

# Clinical characteristics, serology and serovar studies on *Chlamydia trachomatis* infections

Proefschrift

ter verkrijging van  
de graad van Doctor aan de Universiteit Leiden,  
op gezag van de Rector Magnificus prof. mr. P.F. van der Heijden,  
volgens besluit van het College voor Promoties  
te verdedigen op woensdag 13 oktober 2010  
klokke 13.45 uur

door

Caroline Johanna Bax

geboren te Tilburg  
in 1970

## Promotiecommissie

Promotor	Prof. dr. J.B. Trimbos
Co-promotores	Dr. P.J. Dörr (Medisch Centrum Haaglanden) Dr. S.A. Morré (VU Medisch Centrum)
Overige leden	Dr. P.M. Oostvogel (Medisch Centrum Haaglanden) Prof. dr. J.T. van Dissel Prof. dr. F.M. Helmerhorst Prof. dr. H.H.H. Kanhai

20 years from now you will be more disappointed by the things you didn't do than by the ones you did.  
So, throw off the bow lines. Sail away from the safe harbour. Catch the trade winds in your sails.

Explore. Dream. Discover.

Mark Twain

# Contents

<b>Chapter 1</b>	11
General Introduction	
<hr/> Part I Clinical characteristics; prevalence and risk factors <hr/>	
<b>Chapter 2</b>	33
Clinical characteristics of <i>Chlamydia trachomatis</i> infections in a general outpatient department of Obstetrics and Gynaecology in the Netherlands. <i>Sex Transm Infect.</i> 2002;78(6):E6.	
<b>Chapter 3</b>	41
Analyses of multiple site and concurrent <i>Chlamydia trachomatis</i> serovar infections, and serovar tissue tropism for urogenital <i>versus</i> rectal specimens in male and female patients. <i>Submitted Sex Transm Infect.</i> 2010.	
<hr/> Part II Serology <hr/>	
<b>Chapter 4</b>	57
Comparison of serological assays for detection of <i>Chlamydia trachomatis</i> antibodies in different groups of obstetrical and gynecological patients. <i>Clin Diagn Lab Immunol.</i> 2003;10(1):174–6.	
<b>Chapter 5</b>	65
<i>Chlamydia trachomatis</i> heat shock protein 60 (cHSP60) antibodies in women without and with tubal pathology using a new commercially available assay. <i>Sex Transm Infect.</i> 2004;80(5):415–6.	
<hr/> Part III Serovar <hr/>	
<b>Chapter 6</b>	73
The serovar distribution of urogenital <i>Chlamydia trachomatis</i> strains among sexual transmitted disease clinic patients and gynaecological patients in the region of The Hague, The Netherlands: an ethnic epidemiological approach. <i>Submitted Sex Transm Infect.</i> 2010.	
<b>Chapter 7</b>	87
Significantly higher serological responses of <i>Chlamydia trachomatis</i> B group serovars <i>vs.</i> C and I serogroups. <i>Drugs Today.</i> 2009;45(Suppl. B):135–40.	

<b>Chapter 8</b>	99
General Discussion	
<b>Chapter 9</b>	131
Summary en Nederlandse Samenvatting	
<b>Abbreviations</b>	149
<b>Authors and affiliations</b>	153
<b>Acknowledgements/Dankwoord</b>	157
<b>Curriculum vitae</b>	163

# part IV | Chapter 9

Summary en Nederlandse Samenvatting



## Summary

In search of epidemiological risk factors for *Chlamydia trachomatis* (CT) and prevention of tubal pathology we performed two prospective-cohort studies. The results are presented in this thesis. The first study was reported in 2002-2004 using a well defined cohort of patients visiting an outpatient department (OPD) of Obstetrics and Gynaecology (O&G) located in the central urban area of The Hague, and describes the epidemiological data of patients with CT infections.

In the same population we compared two different serological assays for detection of CT antibodies, and evaluated the characteristics of a newly developed assay detecting heat shock protein 60 (HSP60) antibodies and its role in predicting tubal pathology.

In 2007 a second, sequential study was started at the same OPD of O&G and at the nearby regional sexually transmitted disease clinic to finalise some of the objectives of our study.

CT infection is the most prevalent sexual transmitted disease in the Netherlands and worldwide. In the Netherlands some 60.000 people are infected each year of which 35.000 are women. In women approximately 70% of the infections are asymptomatic. However, infections caused by CT may lead to serious complications such as pelvic inflammatory disease (PID). Damage to the tubes may result in (tubal factor) subfertility and ectopic pregnancy. Infections in pregnant women may lead to neonatal conjunctivitis and pneumonia. The highest prevalence is found in young women, who are especially at risk for complications. It is unknown why some women have asymptomatic infections and others develop symptomatic upper genital tract infections. It has been suggested that different serovars and/or host-factors may be involved in the clinical course of infection, the rate of upper genital tract progression, and the clearance or persistence of infection.

Treatment of CT infections is simple and effective and when given in time can prevent late complications. With the development of techniques to detect CT in urine samples screening programs became possible and large scale screening programs for asymptomatic infections have been performed.

Uterine instrumentation such as intrauterine device (IUD) insertions, hysterosalpingography (HSG) and abortion curettage may cause upper genital tract infection if an asymptomatic cervical infection is present, by ascending infection or by reactivation of viable microorganisms in the upper genital tract. Therefore, in a population of obstetrical and gynaecological patients it is important to determine risk factors for infection

To optimise prevention strategies of such complications we wanted to use these risk factors for CT infections in our obstetrical and gynaecological population. Little is known about the dynamics of CT serovars and their specific role in pathogenicity. Insight in changes of serovar distribution in different ethnic groups over time, in relation to clinical data, could explain changes in the epidemiology of CT infections and have clinical implications.

**CHAPTER 1** outlines the pathogenesis, clinical course and detection methods of CT infections and describes the aims of this thesis.



## Part I Clinical characteristics

In **CHAPTER 2** we describe the prevalence and risk factors of CT infections in a general OPD of Obstetrics and Gynaecology in the Netherlands.

Age was the most important risk factor in our population (overall prevalence of CT infections 4.5%, in women under 20 years of age 15.8%). Another risk factor we found was post coital bleeding. We could not confirm significant differences between women from different ethnic origin or between women using different kinds of contraceptives.

Twelve (19.4%) patients with CT infections were found positive by urine test only, and 15 (24.2%) only by DNA probe. In our cohort the analyses of urine and of cervical specimens are complementary for the determination of the prevalence of CT infections in women.

A guideline for the preventive use of antibiotics in uterine instrumentation needs a cost effectiveness analysis to assess the tools of age based screening and/or antibiotic prophylaxis.

In **CHAPTER 3** we take another look at the sampling sites and also take the infecting serovar into consideration.

The aims of the study were to determine the incidence of concurrent infections on serovar level, to determine the incidence of multiple anatomical infected sites on CT detection and serovar level, and analysis of site specific serovar distribution, to identify tissue tropism, with special attention to serovar G/Ga for urogenital *vs.* rectal specimens.

In all female patients (OPD O&G and STD clinic), cervix or vagina sampling revealed 94.9% of the CT infected patients. Other sites are explained by sexual behaviour (rectum and pharynx).

In male patients, urethral site sampling or urine revealed 85.9% of the CT infected patients. In men-who-have-sex-with-men (MSM) the advice is to take rectal samples as well, to detect more patients.

The pharyngeal sampling site does not seem to contribute much to the detection of CT infected patients.

Samples of 433 patients (256 female and 177 male) were collected sequentially and were used for CT serovar detection and typing. In 11 patients (2.6%) we found concurrent serovars in one sample site. In 62 (34.1%) female (38 from the OPD O&G) and four (9.3%) male patients multiple sample site infections were found. A high percentage of women tested on the cervical/vaginal and rectal site were found positive on both sites (36.1%, 22 out of 61). In men, for serovar D/Da, E and G/Ga significant differences were found in serovar distribution between urogenital and rectal specimens (D/Da:  $p=0.0081$ , E:  $p=0.0012$ , and G/Ga:  $p=0.0033$ ).

The prevalence of multiple serovar infections at different sites of the same individual is relative low. Therefore serovar analysis could be performed on one positive sample site. Significant differences in

serovar distribution are found in rectal specimens of MSM with serovar G/Ga as the most prominent, suggesting tissue tropism. A same trend was found in women which, however, did not reach statistical significance.

## Part II Serology

Continuously new commercially available species-specific (peptide-based) enzyme immunoassays (EIAs) are being developed for the detection of CT antibodies. Serological assays have been used to detect antichlamydial antibodies in the fertility workup, predicting tubal pathology. Their value for fertility evaluation remains an ongoing subject of debate. There is wide variation between various tests in the correlation of antichlamydial antibodies with both current CT infections and tubal pathology.

Therefore, in **CHAPTER 4** we compare two new serological EIAs (pELISA (Medac) and Chlamydia-EIA (Biologische Analysensystem GmbH)) with microimmunofluorescence (MIF) as a 'gold standard' to detect CT antibodies in pregnant women, subfertility patients, a control group of various gynaecological patients and CT positive patients.

There were no significant differences in seroprevalence rates, except for the group of CT-positive patients ( $p < 0.01$ ).

When we looked further in our subfertility group, we found that in 67% of women with patent tubes no CT IgG antibodies were detected by any of the assays, while in 27% of the women with tubal pathology no CT IgG antibodies were detected. A possible explanation could be that not in all patients with CT infections IgG antibodies are formed.

Test characteristics were calculated for pELISA and Chlamydia-EIA. The diagnostic accuracy of all assays showed relative poor performance in predicting tubal pathology. pELISA seems to be a good alternative to MIF. It has a high specificity, is easier to perform and less expensive than MIF, and could therefore be used as a screenings test.

**CHAPTER 5** focuses on CT heat shock protein 60 (cHSP60) antibodies in women without and with tubal pathology using a new commercially available assay.

cHSP60 assays are used in research setting in assessing serological responses to urogenital CT infection. Although comparison of the different 'in-house' assays is difficult owing to a lack of standardisation, there is a consensus among the users of these assays that the anti-cHSP60 responses in women increase with the severity of CT associated disease. A commercially produced assay that employs defined cHSP60 epitopes should allow for the comparison of results obtained in different laboratories, as well as forward the use of cHSP60 as a diagnostic tool, if the assay proves to be relevant in predicting pathology or clinical outcome of a urogenital chlamydial infection.

We evaluated a recently introduced commercially available cHSP60 serological assay (Medac, Wedel, Germany) and determined the anti-cHSP60 responses in three well defined groups of women (1. women without tubal pathology as assessed by either HSG or laparoscopy, 2. pregnant women (unknown tubal status, proved fertility), and 3. women with confirmed tubal pathology).

CT IgG positivity was previously determined to be 19% for group 1, 40% for group 2, and 64% for group 3, showing the expected clear difference in IgG seroprevalence between women with and without procedure confirmed tubal pathology, while an intermediate prevalence was observed in pregnant women. The same pattern but with lesser incidence was observed in the anti-cHSP60 responses being 4.8%, 16%, and 27%, for groups 1–3, respectively ( $\chi^2$  test for trend:  $\chi^2=3.1$ ,  $p=0.079$ , group 1 vs. group 3:  $p=0.096$ , OR 10.6). The incidences of anti-cHSP60 were increased in the CT IgG positive subgroups to 25%, 35%, and 43%, for groups 1–3, respectively, while only 3.8% anti-cHSP60 titres were observed in the CT IgG negative subgroups, all in subgroup 2 (unknown tubal status, proved fertility). This indicates that the concordance between CT IgG and cHSP60 positivity is high, almost 90%; however, clearly a different subgroup of women is identified by the cHSP60 assay since only 40% of the CT IgG positive women has a cHSP60 response (measurement of agreement: kappa 0.371). Finally, the median cHSP60 titres increased from groups 1–3: 50, 100, and 200, respectively, suggesting an association between the level of cHSP60 response and tubal pathology.

The results presented here, although obtained in small but well defined groups, look suggestively promising. Indeed, power calculations ( $\alpha=0.5$ ,  $\beta=0.1$ ) show that doubling (1.7 times) the size of the (sub)groups would result in significant p values instead of clear trends. Therefore, further studies are needed in larger groups with different degrees of pathology due to CT infections to further determine the diagnostic, prognostic, and clinical relevance of this new assay.

### Part III Serovar

Currently, 19 different CT serovars and serovariants have been identified by sero- and genotyping. The serovars can be divided into three serogroups: the B-group (serovars B, Ba, D, Da, E, L1, L2, L2a), the intermediate group (serovars F, G, Ga) and the C-group (serovars I, Ia, J, K, C, A, H, L3). The most prevalent CT strains worldwide are serovars D, E and F. They account for approximately 70% of the typed urogenital serovars. Conjunctivitis is mainly caused by serovars A-C. In urogenital infections serovars D-K are predominantly isolated. Serovars L1-L3 can be found in the inguinal lymph nodes.

Several studies have described inconclusive data about specific serovars and the clinical course of infection, the rate of upper genital tract progression, and the clearance-persistence rate. Information about the differences in serovar distribution could give information about the epidemiology of CT infections and might have clinical implications. A recent study about serovar distribution in the Netherlands showed no significant serovar distribution shift over time, but geographical differences were observed. This could be the result of different ethnic composition.

**CHAPTER 6** relates to serovar distribution. The objective of this study is to determine the CT serovar distribution among different ethnic populations in the region The Hague in two well defined cohorts and to compare the results to previous obtained Dutch serovars distribution studies.

The overall distribution of serovars closely resembles that of found in other studies in the Netherlands. The predominance of the B-group serovars in most studies conducted in different geographic location and at different times suggests that these serovars have a biological advantage over the other serovars. Compared to the serovar distribution in the study of Spaargaren *et al.* we found significant differences in serovar H and I/Ia. An association has been found between serovar Ia and (high-risk) black race. These racial differences in serovar distribution might be due to behavioural, geographical or biological factors. It has been suggested that one of the reasons could be that there is less mixing with partners from a different race (relatively closed populations). And geographic distribution could influence the distribution of serovar Ia. Also intrinsic biological differences among persons of different race or among chlamydial serovars could influence acquisition, transmission and duration of infection (host susceptibility or immune response). In the Netherlands higher prevalences of CT infections are found in Surinam and Netherlands Antilles (NA) patients. One might compare these high risk groups with high risk black patients in American studies. We compared serogroup distributions in different ethnic groups (Dutch Caucasian (DC), Surinam, NA and Turkish/Moroccan), but no significant differences were found. Therefore, when ethnicity was taken into account no major differences were found.

Various demographic, clinical and behavioural parameters were analysed for a possible association with the infecting serogroup. For nearly all variables the serogroup distribution showed that serogroup B was most prevalent.

The clinical course of infection does not seem to be influenced much by the infecting serovar. Further studies on the differences in clinical course should include analyses of host genetic factors. Host variation might play an important role in the development of clinical disease.

**CHAPTER 7** presents the serologic responses of CT B-group serovars versus C- and I-groups.

Worldwide, serogroup B is the most prevalent followed by serogroup I. Clear differences have been observed in the duration of infection and growth kinetics between serovars from different serogroups in murine and cell culture models. Reasons for these observed differences are bacterial and host related, and are not well understood.

We determined the differences in immunoglobulin (Ig) G responses between the three serogroups in a group of patients infected with different serovars. Serovars were assessed from 235 CT positive patients and quantitative IgG responses were determined. Analyses of variance were used to compare the IgG responses between the three serogroups. Of the serovars, 46% were B group (with serovar E the most prevalent: 35.3%), 39.6% were I group and 14.3% were C group. A highly significant difference

in serologic response was shown when comparing the mean IgG concentrations (AU/mL) of patients having serovars in the most prevalent serogroup compared to the other serogroups: B = 135, C = 46 and I = 60 (B *vs.* C and B *vs.* I,  $p < 0.001$ ).

This is the first study to compare serologic IgG responses in urogenital CT infections based on serogroup. The present study demonstrates that serovars of serogroup B induce higher serologic responses than serovars of serogroups C and I. The results of this study will be included in a much larger European Union Framework study to confirm these results, to further enhance the power of the study, and enable multivariate analyses to obtain further insight into the immunopathogenesis of CT infections. This will enable risk profiling of at-risk patients to prevent development of long-term complications.

## Part IV General Discussion and Summary

In **CHAPTER 8**, the results of our two prospective-cohort studies are summarised and discussed in a broader spectrum.

Which women are at what risk for upper genital tract infection and forthcoming sequelae of CT infections? We performed epidemiological studies to identify some base-line characteristics and hopefully future studies will contribute to the identification of those at risk. Uterine instrumentation could lead to upper genital tract infection if an asymptomatic cervical infection is present, by ascending infection or by reactivation of viable microorganisms in the upper genital tract. Especially in a gynaecologic population, where these procedures are frequently performed, it is important to identify these women.

Young age, complaints of contact bleeding, being of Surinam or Netherlands Antilles origin, and living in urban areas are important risk factors for CT infections. However, it turned out to be difficult to predict the increased risk of uterine instrumentation on the development of PID. Studies describing this are often not clear on the criteria of the diagnosis of PID or the causing agent. Whether screen-and-treat or antibiotic prophylaxis for all is the best policy remains therefore still subject of debate. Since it is not ethical to do a randomised-controlled trial on this subject, the decision which policy to follow will remain up to the physician. However, we advise that when intrauterine instrumentation is performed one should screen for CT infections in women in their fertile years (both by PCR and CAT). It is important to realise that pregnancy is not a guarantee for no infection.

Nowadays, several assays can detect a CT and gonorrhoea in one sample. The role of other bacteria in the development of PID remains unclear.

In women, taking cervical swabs and urine analysis were complementary in the identification of CT positive patients. In a gynaecologic population, in which a gynaecologic examination is performed in most patients, taking cervical swabs would give the most accurate information (with regard to the uterine instrumentation), without extra effort. However, for screening purposes urine analysis alone of self-taken vaginal swabs may be more acceptable.

There seems to be more and more evidence that Chlamydia antibody testing (CAT) can replace HSG in predicting tubal factor subfertility. Laparoscopy remains however the gold standard. But CAT can help to identify those patients in which a laparoscopy is indicated. Serological markers for persistent infection, *i.e.* CT IgA, cHSP60 and high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP), are more prevalent in women with tubal pathology. Especially the combination of CAT and hs-CRP needs further exploration, but seems promising in identifying women at high risk of tubal pathology. The combination of tests for humoral and cell-mediated immune response could help to improve the tubal factor subfertility prediction model.

Although we did find some clear differences in serovar distribution as compared to previous Dutch published serovar studies, the clinical course of infection did not seem to be influenced much by the infecting serovar. Our ethnic groups were smaller than expected and therefore slightly underpowered. Since one comparison between DC and Netherlands Antilles patients was borderline significant, larger studies might reveal clearer differences.

Further studies on the differences in clinical course should include analyses of host genetic factors. Host variation might play an important role in the development of clinical disease.

Serovars of serogroup B induce higher serologic responses than serovars of serogroups C and I. The results of this study will be included in a much larger European Union Framework study to confirm these results, to further enhance the power of the study, and enable multivariate analyses to obtain further insight into the immunopathogenesis of CT infections. This will enable risk profiling of at-risk patients to prevent development of long-term complications.

Finally, some recommendations and suggestions for future research are provided.

## Nederlandse Samenvatting

Om epidemiologische risicofactoren voor *Chlamydia trachomatis* (CT) infecties te vinden en ter preventie van tubapathologie hebben wij twee prospectieve-cohort studies verricht. De resultaten worden in dit proefschrift gepresenteerd. De eerste studie werd beschreven tussen 2002 en 2004, en maakte gebruik van een goed gedefinieerd cohort van patiënten die de polikliniek Obstetrie en Gynaecologie (O&G) bezochten in het centrum van Den Haag, en beschrijft de epidemiologische gegevens van patiënten met een CT infectie.

In dezelfde populatie hebben we twee serologische tests voor het aantonen van CT antistoffen vergeleken, en hebben we de karakteristieken van een nieuw ontwikkelde test voor het aantonen van heat shock protein 60 (HSP60) antistoffen geëvalueerd en hun rol in het voorspellen van tubapathologie.

In 2007 zijn we een tweede sequentiële studie gestart op dezelfde polikliniek Obstetrie en Gynaecologie en tevens op de dichtbij gelegen regionale GGD (SOA polikliniek), om zo de doelstellingen van onze studie af te ronden.

CT infecties behoren tot de meest voorkomende seksueel overdraagbare aandoeningen in Nederland en ook wereldwijd. In Nederland lopen ca. 60.000 mensen jaarlijks een CT infectie op, waarvan 35.000 vrouwen. Bij vrouwen verloopt 70% van de infecties asymptomatisch. Echter, infecties veroorzaakt door CT kunnen tot ernstige complicaties leiden, zoals pelvic inflammatory disease (PID). Schade aan de tubae kan resulteren in (tuba factor) subfertiliteit en het krijgen van een extra-uteriene graviditeit. Bij zwangere vrouwen kan de infectie leiden tot neonatale conjunctivitis en pneumonie. De hoogste prevalentie wordt gevonden bij jonge vrouwen, en zij lopen vooral risico op complicaties. Het is onbekend waarom sommige vrouwen een asymptomatische infectie doormaken en waarom er bij anderen sprake is van een symptomatisch hogere genitale infectie. Er wordt gesuggereerd dat verschillende serovars en/of gastheerfactoren betrokken kunnen zijn bij het klinisch beloop van de infectie, de mate van opstijgende infecties en het klaren of persisteren van de infectie.

De behandeling van CT infecties is simpel en effectief, en kan late complicaties voorkomen als deze op tijd wordt gegeven. Met de ontwikkeling van technieken om CT aan te tonen in urinemonsters werden screeningsprogramma's mogelijk en screeningsprogramma's voor asymptomatische infecties worden nu op grote schaal toegepast.

Intra-uteriene ingrepen, zoals het plaatsten van een intrauterine device (IUD), hysterosalpingografie (HSG) en abortus curettage kunnen leiden tot een hogere genitale infectie als er sprake is van een asymptomatische cervicale infectie, door opstijgende infectie of door reactivatie van levensvatbare micro-organismen in het hogere genitaal. Daarom is het belangrijk om in een populatie van obstetrische en gynaecologische patiënten risicofactoren voor een infectie te bepalen.

Om de preventiestrategieën voor deze complicaties te optimaliseren, wilden we deze risicofactoren gebruiken voor onze obstetrische en gynaecologische populatie. Er is weinig bekend van de dynamiek van CT serovars en hun specifieke rol in pathogeniciteit. Inzicht in de veranderingen van serovar distributie in

verschillende etnische groepen in het verloop van tijd, in relatie tot klinische gegevens, zou verschillen in de epidemiologie kunnen verklaren en zou klinische implicatie kunnen hebben.

**HOOFDSTUK 1** geeft een overzicht van de pathogenese, het klinisch beloop en detectie methoden van CT infecties en beschrijft de doelstellingen van dit proefschrift.

## Deel I Klinische karakteristieken

In **HOOFDSTUK 2** beschrijven we de prevalentie en risicofactoren van CT infecties in een algemene polikliniek Obstetrie en Gynaecologie in Nederland.

Leeftijd was de meest belangrijke risicofactor in onze populatie (totale prevalentie van CT infecties 4.5%, bij vrouwen jonger dan 20 jaar 15.8%). Een andere risicofactor was postcoïtaaal bloedverlies. De significante verschillen tussen vrouwen van verschillende etniciteit of tussen vrouwen die verschillende anticonceptiva gebruikten konden wij niet bevestigen.

Twaalf (19.4%) patiënten met een CT infectie werden gevonden met alleen een positieve urinetest, en 15 (24.2%) met alleen de DNA-probe. In ons cohort vulden analyse van urine en van cervicale probes elkaar aan in het bepalen van de prevalentie van CT infectie bij vrouwen.

Voor een richtlijn voor het preventieve gebruik van antibiotica bij intra-uteriene ingrepen is een kosten-baten analyse nodig om de mogelijkheden van leeftijdsgebonden screening en antibiotica prophylaxe te beoordelen.

In **HOOFDSTUK 3** werpen we een nieuwe blik op de afnameplaatsen en we nemen tevens het serovar dat de infectie veroorzaakt mee in de overwegingen.

De doelstellingen van deze studie waren het bepalen van de incidentie van dubbele infectie op serovar-niveau, het bepalen van de incidentie van meerdere geïnfecteerde anatomische plaatsen CT detectie en serovar-niveau, en analyse van lokatie-specifieke serovar-distributie, om de reactie op verschillen weefsels te identificeren, met speciale aandacht voor serovar G/Ga in urogenitale versus rectale afnamen.

Bij alle vrouwelijke patiënten (polikliniek O&G en SOA polikliniek), werd door middel van de cervicale en vaginale afnamen 94.4% van de met CT geïnfecteerde patiënten gedetecteerd. Andere locaties kunnen worden verklaard door seksueel gedrag (rectum en keel).

Bij mannelijke patiënten openbaarde de urethrale afname of urine 85.9% van de met CT geïnfecteerde patiënten. Bij homo- of biseksuele mannen is het advies om ook rectale afnamen te doen om zo meer patiënten te detecteren.

De keelafname lijkt niet veel bij te dragen aan het detecteren van CT geïnfecteerde patiënten.

Afnamen van 433 patiënten (256 vrouw en 177 man) werden sequentieel verzameld en gebruikt voor CT serovar detectie en typering. Bij 11 patiënten (2.6%) vonden we dubbele serovars op één afname locatie.



Bij 62 (34.1%) vrouwen (38 van de polikliniek O&G) en bij vier (9.3%) mannen werden CT infecties op meerdere afnamelocaties gevonden. Een hoog percentage van de vrouwen die zowel op de cervicale/vaginale als rectale locatie was getest werd op beide locaties positief bevonden (36.1%, 22 van de 61). Bij mannen werd voor serovar D/Da, E, en G/Ga een significant verschil gevonden tussen urogenitale en rectale afnamen (D/Da:  $p=0.0081$ , E:  $p=0.0012$ , en G/Ga:  $p=0.0033$ ).

De prevalentie van infecties met meerdere serovars op verschillende locaties in één individu is relatief laag. Daarom is serovar analyse slechts op één van de positieve locaties voldoende. Er werden significante verschillen gevonden in serovar distributie van de rectale afnamen van homo- of biseksuele mannen met serovar G/Ga als meest prominente, wat verschil in gevoeligheid voor verschillende weefsels suggereert. Eenzelfde trend werd gevonden bij vrouwen, echter, dit haalde geen statistische significantie.

## Deel II Serologie

Er worden continu nieuwe commercieel beschikbare species-specifieke (peptide-gebaseerde) enzyme immunoassays (EIAs) ontwikkeld voor de detectie van CT antistoffen. Serologische testen zijn gebruikt voor het detecteren van antichlamydia antistoffen in het fertiliteitonderzoek, om tubapathologie te voorspellen. De waarde voor fertiliteitevaluatie blijft een onderwerp van discussie. Er bestaat een grote variatie tussen de verschillende testen in de correlatie tussen antichlamydia antistoffen en zowel een huidige CT infectie als tubapathologie.

Daarom vergelijken wij in **HOOFDSTUK 4** twee nieuwe serologische EIAs, pELISA (Medac) en Chlamydia-EIA (Biologische Analysensystem GmbH) met de microimmunofluorescentie (MIF) als de gouden standaard, om CT antistoffen te detecteren bij zwangere vrouwen, subfertiele patiënten, een controle-groep van patiënten met verschillende gynaecologische klachten en CT positieve patiënten.

Er waren geen significante verschillen in de seroprevalentiecijfers, behoudens voor de groep CT positieve patiënten ( $p<0.01$ ).

Wanneer we de subfertiliteitgroep verder bekeken, vonden we dat bij 67% van de vrouwen met door-gankelijke tubae, door geen van de testen CT IgG antistoffen werden aangetoond, terwijl bij 27% van de vrouwen met tubapathologie, geen CT IgG antistoffen werden aangetoond. Een mogelijke verklaring zou kunnen zijn dat niet bij alle patiënten met een CT infectie IgG antistoffen worden aangemaakt.

De testkarakteristieken voor de pELISA en Chlamydia-EIA werden berekend. De diagnostische nauwkeurigheid van alle testen voor het voorspellen van tubapathologie was matig. De pELISA lijkt een goed alternatief voor de MIF. Het heeft een hoge specificiteit, is makkelijker uit te voeren en goedkoper dan de MIF, en zou daarom gebruikt kunnen worden als een screeningstest.

In **HOOFDSTUK 5** richten we ons op CT heat shock protein 60 (CHSP60) antistoffen bij vrouwen met en zonder tubapathologie, gebruikmakend van een nieuwe commercieel beschikbare test.

cHSP60 testen worden in onderzoekssetting gebruikt bij het beoordelen van de serologische respons op een urogenitale CT infectie. Hoewel vergelijking tussen de verschillende 'in-house' testen moeilijk is door gebrek aan standaardisatie, is er wel consensus tussen de gebruikers van deze testen dat de anti-cHSP60 respons bij vrouwen toeneemt met de ernst van de met CT geassocieerde ziekte. Met een commercieel geproduceerde test die gebruik maakt van gedefinieerde cHSP60 epitopen zouden resultaten verkregen in verschillende laboratoria met elkaar vergeleken kunnen worden, en zou ook het gebruik van cHSP60 als een diagnostisch hulpmiddel gestimuleerd kunnen worden, als de test relevant blijkt in het voorspellen van pathologie of klinische uitkomst van een urogenitale Chlamydia infectie.

Wij evalueerden een recent geïntroduceerde commercieel beschikbare cHSP60 test (Medac, Wedel, Duitsland) en we bepaalden de anti-cHSP60 respons in drie goed gedefinieerde groepen vrouwen (1. vrouwen zonder tubapathologie bij HSG of laparoscopie, 2. zwangere vrouwen (onbekende tuba status, bewezen fertiel), en 3. vrouwen met bewezen tubapathologie).

De eerder bepaalde CT IgG positiviteit, 19% voor groep 1, 40% voor groep 2 en 64% voor groep 3, liet zoals verwacht een duidelijk verschil zien in IgG seroprevalentie tussen vrouwen met en zonder bewezen tuba pathologie, terwijl een intermediaire prevalentie werd opgemerkt bij zwangere vrouwen. Eenzelfde patroon, maar met een lagere incidentie, werd gevonden voor de anti-cHSP60 respons, te weten 4.8%, 16%, en 27%, voor groep 1-3, respectievelijk ( $\chi^2$  test voor trend:  $\chi^2=3.1$ ,  $p=0.079$ , groep 1 vs. groep 3:  $p=0.096$ , OR 10.6). De incidentie van anti-cHSP60 was toegenomen in de CT IgG positieve subgroepen tot 25%, 35%, en 43%, voor groepen 1-3, respectievelijk, terwijl slechts 3.8% anti-cHSP60 titers werd gevonden in de CT IgG negatieve subgroepen, allen in subgroep 2 (onbekende tuba status, bewezen fertiel). Dit geeft aan dat de concordantie tussen CT IgG en cHSP60 positiviteit hoog is, bijna 90%; echter, er wordt duidelijk een andere subgroep van vrouwen geïdentificeerd door de cHSP60 test omdat slechts 40% van de CT IgG positieve vrouwen een cHSP60 respons heeft (measurement of agreement: kappa 0.371). Als laatste, de mediaan cHSP60 titer neemt toe van groep 1-3: 50, 100, en 200, respectievelijk, wat een associatie tussen het niveau van de cHSP60 respons en tubapathologie suggereert.

De resultaten hier gepresenteerd, hoewel verkregen in kleine maar goed gedefinieerde groepen, lijken veelbelovend. Powerberekeningen ( $\alpha=0.5$ ,  $\beta=0.1$ ) laten zien dat het verdubbelen (1.7 keer) van de grootte van de (sub)groepen zou resulteren in significante p waarden in plaats van duidelijke trends. Verdere studies zijn nodig in grotere groepen met verschillende ernst van tubapathologie door CT infecties om de diagnostische, prognostische en klinische relevantie van deze test vast te stellen.

## Deel III Serovar

Op dit moment zijn 19 verschillende CT serovars en serovarianten geïdentificeerd door middel van sero- en genotypering. De serovars kunnen in drie serogroepen onderverdeeld worden: de B-groep (serovars B, Ba, D, Da, E, L1, L2, L2a), the intermediaire groep (serovars F, G, Ga) en the C-groep (serovars I, Ia,

J, K, C, A, H, L3). Wereldwijd komen serovars D, E en F het meest voor. Zij nemen ongeveer 70% van de getypeerde serovars voor hun rekening. Conjunctivitis wordt vooral veroorzaakt door de serovars A-C. Bij urogenitale infecties worden vooral serovars D-K geïsoleerd. De serovars L1-L3 worden vooral in de inguinale lymfeklieren gevonden.

Er worden door verschillende studies niet overtuigende gegevens beschreven over specifieke serovars en het klinisch beloop van de infectie, de mate van opstijgende infectie en het klaren of persisteren van de infectie. Verschillen in serovar-distributie zou informatie kunnen geven over de epidemiologie van CT infecties en kan klinische implicaties hebben. Een recente studie over de serovar-distributie in Nederland toonde geen distributie verschuiving in de tijd, maar er werden wel geografische verschillen gezien. Dit zou verklaard kunnen worden door verschillende etnische samenstelling.

**HOOFDSTUK 6** heeft betrekking op de serovar-distributie. De doelstelling van deze studie is om de CT serovar-distributie te bepalen in verschillende etnische populaties in de regio Den Haag, in twee goed gedefinieerde cohorten, en om deze resultaten te vergelijken met eerder verrichtte Nederlandse serovar-distributie studies.

De totale serovar-distributie lijkt erg op wat ook in andere studies is gevonden in Nederland. Het overheersen van de B-groep serovars, zoals gevonden wordt in de meeste studies, op verschillende locaties en in verschillende tijdsperioden suggereert dat deze serovars een biologisch voordeel hebben ten opzichte van andere serovars. Vergeleken met de serovar-distributie studie van Spaargaren *et al.* vonden wij significante verschillen voor serovar H en I/Ia. Er is een associatie gevonden tussen serovar Ia en (hoog risico) negroïde personen. Deze raciale verschillen zouden veroorzaakt kunnen worden door gedrags-, geografische- of biologische factoren. Er wordt gesuggereerd dat één van de redenen zou kunnen zijn dat er minder contact is met partners van een andere etniciteit (relatief gesloten gemeenschap). En de geografische verdeling zou de distributie van serovar Ia kunnen beïnvloeden. Ook intrinsieke biologische verschillen tussen personen van verschillende etniciteit of tussen verschillende serovars zouden het verkrijgen, de transmissie en de duur van de infectie (gastheer gevoeligheid of immuun respons) kunnen beïnvloeden. In Nederland worden hogere prevalenties van CT infecties gevonden bij patiënten van zowel Surinaamse als Antilliaanse herkomst. Deze groepen kunnen vergeleken worden met de hoog risico negroïde patiënten in Amerikaanse studies. Wij hebben serogroep-distributies vergeleken in verschillende etnische groepen (Dutch Caucasian (DC), Surinaams, Nederlandse Antillen (NA) en Turks/Marokkaans), maar er werden geen significante verschillen gevonden. Dus, wanneer er rekening werd gehouden met de etniciteit werden er geen grote verschillen gevonden.

Om een mogelijke associatie met een serogroep aan te tonen werden verschillende demografische-, klinische- en gedrags-parameters geanalyseerd. Voor vrijwel alle variabelen gold dat serogroep B het meest voorkomend was in de serogroep-distributie.

Het klinisch beloop van de infectie lijkt niet erg beïnvloed te worden door het infecterende serovar. Nieuwe studies over verschillen in het klinisch beloop zouden analyse van gastheer-genetische factoren

mee moeten nemen. Gastheer-variantie zou een belangrijke rol kunnen spelen in de ontwikkeling van klinische ziekte.

In **HOOFDSTUK 7** wordt de serologische respons weergegeven van de CT B-groep serovars versus de C- en I-groep.

Wereldwijd zijn de B-groep serovars het meest voorkomend, gevolgd door serogroep I. In muis en cel cultuur onderzoek worden duidelijke verschillen gevonden tussen serovars van verschillende serogroepen in de duur van de infectie en groei kinetiek. Redenen voor deze verschillen zijn bacterieel en gastheer gerelateerd, maar worden nog niet goed begrepen.

Wij hebben de verschillen in immunoglobuline (Ig) G respons bepaald tussen de drie serogroepen bij patiënten die met verschillende serovars geïnfecteerd waren. Bij 235 CT positieve patiënten werden serovars getypeerd en werd de kwantitatieve IgG respons bepaald. Variantie-analyse werd toegepast om de IgG responses tussen de drie serogroepen te vergelijken. Van alle serovars kwam 46% uit de B-groep (met serovar E als meest voorkomende: 35.3%), 39.6% uit de I-groep en 14.3% uit de C-groep. Er werd een zeer significant verschil in de serologische respons gezien wanneer de gemiddelde IgG concentraties (AU/ml) van patiënten met serovars uit de meest voorkomende serogroep werden vergeleken met andere serogroepen: B = 135, C = 46 en I = 60 (B vs. C en B vs. I,  $p < 0.001$ ).

Dit is de eerste studie die een vergelijking maakt van serologische IgG respons bij urogenitale CT infecties op basis van serogroepen. Deze studie laat zien dat de serovars van de B-groep een sterkere serologische respons induceren dan de serovars van de C- en I-groep. Het resultaat van deze studie zal geïncorporeerd worden in een grotere studie van de Europese Unie om deze resultaten te bevestigen, om de power van de studie verder te verhogen, en om multivariate analyse mogelijk te maken, om zo meer inzicht te verkrijgen in de immunopathogenese van CT infecties. Dit zal risicoprofilering mogelijk maken van risico patiënten om zo langetermijn-complicaties te voorkomen.

## Deel IV Algemene Discussie en Samenvatting

In **HOOFDSTUK 8** worden de resultaten van onze twee prospectieve-cohort studies samengevat en en bediscussieerd in een breder spectrum.

Welke vrouwen lopen welk risico op opstijgende infectie en de restverschijnselen die daardoor ontstaan? Wij hebben epidemiologische studies verricht om een aantal basiskarakteristieken te identificeren en hopelijk kunnen toekomstige studies bijdragen aan de identificatie van risicopatiënten. Intra-uteriene ingrepen kunnen leiden tot een hogere genitale infectie als er sprake is van een asymptomatische cervicale infectie, door opstijgende infectie of door reactivatie van levensvatbare micro-organismen in het hogere

genitaal. Vooral in een gynaecologische populatie, waar deze ingrepen frequent worden uitgevoerd, is het van belang deze vrouwen te identificeren.

Jonge leeftijd, klachten van postcoitaal bloedverlies, Surinaamse of Antilliaanse etniciteit en het wonen in stedelijke gebieden zijn belangrijke risicofactoren voor CT infecties. Het bleek echter moeilijk om het toegenomen risico door intra-uteriene ingrepen op het ontwikkelen van een PID te voorspellen. In studies waarin dit onderwerp beschreven wordt zijn de criteria vaak niet duidelijk waarop de diagnose PID is gesteld, of over het micro-organisme dat de infectie veroorzaakt. Of screen-and-treat of antibiotica profylaxe de beste strategie is blijft nog onderwerp van discussie. Omdat het niet ethisch verantwoord is hier een randomized-controlled trial over te doen, zal de beslissing welke strategie te volgen bepaald worden door de behandelend arts. Wij adviseren echter, om bij intra-uteriene ingrepen te screenen op CT infecties bij vrouwen in de vruchtbare leeftijd (middels PCR en CAT). Het is belangrijk om te realiseren dat zwangerschap geen garantie is voor de afwezigheid van een infectie.

Tegenwoordig kunnen door verschillende testen zowel CT als gonorrhoe in één afname bepaald worden. De rol van andere bacteriën bij de ontwikkeling van een PID blijft onduidelijk.

Bij vrouwen zijn cervix afname en urine-analyse aanvullend bij het identificeren van CT positieve patiënten. In een gynaecologische populatie, waar gynaecologisch onderzoek bij de meeste patiënten wordt verricht, geeft het afnemen van cervix kweken de meest nauwkeurige informatie (met betrekking tot intra-uteriene ingrepen), zonder extra moeite. Echter, voor screeningsdoeleinden zijn urine-analyse of zelf-afgenomen vaginale kweken meer acceptabel.

Er komt steeds meer bewijs dat chlamydia antibody testing (CAT) het HSG kan vervangen bij het voorspellen van tubapathologie. Laparoscopie blijft echter de gouden standaard. Maar CAT kan helpen bij het identificeren van die patiënten bij wie een laparoscopie geïndiceerd is. Serologische markers voor een persisterende infectie, zoals CT IgA, cHSP60 en high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP), zijn vaker aanwezig bij vrouwen met tubapathologie. Vooral de combinatie van CAT en hs-CRP dient verder onderzocht te worden, en lijkt veelbelovend bij het identificeren van vrouwen met een hoog risico op tubapathologie. De combinatie van testen voor humorale en cel-gemedieerde immuun respons zouden kunnen helpen bij het verbeteren van het tuba factor subfertiliteit predictiemodel.

Alhoewel wij enkele duidelijke verschillen vonden in serovar-distributie in vergelijking met andere Nederlandse studies, lijkt het klinisch beloop van de infectie niet erg beïnvloed te worden door het serovar dat de infectie veroorzaakt. Onze etnische groepen zijn wat kleiner dan verwacht en daardoor underpowered. Omdat één vergelijking tussen DC en Antilliaanse patiënten bijna significant was, zouden grotere studies duidelijker verschillen kunnen laten zien. Nieuwe studies over verschillen in het klinisch beloop zouden analyse van gastheer-genetische factoren mee moeten nemen. Gastheer-variantie zou een belangrijke rol kunnen spelen in de ontwikkeling van klinische ziekte.

De serovars van de B-groep induceren een sterkere serologische respons dan de serovars van de C- en I-groep. Het resultaat van deze studie zal geïncorporeerd worden in een grotere studie van de Europese Unie om deze resultaten te bevestigen, om de power van de studie verder te verhogen, en om multivariate analyse mogelijk te maken, om zo meer inzicht te verkrijgen in de immunopathogenese van CT infecties. Dit zal risicoprofilering mogelijk maken van risicopatiënten om zo langetermijn-complicaties te voorkomen.

Als laatste worden nog aanbevelingen en suggesties voor verder onderzoek gedaan.

