii în uterul gravid prin eliberarea unor citokine, inițiind astfel o cascadă de evenimente finalizate ulterior cu nașterea prematură, legătura mecanismelor dintre stimulul

inflamator și delivrență fiind conferită de interleukina 6 prin efectul redundant dat de asemănarea structurală a receptorului și a subunităților care îl alcătuiesc cu alți receptori de citokine.

Nivelul IL-6 crește semnificativ la 24 ore de la recoltarea lichidului cervico-vaginal, înaintea apariției semnelor clinice ale nașterii și pozitivării fFN, fapt datorat eliberării acestei citokine proinflamatorii din celulele prezente la nivelul epiteliului vaginal.

La grupul de paciente studiat, valoarea IL-6cv la 24 ore a fost cel mai puternic predictor al nașterii premature, cu un Odds Ratio de 21.86, CI95% 5.63-84.9.

Se avansează ideea participării căii de trans-semnalizare în procesul nașterii premature, prin participarea receptorilor solubili ai IL-6 (sIL-6R) și gp130 solubil (sgp130), prezența lor în lichidul cervico-vaginal mascând eliberarea IL-6 și, implicit, detectarea concentrației reale a acesteia imediat după recoltare.

La aceste gravide, între agenții microbieni identificați în secreția vaginală trebuie menționată colonizarea frecventă cu *Ureaplasma* spp. (35.9%), urmată de streptococul de grup B. Nu se știe încă de ce *Ureaplasma* invadează cavitatea amniotică doar la unele femei. Mai multe studii au sugerat că speciile de *Ureaplasma parvum* și *urealyticum* diferă între ele din punct de vedere al patogenității (20, 21, 22).

Valorile IL-6cv au fost semnificativ crescute la gravidele care prezentau infecție vaginală cu *Chlamydia*, *Ureaplasma* sau *Mycoplasma* ($p < 0,05$) comparativ cu grupul de control. Nivelul înalt al IL-6cv în prezența speciilor de *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, *Chlamydia* și mai ales la asocierea lor, crește riscul prematurității la naștere (23).

CONCLUZII

1. Implicarea în etiopatogenia prematurității a unor bacterii precum *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma* spp. sau *Chlamydia trachomatis* izolate din infecțiile genitale la femeia gravidă, evidențiată în numeroase studii din literatura de specialitate, reprezintă o problemă stringentă și de mare actualitate în întreaga lume dar și un subiect de controversă.
2. Pentru a evita complicațiile atât pe termen scurt cât și pe termen lung, specifice noului născut prematur, cauzate de prezența infecției cu *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma* spp. sau *Mycoplasma hominis* la femeia gravidă, mai ales dacă se asociază cu creșterea unor markeri utili în estimarea NP, ar trebui aplicate metode terapeutice care sunt accesibile în practica curentă și au o eficiență ridicată.

3. Studiul inițial a inclus un grup de 262 femei de vârstă fertilă, evaluate prospectiv pentru infertilitate sau pentru riscul de naștere prematură. Din acest grup, au fost atent selecționate 106 gravide cu vârsta gestațională între 22-34 săptămâni, pentru investigarea implicării mycoplasmelor genitale și Chlamydiei în NP, în scopul stabilirii unui protocol diagnostic și terapeutic care să vizeze identificarea și tratarea lor, în cazul populațiilor cu risc înalt.
4. Am alcătuit un algoritm de identificare și tratare a unor agenți patogeni sau condiționat patogeni prezenți în sfera uro-genitală și, la femeile însărcinate, am urmărit relația dintre prezența acestor microorganisme, pozitivarea testului fibronectinei fetale, creșterea valorilor IL-6 în lichidul cervico-vaginal, scăderea lungimii colului uterin și apariția NP.
5. În cadrul gravidelor din grupurile de risc selectate, prezența mycoplasmelor genitale și Chlamydiei, s-a corelat pozitiv cu riscul de naștere prematură.
6. Utilitatea determinării IL-6 în lichidul cervico-vaginal rezultă din asocierea sa cu procesul de colonizare microbiană intrauterină. Am constatat creșterea semnificativă a concentrației IL6_{CV} la gravidele cu factori de risc în antecedente, mai ales în prezența Chlamydiei, infecția intrauterină putând fi considerată astfel un proces cronic.
7. Prezența izolată a Uu a determinat creșterea semnificativă a IL6_{CV} numai la subgrupul fără factori de risc în antecedente. În cazul aceluiași subgrup, prezența izolată a Uu a determinat creșterea valorilor IL6_{CV} chiar mai mult decât la subgrupul cu factori de risc în antecedente, dar cu diferențe ne semnificative.
8. În acest studiu, la subgrupul cu factori de risc în antecedente prezența izolată a Uu și My nu crește semnificativ IL6_{CV}, dar asocierea lor cu Chlamydia crește semnificativ riscul unei nașteri premature.
9. Prezența Chlamydiei și Mycoplasmei la gravidele cu niveluri IL-6_{CV} crescute a coincis cu NP sub 33 de săptămâni, cele două specii putând fi considerate factori de risc independenți pentru această vârstă gestațională.
10. Din totalul de 262 de femei, după o riguroasă selecție, am ales un grup de 64 gravide la care s-au analizat cei mai potenți markeri cunoscuți până în prezent în estimarea NP (IL-6 și fibronectina fetală determinate în lichidul cervico-vaginal precum și lungimea colului uterin determinată prin ecografie transvaginală. Din cele 36 gravide cu factori de risc, 15 (41,66%) au născut la termen, între acestea situându-se și pacientele tratate pentru prezența mycoplasmelor genitale și/sau chlamydiei, restul de 21 (58,33%) cuprinzând gravidele care nu au fost compliante la protocolul terapeutic și care au născut prematur.

11. Am constatat că vârsta gestațională mică și pozitivarea fFN la aceste gravide influențează semnificativ atât valorile IL6_{CV} determinate la recoltare cât și la 24 ore. Acest aspect sugerează că tinerele sub 30 de ani și cu varste gestaționale timpurii, sunt mai predispuse la riscul de naștere prematură.
12. La grupul de paciente studiat, am analizat fiecare marker utilizat în predicția nașterii premature (fFN, LCU, IL-6_{CV}, IL-6_{CV} la 24 ore) și am constatat că valoarea IL-6 la 24 ore a fost cel mai puternic predictor al nașterii premature, cu un Odds Ratio de 21.86, CI95% 1.32-42.4
13. În prezența unor stimuli bacterieni induși de Chlamydia, Ureaplasma sau Mycoplasma există o influență directă a producției de IL-6 în celulele epiteliului vaginal, citokină cheie de fază acută care acționează ca un modulator major al răspunsului organismului la infecție.
14. IL-6_{CV} estimează cu o acuratețe mai mare riscul nașterii înainte de termen, aspect evidențiat prin curba ROC la lotul de risc studiat, deci poate fi considerat predictor independent al NP dată fiind superioritatea testării la 24 ore de la recoltare.
15. Deși nu s-a observat o legătură clară între valorile IL6_{CV} și lungimea colului uterin, evaluarea ecografică poate fi folosită în ansamblul investigațiilor adresate depistării gravidelor cu risc pentru naștere prematură.
16. Față de protocolul clasic bazat pe criterii clinice, protocolul diagnostic propus în lucrarea de față ar trebui să cuprindă pe lângă criteriile anamnestice (nașterea prematură sau avort tardiv în antecedente) ca o componentă esențială, identificarea și tratarea mycoplasmelor genitale și/sau Chlamydiei, determinarea IL-6 din lichidul cervico-vaginal și criteriile ecografice.
17. IL-6 și fFN sunt teste neinvazive care ar trebui utilizate frecvent în practica medicală, pentru a putea evita complicațiile imediate și tardive neonatale.
18. În grupurile selectate există o asociere înalt semnificativă între valorile IL-6_{CV} și infecțiile genitale multiple, ce cumulează mycoplasme, chlamydii, ureaplasme și vaginoza bacteriană.
19. La un alt grup de 30 gravide care prezenta infecție genitală bacteriană asociată cu prezența fungilor, am urmărit importanța antifungigramei și implicarea în NP. Incidența înaltă a infecțiilor fungice vulvo-vaginale, ca și asocierea lor cu modificarea florei bacteriene normale, impun stabilirea cu acuratețe a etiologiei și instituirea terapiei adecvate.
20. Grupul de 126 gravide care prezenta infecție genito-urinară cu alte microorganisme, precum bacili Gram negativi aparținând familiei Enterobacteriaceae, Pseudomonas, Streptococ de grup B, Enterococ, Stafilococ, a fost urmărit pentru evidențierea importanței antibiogrammei privind

rezistența marcată a unor tulpini la diverse chimioterapice antibacteriene și pentru implicarea în NP.

21. Principalul agent etiologic al infecțiilor genito-urinare a fost *Escherichia coli*, urmată de *Klebsiella*, *Enterococcus*, *Proteus*, *Streptococcus* grup B, *Staphylococcus* spp., *Pseudomonas aeruginosa* și grupul *Enterobacter-Citrobacter*.
22. Tulpinile aparținând familiei *Enterobacteriaceae* au prezentat o reducere marcată a sensibilității la aminopeniciline și la asociația cu inhibitori de beta lactamază, fapt ce dovedește că aceste antibiotice își justifică utilizarea în continuare în terapie numai în condițiile unei monitorizări atente a fenomenelor de instalare și difuzare a rezistenței la acestea.
23. Prezența rezistenței la fluoroquinolone la care se asociază prezența ESBL, impune urmărirea răspândirii acestor tulpini pentru evitarea apariției infecțiilor nosocomiale și eșecului clinic datorat terapiei neadecvate.
24. Tratamentul antimicrobian în infecțiile genitale care sunt incriminate în etiopatogenia NP este justificat de costurile mari alocate prematurului, de suprasolicitarea personalului medical, dar și de îngrijirea ulterioară a acestuia pe termen lung, în cazul apariției complicațiilor.
25. Lipsa de invazivitate a metodelor diagnostice folosite precum și implicarea importantă a acestor agenți infecțioși în etiopatogenia nașterii premature pot justifica includerea mycoplasmelor genitale și *Chlamydiei* într-un protocol diagnostic și terapeutic care contrabalansează costurile depistării și tratării factorilor de risc ai nașterii premature.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Janet Tucker, William McGuire. Epidemiology of preterm birth. *BMJ* 2004; 329:675-678.
2. ACOG Committee on Practice Bulletins Obstetrics. ACOG Practice Bulletin No. 80: premature rupture of membranes. Clinical management guidelines for obstetrician-gynecologists. *Obstet Gynecol* 2007;109:1007-1019.
3. Callaghan WM, MacDorman MF, Rasmussen SA, Qin C, Lackritz EM. The contribution of preterm birth to infant mortality rates in the United States. *Pediatrics*. Oct 2006;118(4):1566-73.
4. Romero R, Espinoza J, Goncalves LF, Kusanovic JP, Friel L, et al. (2007) The role of inflammation and infection in preterm birth. *Semin Reprod Med* 25 (1): 21–39.
5. Laudanski P, Pierzynski P, Laudanski T. Reductionist and system approaches to study the role of infection in preterm labor and delivery, *BMC Pregnancy and Childbirth* 2007, 7(Suppl 1):S9
6. Wu YW, Croen LA, Torres AR, Van De Water J, Grether JK, Hsu NN. Interleukin-6 genotype and risk for cerebral palsy in term and near-term infants. *Ann Neurol*. Nov 2009;66(5):663-70
7. Goldenberg RL, Andrews WW, Goepfert AR, Faye-Petersen O, Cliver SP, Carlo WA, Hauth JC. The Alabama Preterm Birth Study: Umbilical cord blood *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* cultures in very preterm newborn infants, *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, January 2008 p. 43.e1-43.e5
8. Kataoka S, Yamada T, Chou K, Nishida R, Morikawa M, Minami M, Yamada H, Association between Preterm Birth and Vaginal Colonization by Mycoplasmas in Early Pregnancy, *Journal Of Clinical Microbiology*, Jan. 2006, p. 51–55 Vol. 44, No. 1
9. Hillier SL, “The complexity of microbial diversity in bacterial vaginosis”, *The New England Journal of Medicine*, vol. 353, no. 18, pp. 1886–1887, 2005.
10. Edwards MS, Baker CJ. *Streptococcus agalactiae* (group B streptococcus). In: Mandell, Douglas, and Bennett’s Principles and Practice of Infectious Diseases. 6th ed., Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (editors). Churchill Livingstone, 2005:2424-2434.
11. Colbourn T, Asseburg C, Bojke L et al.. Prenatal screening and treatment strategies to prevent group B streptococcal and other bacterial infections in early infancy: cost-effectiveness and expected value of information analyses. *Health Technol. Assess.*, 2007, 29: 1-207.
12. Xie X and Zhang J.. Trends in the rates of resistance of *Ureaplasma urealyticum* to antibiotics and identification of the mutation site in the quinolone resistance-determining region in Chinese patients. *FEMS Microbiol Lett.*, 2006, 259:181- 186.

13. Raheison S, Gonzalez P, Renaudin H, Charron A, Bebear C and Bebear CM. Evidence of active efflux in resistance to ciprofloxacin and ethidium bromide by *Mycoplasma hominis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002, 46:672-679.
14. Dongya M, Wencheng X, Xiaobo M and Lu W. Transition mutations in 23S rRNA account for acquired resistance to macrolides in *Ureaplasma Urealyticum*. *Microb Drug Resist*, 2008, 14:183-186.
15. Pereyre S, Metifiot M, Cazanave C, Renaudin H, Charron A, Bebear C and Bebear CM. Characterization of in vitro-selected mutants of *Ureaplasma parvum* resistant to macrolides and related antibiotics. *Int J Antimicrob Agents*. 2007a, 29:207-211.
16. Pereyre S, Charron A, Renaudin H, Bebear C and Bebear CM. First Report of Macrolide-Resistant Strains and Description of a Novel Nucleotide Sequence Variation in the P1 Adhesin Gene in *Mycoplasma pneumoniae* Clinical Strains Isolated in France over 12 Years. *J Clin Microbiol*. 2007b, 45(11):3534-3539.
17. Tsoi E, Akmal S, Rane S, Otigbah C, Nicolaidis KH. Ultrasound assessment of cervical length in threatened preterm labor, *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, 2003: 21, 552-555.
18. Kurkinen-Räty M, Ruokonen A, Vuopala S, Koskela M, Rutanen E-M, Kärkkäinen T, Jouppila P. Combination of cervical interleukin-1 and -8, phosphorylated insulin-like growth factor binding protein-1 and transvaginal cervical ultrasonography in assessment of the risk of preterm birth. *Br J Obstet Gynecol* 2001;108:875-81.
19. Song M, Kellum JA. Interleukin-6. *Crit Care Med* 2005;33(Suppl12):463-465.
20. Abele-Horn, M, Wolff C, Dressel P, Pfaff F and Zimmermann A. Association of *Ureaplasma urealyticum* biovars with clinical outcome for neonates, obstetric patients, and gynecological patients with pelvic inflammatory disease. *J. Clin. Microbiol*. 1997, 35:1199–1202.
21. Povlsen, K, Thorsen P, and Lind I. Relationship of *Ureaplasma urealyticum* biovars to the presence or absence of bacterial vaginosis in pregnant women and to the time of delivery. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis*. 2002, 20:65–67.
22. Kasper DC, Mechtler TP, Reischer GH et al, "The bacterial load of *Ureaplasma parvum* in amniotic fluid is correlated with an increased intrauterine inflammatory response," *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, vol. 67, no. 2, pp. 117–121, 2010.
23. Jacobsson B, Mattsby-Baltzer I, and Hagberg H. "Interleukin-6 and interleukin-8 in cervical and amniotic fluid: relationship to microbial invasion of the chorioamniotic membranes," *BJOG*, 2005, vol. 112, no. 6, pp. 719–724.