

·临床研究·

6种沙眼衣原体蛋白抗体在输卵管性不孕患者中的表达及检测价值

刘明娜¹, 齐蔓莉², 陈小红¹, 谭金凤³, 张丹⁴, 刘雨嫣¹, 韩建德¹, 马春光¹

(1. 中山大学附属第一医院皮肤科, 广东广州 510080; 2. 天津医科大学总医院皮肤科性病科, 天津 301500; 3. 中山大学附属第一医院妇科, 广东广州 510080; 4. 中山大学附属第一医院生殖中心, 广东广州 510080)

摘要:【目的】研究不同类型沙眼衣原体蛋白在输卵管性不孕中的致病作用, 预测具有临床检测价值的沙眼衣原体蛋白抗体。【方法】本研究共纳入输卵管性不孕组(TFI) 58例, 正常生育组(FC) 41例, 非输卵管性不孕组(IFC) 18例。血清检测CT-IgG ELISA试剂盒检测三组人群血清中CT-IgG的表达情况; 利用前期获得表达、纯化的6种沙眼衣原体蛋白, 建立这6种沙眼衣原体蛋白抗体的ELISA检测方法, 分别检测6种沙眼衣原体蛋白抗体在TFI组、FC组和IFC组血清中的表达情况; 对三组研究对象6种沙眼衣原体蛋白抗体的OD值进行统计描述, 以CT-IgG的检测结果(阳/阴)为参考标准, 绘制6种沙眼衣原体蛋白抗体的受试者工作特征曲线, 利用约登指数确定各抗体的截断值。以TFI作为参考类, 将FC、IFC分别与参考类建立两个无序多分类logistic回归模型, 探究沙眼衣原体蛋白抗体、年龄预测TFI、FC和IFC的价值, 并利用后退法筛选变量。【结果】各组研究对象CT376和CT443抗体OD值不全相同, CT-IgG阳性率不全相同。经两两比较发现, TFI组的CT376抗体OD值高于FC组(0.86 vs. 0.60, $P=0.026$)。TFI组的CT376抗体OD值高于IFC组(0.86 vs. 0.64, $P=0.026$)。IFC组CT443抗体OD值高于TFI组(0.59 vs. 0.34, $P=0.036$), 高于FC组(0.59 vs. 0.30, $P=0.02$)。经过比较, CT376抗体的阳性率在三组间不全相同($P<0.05$); 无序多分类logistic回归分析结果表明: TFI与FC建立的无序多分类logistic回归分析结果显示, CT-IgG [$P<0.001$, OR=0.084, 95%CI(0.025, 0.284)], CT376抗体 [$P=0.068$, OR=0.359, 95%CI(0.120, 1.078)]。CT-IgG是输卵管性不孕发生的独立危险因素, CT376抗体尚不能成为输卵管性不孕的独立危险因素; TFI与IFC建立的无序多分类logistic回归分析显示, 在不孕的患者中, CT-IgG [$P<0.05$, OR=0.194, 95%CI(0.046, 0.817)], CT376抗体 [$P<0.05$, OR=0.176, 95%CI(0.038, 0.818)]和CT381抗体 [$P<0.05$, OR=0.112, 95%CI(0.016, 0.796)]是输卵管性不孕发生的独立危险因素。【结论】CT376抗体在输卵管性不孕患者中的表达情况高于正常生育及非输卵管性不孕的人群, 提示CT引起的输卵管性不孕或许与CT376有关。检测CT-IgG和CT376血清抗体可能对CT引起的输卵管性不孕有预测价值。

关键词:沙眼衣原体; 输卵管性不孕; 沙眼衣原体抗体

中图分类号: R759 文献标志码: A 文章编号: 1672-3554(2023)01-0150-09

DOI: 10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ(med.sci).2023.0121

Expression and Detection Value of 6 *Chlamydia Trachomatis* Protein Antibodies in Tubal Factor Infertility

LIU Ming-na¹, QI Man-li², CHEN Xiao-hong¹, TAN Jin-feng³, ZHANG Dan⁴,
LIU Yu-yan¹, HAN Jian-de¹, MA Chun-guang¹

(1. Department of Dermatology, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; 2. Department of Dermatology, Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin 301500, China; 3. Department of Gynecology, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; 4. Center of Reproductive Medicine, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Correspondence to: MA Chun-guang, E-mail: machung@mail.sysu.edu.cn;

CHEN Xiao-hong, E-mail: chenxh2@mail.sysu.edu.cn

收稿日期: 2022-06-07

基金项目: 广州市科技计划项目(201807010081)

作者简介: 刘明娜, 硕士生, 研究方向: 沙眼衣原体感染, E-mail: liumng@mail2.sysu.edu.cn; 马春光, 通信作者, 硕士生导师, E-mail: machung@mail.sysu.edu.cn; 陈小红, 通信作者, 硕士生导师, E-mail: chenxh2@mail.sysu.edu.cn

Abstract: [Objective] To further study the pathogenic role of different types of *Chlamydia trachomatis* (CT) proteins in tubal factor infertility, evaluate the clinical detection value of *Chlamydia trachomatis* protein antibody in predicting tubal factor infertility. [Methods] A total of 58 cases of tubal factor infertility (TFI), 41 cases of fertile controls (FC) and 18 cases of infertile controls (IFC) were included. For serum detection, first, CT-IgG ELISA kit was used to detect the expression of CT-IgG in serum of three groups of people; then, 6 kinds of *Chlamydia trachomatis* proteins were expressed and purified in the early stage to establish the antibody test for these proteins, and ELISA detection method was used to detect the expression of their antibodies in the serum of TFI group, FC group and IFC group, respectively; and finally, the antibody OD value of the 6 kinds of *Chlamydia trachomatis* proteins in the three groups of subjects were statistically described, and CT-IgG was used as the reference standard to draw the receiver operating characteristic curve (ROC curve) of each CT antibody. The Youden Index determines the cutoff value for each antibody. Taking TFI as the reference class, two disordered multiple classification logistic regression models were established with the FC and IFC groups, respectively; and the reference class was used to explore the value of various antibodies and age in predicting TFI, FC and IFC of *Chlamydia trachomatis*. The back-off method was used to screen the variables. [Results] The OD value of CT376 antibody in the TFI group was higher than that in the FC group (0.86 vs. 0.60, $P=0.026$). The CT376 antibody OD value in the TFI group was higher than that in the IFC group (0.86 vs. 0.64, $P=0.026$). The CT443 antibody OD value in the IFC group was higher than that in the TFI group (0.59 vs. 0.34, $P=0.036$) and higher than that in the FC group (0.59 vs. 0.30, $P=0.02$). The multiple classification logistic regression analysis established between TFI and FC showed that CT-IgG [$P<0.001$, OR=0.084, 95%CI (0.025, 0.284)], CT376 antibody [$P=0.068$, OR=0.359, 95%CI (0.120, 1.078)]. CT-IgG is an independent risk factor for tubal infertility, and CT376 antibody cannot be an independent risk factor for tubal infertility. The multiple classification logistic regression analysis established between TFI and IFC showed that among infertile patients, CT-IgG [$P<0.05$, OR=0.194, 95%CI (0.046, 0.817)], CT376 antibody [$P<0.05$, OR=0.176, 95%CI (0.038, 0.818)] and CT381 antibody [$P<0.05$, OR=0.112, 95%CI (0.016, 0.796)] were independent risk factors for tubal infertility. [Conclusion] The expression of CT376 antibody in tubal infertility patients is higher than that in fertile and infertile controls, suggesting that CT-induced tubal factor infertility may be related to CT376. CT-IgG, and CT376 antibodies are meaningful in predicting CT-induced tubal factor infertility.

Key words: *Chlamydia trachomatis*; tubal factor infertility; *Chlamydia trachomatis* antibody

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2023, 44(1): 150-158]

生殖道沙眼衣原体(*chlamydia trachomatis*, CT)感染是常见的性传播疾病^[1-2],是世界上,特别是发展中国家数百万女性不孕不育的主要原因^[3-4]。在大部分无症状的CT持续感染患者,因其病原体载量较低,难以从生殖道和直肠中检测到病原体^[5]。既往文献提示CT抗体与输卵管性不孕症(tubal factor infertility, TFI)的相关性^[6],因此血清中的沙眼衣原体抗体的检测为诊断CT相关TFI提供了新的检测指标和诊断思路。Rodgers等^[7]筛选出TFI女性优先识别的30种CT抗原,随后发现4种抗原CT110、CT376、CT381和CT798或者2种抗原CT381和CT443联合诊断TFI的敏感性为67.7%,特异性为100%。Budrys等^[8]发现CT110、CT376、CT443和CT557联合诊断TFI的敏感性为63%,特异性为100%。基于既往文献报道,本研究选取6种沙眼衣原体蛋白,进行蛋白的表达、纯化。用ELISA方法对沙眼衣原体蛋白抗体在输卵管性不孕患者、自然受孕正常生育的产妇和输卵管通畅的非输卵管性不孕患者中的表达差异进行研究,拟筛选中国人人群中TFI的CT抗体,用来检测CT引起的输卵管性不孕,为制作新型实用型ELISA试剂盒提供理论基础。希望

能避免有创性方式诊断CT相关的输卵管性不孕。

1 材料与方法

1.1 研究对象

1.1.1 样本量计算 根据所查阅文献^[8],假设灵敏度和特异度均为0.8, $P=0.80$,容许误差 $\delta=0.2$,显著性检验水准 $\alpha=0.05$,检验水准取双侧 $Z=1.96$,将参数代入样本量算式 $n=\left(\frac{Z_{\alpha}}{\delta}\right)^2(1-P)P$,计算得到病例组和对照组各需研究对象15.3例。本项目已通过中山大学附属第一医院临床科研和实验动物伦理委员会审批(伦审[2019]230号);已获得患者知情同意。

1.1.2 入组标准 输卵管性不孕组(tubal factor infertility, TFI):选取2019年10月至2021年12月期间,我院生殖中心腹腔镜下诊断为输卵管性不孕的患者。正常生育组(fertile controls, FC):同期我院产科的产妇(自然受孕,产后1~3 d,否认既往不孕史)。非输卵管性不孕组(Infertile controls,

IFC):同期我院生殖中心经输卵管造影证实输卵管通畅的非管性不孕患者。最终本研究共纳入TFI组58例,FC组41例,IFC组18例。

1.1.3 剔除标准 TFI与FC组剔除标准:有自身免疫性疾病、凝血功能障碍、心脏、肝肾功能不全、精神疾病患者;需长期服药治疗的患者;既往有盆腔手术(阑尾炎)、子宫内膜异位症、曾输卵管结扎患者。IFC组剔除标准:有自身免疫性疾病、凝血功能障碍、心脏、肝肾功能不全、精神疾病患者;需长期服药治疗的患者;妊娠期女性。

1.2 研究方法

1.2.1 蛋白的表达与纯化 分别构建6种沙眼衣原体蛋白的表达载体,获得重组质粒GEX-4T-1-CT110、GEX-4T-1-CT376、GEX-4T-1-CT381、pGEX-4T-1-CT443、pET28a-CT557、GEX-4T-1-CT798,通过测序确定载体构建成功后,利用原核系统(大肠杆菌)完成对6种沙眼衣原体蛋白的表达。根据目标蛋白所带纯化标签(GST标签/NusA-His标签/His-GST标签),使用如下两种洗脱方式中的一种:使用GST亲和层析柱结合上清中目标蛋白,使用GSH洗脱目标蛋白;使用Ni亲和层析柱结合上清中目标蛋白,使用咪唑洗脱目标蛋白。纯化后的蛋白经过SDS-PAGE电泳和考马斯亮蓝染色后,均可看到清晰的目的条带。经过UV OD280测量蛋白浓度。表达载体的构建及纯化蛋白的获取由北京义翘科技公司辅助完成。

1.2.2 血清标本的收集 收集符合入选标准的TFI组、FC组和IFC组患者的外周静脉血标本,在1 500×g条件下离心10 min获取血清,置-80℃低温冰箱保存。同时记录各组研究对象的年龄资料。

1.2.3 实验试剂 EIA3461 Chlamydia trachomatis IgG ELISA:德国DRG Instruments GmbH。谷胱甘肽包被的ELISA96孔酶标板:美国Pierce公司;ELISA套装(含ELISA通用稀释液/TMB底物/浓缩洗涤液/显色终止液/封板胶纸/封闭液/包被液):北京索莱宝科技有限公司;辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗人IgG:北京博奥森生物技术有限公司。

1.2.4 CT-IgG ELISA试剂盒检测血清 实验步骤见参考文献[9]。

1.2.5 ELISA方法检测血清中6种抗沙眼衣原体蛋白抗体 洗涤酶标板:谷胱甘肽包被的ELISA 96孔酶标板,每孔加入200 μL Wash Buffer洗涤3次。洗板要求:每次静置3 min后充分弃去孔内洗液,可倒置酶标板在洁净的吸水纸上吸干残余液体。包被:将前述纯化成功的沙眼衣原体蛋白用包被液稀释至蛋白含量为0.5 μg/mL后,每孔加入100 μL稀释蛋白液,封口膜封板,放入湿盒中4℃过夜。洗涤:次日,充分弃去沙眼衣原体蛋白,洗板3次。封闭:每孔加入100 μL封闭液,室温(20~25)℃孵育1 h。稀释血清样品:用通用稀释液按1:5 000的比例稀释每个血清样品,混匀,室温下停留15 min,使用前再次混匀。洗涤:弃去封闭液,洗板3次。加一抗:将100 μL稀释后的待测血清加入相应孔中,室温孵育1.5 h。每个样品均设一个复孔。每个酶标板均设2个空白孔。洗涤:充分弃去前一步骤加入的样品,洗

板3次。加入酶标二抗:按商业化酶标抗体推荐比例,用通用稀释液按1:5 000稀释HRP标记的羊抗人IgG,每孔加入100 μL稀释后的酶标抗体,室温孵育0.5 h。洗涤:充分弃去酶标二抗,洗板3次。显色反应:每孔加入100 μL TMB显色底物,室温避光孵育17 min。终止反应:每孔加入终止液100 μL,混匀后立即(5 min之内)用酶标仪读取450 nm波长的光学密度值(OD值)。结果处理:每个酶标板空白孔OD450值的均数m,每个血清样品OD450值取均数为每个血清样品减去背景后最终的OD值。

1.3 统计方法

计量资料符合正态分布的用均数±标准差表示,不符合正态分布则用 $M(P_{25} \sim P_{75})$ 表示,计数资料利用频数和百分比描述。分类资料组间比较采用 χ^2 检验或Fisher's确切概率法,采用多组秩和检验比较三组各抗体OD值,采用Bonferroni法进行各组抗体OD值的两两比较,各抗体的OD值使用箱式图进行展示。

以CT-IgG为参考标准,绘制CT各抗体的受试者工作特征曲线(ROC曲线),以约登指数(Youden指数)确定各抗体的截断值(cut-off值),计算各阈值下抗体的灵敏度、特异度、曲线下面积(area under the curve, AUC)。以各抗体的截断值划分研究对象各抗体检测结果,低于界值为阴性,反之为阳性,并以热图展示各组的检测结果。为探究预测输卵管性不孕的因素,以TFI作为参考类,将FC、IFC分别与其相比,建立两个无序多分类logistic回归模型,年龄、CT各抗体以二分类变量的形式作为自变量纳入模型,并利用后退法筛选变量,利用森林图展示回归所得的OR值。所有统计分析由R 4.1.2完成,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 重组质粒测序和BLAST比对

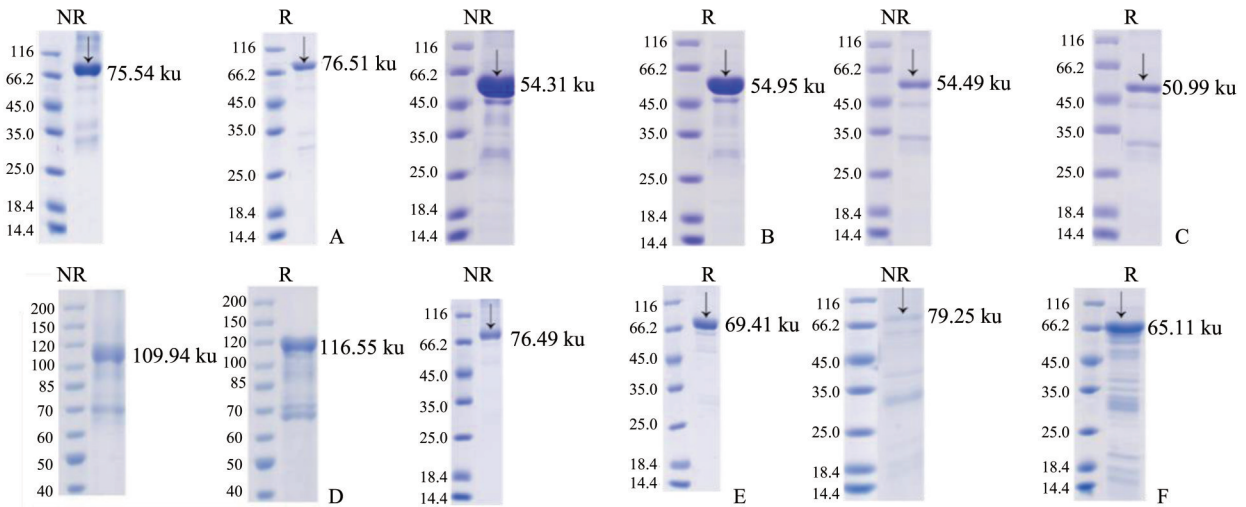
将表达载体所表达的蛋白质的氨基酸序列在NCBI中GenBank数据库的BLAST工具(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)进行比对分析,比对一致度均为100%。

2.2 重组蛋白的纯化

纯化后的GST-CT110、GST-CT376、GST-CT381、NusA-His-3C-CT443、His-GST-CT557、GST-CT798经过SDS-PAGE电泳和考马斯亮蓝染色后,均可看到清晰的目的条带(图1)。

2.3 年龄、CT-IgG抗体的检测情况及6种沙眼衣原体蛋白抗体的检测情况

117例研究对象年龄最大者44岁,最小者24岁。对三组研究对象的年龄进行组间比较,各组间的年龄差异无统计学意义($P>0.05$,表1)。对三组研究对象的CT-IgG的检测结果进行比较,CT-IgG阳性率在各组间不全相同($P<0.001$)。对三组研究对象的6种沙眼衣原体蛋白抗体的OD值进行比较,CT376抗体OD值在三组间不全相同($P<0.05$);CT443抗体OD值在三组间不全相同($P<0.05$)。



A: GST-CT110 purification result; B: GST-CT376 purification result; C: GST-CT381 purification result; D: NusA-His-3C-CT443 purification result; E: His-GST-CT557 purification result; F: GST-CT798 purification result; NR stands for non-reducing SDS-PAGE electrophoresis, R stands for reducing SDS-PAGE electrophoresis.

图1 6种沙眼衣原体蛋白纯化结果

Fig. 1 Six kinds of Chlamydia trachomatis protein purification results

表1 年龄资料、CT-IgG 检测结果及6种沙眼衣原体蛋白抗体检测结果

Table 1 Age data, CT-IgG test results, six kinds of Chlamydia trachomatis protein antibody test results

Variables	Groups			F/ χ^2 /H	P
	TFI(n=58)	FC(n=41)	IFC(n=18)		
Age/years	31.74±4.50	32.24±4.18	31.67±3.52	0.201	0.818
CT-IgG ¹⁾	33(56.9)	5(12.2)	5(27.8)	21.386	<0.001
CT110 ²⁾	0.40(0.21~0.67)	0.34(0.20~0.48)	0.42(0.21~0.67)	3.444	0.179
CT376 ²⁾	0.86(0.61~1.24)	0.60(0.36~0.90)	0.64(0.40~0.76)	10.530	0.005
CT381 ²⁾	0.65(0.42~1.00)	0.56(0.32~0.90)	0.45(0.25~0.70)	4.413	0.110
CT443 ²⁾	0.34(0.22~0.60)	0.30(0.23~0.52)	0.59(0.38~0.71)	7.939	0.019
CT557 ²⁾	0.49(0.34~0.70)	0.40(0.28~0.72)	0.48(0.25~0.62)	0.296	0.862
CT798 ²⁾	0.40(0.26~0.63)	0.44(0.24~0.76)	0.37(0.17~0.59)	1.683	0.431

¹⁾ CT-IgG results are expressed as positive number (positive rate); ²⁾ The result of 6 kinds of Chlamydia trachomatis protein antibodies were expressed as the median of OD value.

随后对6种沙眼衣原体蛋白的抗体OD值进行组间两两比较。TFI组CT376抗体OD值高于FC组(0.86 vs. 0.60, P=0.026),高于IFC组(0.86 vs. 0.64, P=0.026)。IFC组CT443抗体OD值高于TFI组(0.59 vs. 0.34, P=0.036),高于FC组(0.59 vs. 0.30, P=0.02)。

2.4 6种沙眼衣原体蛋白抗体的截断值

通过ROC曲线分析(图2),利用约登指数可得出各CT蛋白抗体OD值的截断值(表2)。CT110的截断值为0.353,灵敏度和特异度分别达到81.4%和56.8%;CT376的截断值为0.798,灵敏度和特异度分别达到53.5%及63.5%;CT381的截断值为0.388,灵敏度和特异度分别达

到88.4%及39.2%;CT443的截断值为0.563,灵敏度和特异度分别达到37.2%及77.0%;CT557的截断值为0.385,灵敏度和特异度分别达到72.1%及43.2%;CT798的截断值为0.122,灵敏度和特异度分别达到100%及12.2%。

2.5 TFI、FC和IFC患者血清中6种沙眼衣原体蛋白抗体的表达情况

通过CT110、CT381、CT376、CT443、CT557、CT798抗体的截断值,对TFI组、FC组及IFC组各抗体检测的OD值划分阴阳性(表3)。

由表4可见TFI组、FC组、IFC组三组的CT110、CT376、CT381、CT443、CT557和CT798抗体阳性率。随后用多组构

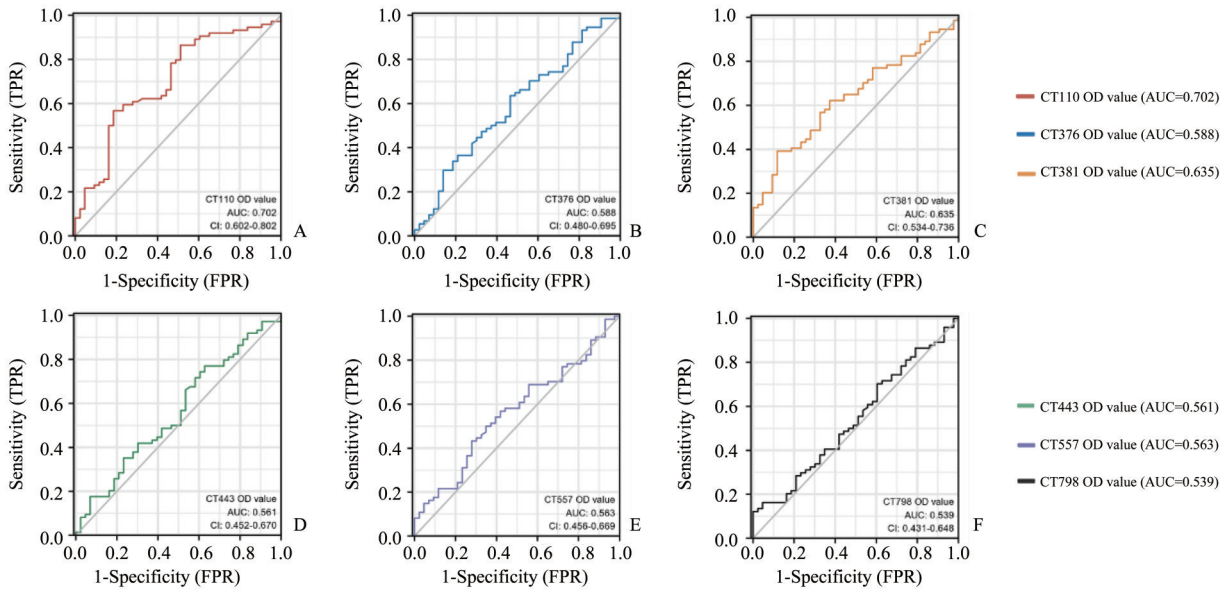


图2 ROC曲线分析法确定各沙眼衣原体蛋白抗体的截断值

Fig. 2 ROC curve analysis for each Chlamydia trachomatis protein antibody

表2 各沙眼衣原体蛋白抗体 OD 值的截断值

Table 2 The cutoff value of the OD value of each Chlamydia trachomatis protein antibody

Antibody	cutoff ¹⁾	Sensitivity	Specificity	Youden index	AUC ²⁾
CT110	0.353	0.814	0.568	0.135	0.702
CT376	0.798	0.535	0.635	0.270	0.588
CT381	0.388	0.884	0.392	-0.216	0.635
CT443	0.563	0.372	0.770	-0.540	0.561
CT557	0.385	0.721	0.432	-0.135	0.563
CT798	0.122	1.000	0.122	-0.757	0.539

¹⁾cutoff: By drawing the receiver operating characteristic curve, the cutoff corresponding to the highest Youden index is the cutoff of the positive and negative test results of the Chlamydia trachomatis protein antibody. ²⁾AUC: Area under the receiver operating curve.

成比的 χ^2 检验对TFI组、FC组及IFC组的6种沙眼衣原体蛋白抗体阳性率进行比较。如表4所示,CT376抗体的阳性率在三组间不全相同($P=0.018$)。

2.6 预测输卵管性不孕患者具有临床检测价值的沙眼衣原体蛋白抗体

以TFI为参考类,分别和IFC、FC建立无序多分类logistic回归分析(后退法)进行分析。

如表5所示,在TFI vs. FC的全模型中,CT-IgG的OR=0.085 [95%CI=(0.025, 0.291), $P<0.001$],说明CT-IgG阳性者更可能是TFI。在TFI vs IFC的全模型中,CT-IgG、CT110、CT376、CT381及CT443的OR分别为0.194 [95%CI=(0.046, 0.821), $P=0.026$]、9.925 [95%CI=(1.195, 82.396), $P=0.034$]、0.188 [95%CI=(0.040, 0.875), $P=0.033$]、0.140 [95%CI=(0.020, 1.001), $P=0.05$]及4.83 [95%CI=(1.104,

21.141), $P=0.037$]。通过逐步后退法筛选变量。

在TFI vs. FC的逐步回归模型中,CT-IgG有统计学意义(表6, $P<0.001$), OR=0.084 [95%CI=(0.025, 0.284)], CT-IgG阳性者更可能发生TFI,可能性是CT-IgG阴性者的11.905倍(1/0.084); CT376抗体OR=0.359 [95%CI=(0.1201, 0.78)], CT376抗体阳性者发生TFI的可能性更大,可能性是CT376抗体阴性者的2.786倍(1/0.359, $P=0.068$)。

CT-IgG是输卵管性不孕发生的独立危险因素,CT376抗体尚不能成为输卵管性不孕的独立危险因素。

在TFI vs. IFC的逐步回归模型中,在不孕的患者当中,CT-IgG有统计学意义(表7, $P<0.05$), OR=0.194 [95%CI=(0.046, 0.817)], CT-IgG阳性者更可能发生TFI,可能性是CT-IgG阴性者的5.155倍(1/0.194); CT376抗体有统计学意义($P<0.05$), OR=0.176 [95%CI=(0.038, 0.818)], CT376抗体阳性者更可能发生TFI,可能性是CT376抗体阴性者的

表3 各组研究对象的沙眼衣原体蛋白抗体检测结果

Table 3 The detection results of Chlamydia trachomatis protein antibody in each group of subjects

Antibody	CT-IgG	CT110	CT376	CT381	CT443	CT798	CT557
TFI							
Total	58	58	58	58	58	58	58
Positive	33	36	32	46	16	56	39
FC							
Total	41	41	41	41	41	41	41
Positive	5	19	14	28	8	35	23
IFC							
Total	18	18	18	18	18	18	18
Positive	5	12	4	9	9	17	11

表4 沙眼衣原体蛋白抗体在各组间的检测结果及多组构成比的卡方检验结果

Table 4 Detection results of chlamydia trachomatis protein antibody in each group and chi-square test results of multi-group composition ratio [n(%)]

Antibody		Groups			χ^2	P
		TFI	FC	IFC		
CT110	Positive	36(62.1)	19(46.3)	12(66.7)	3.196	0.202
	Negative	22(37.9)	22(53.7)	6(33.3)		
CT376	Positive	32(55.2)	14(34.1)	4(22.2)	7.997	0.018
	Negative	26(44.8)	27(65.9)	14(77.8)		
CT381	Positive	46(79.3)	28(68.3)	9(50)	5.939	0.051
	Negative	12(20.6)	13(31.7)	9(50)		
CT443	Positive	16(27.6)	8(19.5)	9(50)	5.763	0.056
	Negative	42(72.4)	33(80.5)	9(50)		
CT557	Positive	39(67.2)	23(56.1)	11(61.1)	1.286	0.526
	Negative	19(32.8)	18(43.9)	7(38.9)		
CT798	Positive	56(96.6)	35(85.4)	17(94)	4.370	0.113
	Negative	2(3.4)	6(14.6)	1(5.5)		

5.682倍(1/0.176);CT381抗体有统计学意义($P<0.05$),OR为0.112[95%CI=(0.016,0.796)],CT381抗体阳性者更可能发生TFI,可能性是CT381抗体阴性者的8.929倍(1/0.112)。CT110抗体有统计学意义($P<0.05$),OR=10.239 [95%CI=(1.419,73.877)],CT110抗体阳性者更可能发生IFC,可能性是CT110抗体阴性者的10.239倍;CT443抗体有统计学意义($P<0.05$),OR=4.749 [95%CI=(1.119,20.157)],CT443抗体阳性者更可能发生IFC,可能性是CT443抗体阴性者的4.749倍。

在不孕的人群当中,CT-IgG、CT376抗体及CT381抗体是输卵管性不孕发生的独立危险因素。

3 讨论

3.1 沙眼衣原体的血清学检测方法

女性生殖道沙眼衣原体感染多发生在年龄小于25岁^[10-11],而30岁之后才对不孕症评估^[12]。从生殖道沙眼衣原体感染到其慢性后遗症(如输卵管性不孕)的发生需要一定时间,此时体内CT已被清除或在体内持续存在,不一定在生殖道,或者病原体载量很低。通过一般的病原体检测方法很难在泌尿生殖道检测到沙眼衣原体,血清学诊断可以说是确定CT既往感染的唯一方法^[13]。所以血清学诊断虽然因敏感性不够理想而不推荐用于CT感染的诊断,但对

表5 输卵管性不孕的无序多分类 logistic 回归的全模型

Table 5 A full model of unordered multiclass logistic regression for tubal infertility

Model	Variables	b	S_b	Wald χ^2	P	\widehat{OR}	OR 95%CI
FC	Constant terms	1.444	0.878	2.706	0.100		
	CT-IgG	-2.466	0.629	15.377	<0.001	0.085	(0.025, 0.291)
	CT110	0.741	0.704	1.107	0.293	2.098	(0.528, 8.344)
	CT376	-0.966	0.583	2.743	0.098	0.380	(0.121, 1.194)
	CT381	0.638	0.705	0.819	0.365	1.893	(0.475, 7.538)
	CT443	-0.134	0.634	0.045	0.832	0.874	(0.253, 3.028)
	CT798	-1.314	1.000	1.728	0.189	0.269	(0.038, 1.906)
	CT557	-0.201	0.601	0.112	0.738	0.818	(0.252, 2.659)
	Age	-0.396	0.556	0.507	0.477	0.673	(0.227, 2.001)
IFC	Constant terms	-0.433	1.298	0.111	0.739		
	CT-IgG	-1.642	0.737	4.962	0.026	0.194	(0.046, 0.821)
	CT110	2.295	1.080	4.517	0.034	9.925	(1.195, 82.396)
	CT376	-1.674	0.786	4.540	0.033	0.188	(0.040, 0.875)
	CT381	-1.963	1.002	3.837	0.050	0.140	(0.020, 1.001)
	CT443	1.575	0.753	4.372	0.037	4.830	(1.104, 21.141)
	CT798	-0.062	1.403	0.002	0.965	0.940	(0.06, 14.721)
	CT557	-0.309	0.870	0.126	0.723	0.734	(0.133, 4.041)
	Age	0.036	0.753	0.002	0.962	1.036	(0.237, 4.538)

表6 TFI与FC建立的无序多分类 logistic 逐步回归模型

Table 6 Unordered multi-class logistic regression model established by TFI and FC

Model	Variables	b	S_b	Wald χ^2	P	\widehat{OR}	OR 95%CI
FC	Constant terms	0.440	0.433	1.033	0.309		
	CT-IgG	-2.476	0.622	15.866	<0.001	0.084	(0.025, 0.284)
	CT110	0.644	0.670	0.925	0.336	1.904	(0.513, 7.075)
	CT376	-1.024	0.561	3.332	0.068	0.359	(0.120, 1.078)
	CT381	0.166	0.620	0.072	0.789	1.181	(0.350, 3.982)
	CT443	-0.132	0.617	0.046	0.831	0.876	(0.261, 2.938)

表7 TFI与IFC建立的无序多分类 logistic 逐步回归模型

Table 7 Unordered multi-class logistic stepwise model established by TFI and IFC

Model	Variables	b	S_b	Wald χ^2	P	\widehat{OR}	OR 95%CI
IFC	Constant terms	-0.529	0.545	0.945	0.331		
	CT-IgG	-1.638	0.733	4.995	0.025	0.194	(0.046, 0.817)
	CT110	2.326	1.008	5.322	0.021	10.239	(1.419, 73.877)
	CT376	-1.737	0.783	4.914	0.027	0.176	(0.038, 0.818)
	CT381	-2.188	1.000	4.788	0.029	0.112	(0.016, 0.796)
	CT443	1.558	0.738	4.463	0.035	4.749	(1.119, 20.157)

输卵管因素不孕的患者除外^[14]。

沙眼衣原体微量免疫荧光法(MIF)曾被认为是沙眼衣原体感染血清学诊断的金标准,但MIF结果的读取受主观因素的影响^[15],而且敏感性和特异性具有负面的影响,不利于在临床上使用^[16]。后来沙眼衣原体特定人工合成多肽的酶联免疫吸附测定法(ELISA)取代了MIF法^[4, 8, 17]。尼日利亚有研究者^[18]使用本研究所用CT-IgG ELISA试剂盒作为既往感染过CT的标志,认为输卵管性不孕妇女输卵管梗阻的病因可能是以前感染过CT,并建议将沙眼衣原体抗体的检测作为一种常规筛查手段,用于从人群中筛查出不孕的高危人群,再进一步进行相关诊疗。

3.2 TFI、FC和IFC血清中6种沙眼衣原体蛋白抗体的表达情况

对三组研究对象的6种沙眼衣原体蛋白抗体的OD值进行比较,可认为CT376抗体OD值及CT443抗体OD值在三组间不全相同, $P < 0.05$ 。随后的组间两两比较发现,TFI组CT376抗体OD值高于FC组及IFC组,差异有统计学意义;TFI组CT443抗体OD值低于IFC组,差异有统计学意义。既往研究表明,与正常生育女性^[8]及非输卵管性不孕女性^[7]相比,CT376是输卵管性不孕患者血清优先识别的抗原。本次实验中,CT376抗体滴度TFI组高于FC组,高于IFC组。

本研究的结果提示CT376或许可以成为血清学检测CT引起输卵管性不孕的一个潜在的抗原。但CT376抗体在CT急性感染和慢性并发症的发生过程中的变化情况尚不明确,具体作用机制尚需进一步探讨。

3.3 探讨对预测输卵管性不孕患者具有临床检测价值的沙眼衣原体蛋白抗体

在TFI与IFC建立的无序多分类logistic逐步回归分析中,在不孕患者中,CT-IgG、CT376抗体、CT381抗体为阳性结果时提示为TFI的可能性更大。先前的研究表明与无输卵管性不孕者相比,输卵管性不孕患者CT-IgG抗体的滴度及阳性率更高^[6, 19],Rodgers^[7],Budrys^[8]等研究表明,CT110、CT376、CT381、CT443、CT557、CT798等沙眼衣原体蛋白是可以优先识别TFI的沙眼衣原体抗原。本研究中CT-IgG为阳性结果时更可能发生TFI,与先前研究一致。本研究发

CT376抗体、CT381抗体为阳性结果时提示为TFI的可能性更大。

我们推测,CT-IgG、CT376抗体及CT381抗体可能在CT引起的不孕中,介导了输卵管病变过程的发生,提示CT引起的输卵管性不孕或许与CT-IgG、CT376及CT381有关。CT-IgG、CT376抗体及CT381抗体为阳性结果时对预测CT引起的输卵管性不孕有统计学意义。其对诊断CT引起的输卵管性不孕的应用及指导价值有待后期大样本进一步探讨。

在不孕患者当中,CT110抗体、CT443抗体为阳性结果时提示为IFC的可能性更大。IFC组CT443抗体OD值高于TFI组,高于FC组,差异有统计学意义,提示CT443也许可用于预测非输卵管性不孕。

在没有输卵管病变的情况下,生殖道沙眼衣原体感染也可能损害生育能力^[20]。2011年Coppus等^[21]的一项前瞻性研究表明,对经输卵管造影或腹腔镜诊断为输卵管通畅的非输卵管性不孕女性随后的随访中发现,CT-IgG抗体阳性的非输卵管性不孕女性怀孕的机会比CT-IgG抗体阴性的女性低。2015年Steiner等^[22]的研究表明,沙眼衣原体的抗体亚型IgG3抗体阳性降低了妊娠和活产的可能性,并增加了输卵管通畅的不孕妇女异位妊娠的风险。说明CT感染也可能导致非输卵管性不孕的发生。

我们推测CT110抗体及CT443抗体介导的免疫反应,或许更可能对子宫内膜有不利影响,导致宫腔环境的改变等引起非输卵管性不孕。

本实验发现CT376抗体在TFI中的表达高于FC组及IFC组。CT376抗体阳性时,发生TFI的可能性更大。这提示CT引起的TFI或许与CT376有关。同时CT-IgG阳性时发生TFI的可能性更大,这提示血清学检测CT-IgG与CT376抗体,可能会成为TFI的潜在生物学标志。

血清学作为一种在大多数医疗机构都能使用的简单、便宜、侵入性小的方法,或许可以成为不孕女性的常规筛查手段,甚至代替输卵管造影来评估输卵管病变的风险,将不孕女性分为发生输卵管性不孕的低危人群和高危人群,高危人群再进一步通过腹腔镜等有创操作诊断CT相关的输卵管性不孕。

参考文献

- [1] de la Maza LM, Zhong G, Brunham RC. Update on Chlamydia trachomatis vaccinology [J]. Clin Vaccine Immunol, 2017, 24(4): e00543-16.
- [2] 杨晗, 陈文娟, 赵江红, 等. 中期妊娠引产706例患者性传播疾病和阴道感染状况分析[J]. 广东医学, 2018, 39(S2): 156-158.
Yang H, Chen WJ, Zhao JH, et al. Analysis of sexual-
- [3] Rowley J, Vander Hoorn S, Korenromp E, et al. Chlamydia, gonorrhoea, trichomoniasis and syphilis: global prevalence and incidence estimates, 2016[J]. Bulletin of the World Health Organization, 2019, 97(8): ly transmitted diseases and vaginal infections in 706 cases of mid term pregnancy induced labor [J]. J Guangdong, 2018, 39(S2): 156-158.

- 548-562P.
- [4] Mahmud NU. Incidence of genital Chlamydia trachomatis infection in sexually active women attending the Mymensingh Medical College Hospital [D]. Bangladesh: Department of Microbiology Mymensingh Medical College Mymensingh, 2010.
- [5] 徐天程, 陈建林, 施晓波. 沙眼衣原体泌尿生殖道感染的实验室诊断研究进展 [J]. 临床检验杂志, 2019, 37(4): 293-296.
Xu TC, Chen JL, Shi XB. Chlamydia trachomatis research progress of laboratory diagnosis of urinary tract infection [J]. J Clin Exam, 2019, 5 (4): 293-296.
- [6] Horner PJ, Anyalechi GE, Geisler WM. What can serology tell us about the burden of infertility in women caused by Chlamydia? [J]. J Infect Dis, 2021, 224(12 Suppl 2): S80-S85.
- [7] Rodgers AK, Budrys NM, Gong S, et al. Genome-wide identification of Chlamydia trachomatis antigens associated with tubal factor infertility [J]. Fertil Steril, 2011, 96(3): 715-721.
- [8] Budrys NM, Gong S, Rodgers AK, et al. Chlamydia trachomatis antigens recognized in women with tubal factor infertility, normal fertility, and acute infection [J]. Obstet Gynecol, 2012, 119(5): 1009-1016.
- [9] Chlamydia trachomatis IgG ELISA [Z]. https://www.ibl-international.com/media/mageworx/downloads/attachment/file/r/e/re57011_ifu_eu_multi_chlamydia_trachomatis_igg_elisa_vn-2018-05-16.pdf
- [10] Centers for Disease Control and Prevention. Sexually Transmitted Disease Surveillance 2019 [M/OL]. Atlanta: U. S. Department of Health and Human Services, 2021 (2022-04-05) [2022-06-06]. <https://www.cdc.gov/std/chlamydia/stdfact-chlamydia-detailed.htm>
- [11] 岳晓丽, 龚向东, 李婧, 等. 2015—2019年中国性病监测点生殖道沙眼衣原体感染流行病学特征 [J]. 中华皮肤科杂志, 2020, 53(8): 596-601.
Yue XL, Gong XD, Li J, et al. Epidemiologic features of genital Chlamydia trachomatis infection at national sexually transmitted disease surveillance sites in China, 2015—2019 [J]. Chin J Dermatol, 2020, 53(8): 596-601.
- [12] Kessler LM, Craig BM, Plosker SM, et al. Infertility evaluation and treatment among women in the United States [J]. Fertil Steril, 2013, 100(4): 1025-1032.
- [13] Woodhall SC, Gorwitz RJ, Migchelsen SJ, et al. Advancing the public health applications of Chlamydia trachomatis serology [J]. Lancet Infect Dis, 2018, 18(12): e399-e407.
- [14] Chernesky MA. The laboratory diagnosis of Chlamydia trachomatis infections [J]. Can J Infect Dis Med Microbiol, 2005, 16(1): 39-44.
- [15] Wang SP, Grayston JT. Human serology in Chlamydia trachomatis infection with microimmunofluorescence [J]. J Infect Dis, 1974, 130(4): 388-397.
- [16] Saadouni A, Tbai N, Takourt B. Comparison of two techniques for serological diagnosis of chlamydial infections: MIF and immunoblotting [J]. Ann Biol Clin (Paris), 2013, 71(6): 663-666.
- [17] Johnson AM, Horner P. A new role for Chlamydia trachomatis serology? [J]. Sex Transm Infect, 2008, 84(2): 79-80.
- [18] Emmanuel F. Serum levels of anti-Chlamydial antibody in fertile and infertile women in selected health institutions in Ios [D]. Emmanuel Jos University Teaching Hospital, 2015.
- [19] den Hartog JE, Land JA, Stassen FRM, et al. Serological markers of persistent C. trachomatis infections in women with tubal factor subfertility [J]. Hum Reprod, 2005, 20(4): 986-990.
- [20] Horner PJ, Flanagan H, Horne AW. Is there a hidden burden of disease as a result of epigenetic epithelial-to-mesenchymal transition following chlamydia trachomatis genital tract infection? [J]. J Infect Dis, 2021, 224(12 Suppl 2): S128-S136.
- [21] Coppus SFPJ, Land JA, Opmeer BC, et al. Chlamydia trachomatis IgG seropositivity is associated with lower natural conception rates in ovulatory subfertile women without visible tubal pathology [J]. Hum Reprod, 2011, 26(11): 3061-3067.
- [22] Steiner AZ, Diamond MP, Legro RS, et al. Chlamydia trachomatis immunoglobulin G3 seropositivity is a predictor of reproductive outcomes in infertile women with patent fallopian tubes [J]. Fertil Steril, 2015, 104(6): 1522-1526.