

Chlamydia trachomatis e suas implicações na reprodução humana

The effects of *Chlamydia trachomatis* on human reproduction

RIALA6/1398

Antonio Sérgio VALLADÃO¹, Carolina Marques da Silva Procópio COSTA², Jocelito Alves de CAMARGO², Veronica Cristina Gomes SOARES^{3*}

*Endereço para correspondência: ¹ Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, UNESP/SP. Filiação Associação Instituto Sapiientiae de Reprodução Humana. Rua 18 de junho, 248, Jardim Morumbi, Jundiaí-SP CEP: 13209-260. Fone: (11) 8262-7196. E-mail: vcgsoares@gmail.com

² Biomedicina Universidade Paulista - UNIP Campus Jundiaí-SP.

³ Instituto de Biologia em Biologia Funcional e Molecular – Unicamp/SP. Biomedicina e Farmácia da Universidade Paulista – UNIP - Campus Jundiaí-SP.

Recebido: 21.05.2011 - Aceito para publicação: 21.10.2011

RESUMO

Chlamydia trachomatis é um parasita intracelular obrigatório e tem sido considerado como um dos problemas para a reprodução humana. Para o presente estudo, foi realizada uma busca referente aos principais fatores relacionados à infertilidade ou falhas em técnicas de reprodução assistida em virtude da infecção aguda ou crônica causada pela clamídia. Trata-se de uma revisão por levantamento retrospectivo de artigos científicos publicados nas últimas duas décadas (1984 - 2011). A maioria das infecções por clamídia em mulheres é assintomática e a infecção persistente pode ocasionar danos às tubas uterinas, infertilidade, parto prematuro, conjuntivites no recém-nascido, doença inflamatória pélvica e endometrite pós-parto. Na infecção em seres humanos por *C. trachomatis*, as proteínas expressas da família HSP60 (Chsp60) são reconhecidas como antígenos. HSP60 são também proteínas expressas pelo zigoto de mamíferos após a fertilização; portanto, nas mulheres com imunidade pré-existente induzida pelo Chsp60 pode ocorrer resposta imunológica secundária nos estágios iniciais da gravidez. O levantamento bibliográfico evidenciou a carência de artigos que comprovem que a falha de fertilização *in vitro* seja causada pela infecção por *C. trachomatis*.

Palavras-chave. *Chlamydia trachomatis*, infertilidade, FIV, reprodução humana, infecção genital.

ABSTRACT

Chlamydia trachomatis is an obligate intracellular parasite, which is believed to be one of the agents that cause problems in human reproduction. The aim of this bibliographical review was to search the main factors correlated with infertility or failure in the *in vitro* reproduction technique due to acute or chronic infections with *Ct*. This retrospective review was performed on scientific articles published during the last two decades (from 1984 to 2011). Chlamydia infections in women are mostly asymptomatic, and a persistent infection may increase the risk of injuring the fallopian tubes, causing infertility, premature birth, newborn conjunctivitis, pelvic inflammatory disease, and postpartum endometritis. *C. trachomatis* express HSP60 family proteins (Chsp60), and human recognize them as antigens. The HSP60 are also proteins expressed by mammal zygote after fertilization; consequently, women who had previously exposed to Chsp60 antigen, a secondary immune response might be produced in the early stages of pregnancy. This investigation showed a lack of papers which evidence the potencial role of *C. trachomatis* infection *in vitro* fertilization failure, and also of the controversies on the best diagnostic methodologies and treatment protocols.

Keywords. *Chlamydia trachomatis*, infertility, IVE, human reproduction, genital infection.

INTRODUÇÃO

Chlamydia trachomatis é o micro-organismo sexualmente transmissível de maior frequência nos países desenvolvidos e está relacionado como um dos maiores problemas para a reprodução humana¹.

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), em algumas partes do mundo desenvolvido, mais de 90% da população está infectada. Apesar dos esforços de controle de longa data, a estimativa é de que mais de 500 milhões de pessoas estejam em alto risco de infecção, mais de 140 milhões de pessoas já estão infectadas e, em torno de 6 milhões desenvolveram cegueira na África, Oriente Médio, Ásia e alguns países da América Latina como consequência direta da infecção².

A *C. trachomatis* é uma bactéria intracelular obrigatória classificada como coco Gram-negativo, com genoma de aproximadamente um milhão de pares de bases e com capacidade de codificar mais de 600 proteínas. Foram descritos 18 sorotipos distintos, sendo os responsáveis por infecções do trato genital os sorotipos D e K1.

O ciclo celular clamidial é totalmente distinto das demais bactérias. A endocitose pela célula hospedeira permite a formação de um complexo de inclusão celular ligado à membrana. A habilidade da clamídia em sofrer conversão da forma inativa para a forma metabolicamente ativa, dentro da célula hospedeira, aumenta a dificuldade para a eliminação desse micro-organismo pelo sistema imunológico³.

Mundialmente, a morbidade associada à infecção por *C. trachomatis* é bastante pronunciada³. Foi observado que 70 a 80% das infecções em mulheres são assintomáticas e, portanto, não diagnosticadas e não tratadas⁴, o que mostra uma grande inter-variabilidade entre o curso e o resultado final das infecções causadas por essa bactéria. Algumas mulheres curam a infecção adequadamente, sem o desenvolvimento de dano tecidual, enquanto outras desenvolvem uma infecção persistente o que aumenta o risco de danos às tubas uterinas e infertilidade⁵.

A patogênese da *C. trachomatis* associada aos danos tubários ainda não é totalmente compreendida. Dois mecanismos foram propostos: o primeiro, mais importante e provável, seria desencadeado por uma infecção persistente que causaria uma doença crônica de baixo grau de resposta imune, que ataca e destrói as células do hospedeiro; o segundo propõe que a própria *C. trachomatis* poderia danificar as células epiteliais tubárias do hospedeiro quando conclui o seu ciclo de

replicação e corpos elementares são liberados por citólise. O último mecanismo não parece desempenhar um papel importante em infecções crônicas porque a persistência é caracterizada pela replicação reduzida do patógeno, que permaneceria por longos períodos em fase dormente⁶.

Eggert-Kruse et al.⁷ realizaram um estudo com um total de 1303 casais com histórico de infertilidade na Alemanha e determinaram que, embora não diretamente responsáveis pelos quadros de infertilidade, as infecções por *C. trachomatis* agravaram os casos por modificarem diversos aspectos da fisiologia reprodutiva feminina e masculina. Esses fatores de infertilidade são encontrados em mais de 50% das pacientes com sorologia positiva para *C. trachomatis*, no entanto, a oclusão tubária total é rara (4%)⁷.

A infertilidade devido à obstrução da tuba uterina é uma causa comum para a indicação de fertilização *in vitro* (FIV) e transferência de embriões. A maioria das mulheres com infertilidade tubária apresenta infecção silenciosa, com evidência sorológica de exposição à *C. trachomatis*⁷, mas sem histórico de infecção sintomática pélvica ou aquisição de uma doença sexualmente transmissível (DST)⁷.

A infecção por *C. trachomatis* pode causar risco de ruptura prematura de membranas e de parto prematuro, conjuntivites e manifestações respiratórias no recém-nascido. A infecção do trato genitourinário, geralmente se manifesta de forma assintomática e como consequências desta manifestação silenciosa pode ocorrer Doença Inflamatória Pélvica (DIP), gestação ectópica e endometrite pós-parto⁸.

A Doença Inflamatória Pélvica refere-se à infecção do útero, tuba uterina e estruturas pélvicas adjacentes, que não estão associadas a cirurgias ou gravidez⁹.

A gravidez ectópica é a principal causa de morbidade e mortalidade materna em gravidez precoce¹⁰ e tem sido associada com sorologia positiva para *C. trachomatis* em vários estudos. Casos de infecção por clamídia não tratada, além de resultarem em dor pélvica crônica em mulheres, favorecem a transmissão vertical¹¹.

Em um estudo com mais de 13.000 participantes, a probabilidade de subfertilidade foi avaliada na sequência de um teste positivo para *C. trachomatis*, em amostras obtidas do colo do útero e/ou uretra. As taxas de natalidade e hora do nascimento foram comparadas entre mulheres com testes positivo e negativo. Constatou-se que quase todos os casos positivos receberam antibióticos como tratamento, assumindo-se que a probabilidade de subfertilidade deva ser maior¹².

As proteínas de choque térmico (HSP - *heat shock proteins*) são proteínas de estresse existentes em diversos organismos e estão envolvidas com a sobrevivência desses organismos em condições ambientais adversas. Durante o desenvolvimento embrionário dos mamíferos as HSPs exibem vias de expressão específicas. As HSPs e chaperonas desenvolvem funções importantes para a regulação da diferenciação, divisão e apoptose celular. Assim acredita-se que a presença de HSPs seja essencial para a multiplicação celular¹³.

Apesar de estarem, inicialmente, associadas a propriedades benéficas e fisiológicas, a expressão das HSPs tem sido associada a várias condições patológicas. Membros da família HSP 60 (Chsp60), são especialmente reconhecidos como antígenos imunodominantes de alguns patógenos, como a *C. trachomatis*³. A infecção detectada e prolongada por *C. trachomatis* poderia induzir hidrossalpinge, bem como a produção de anticorpos contra proteínas de choque térmico de clamídia que possuem 60 kDa (Chsp 60). A presença de imunidade cervical contra a proteína Chsp 60 foi associada com insucessos de FIV, possivelmente devido à indução de autoimunidade contra as proteínas de choque térmico homóloga humana de 60 kDa (HSP 60)¹⁴.

HSP60 é uma das primeiras proteínas expressas pelo zigoto de mamíferos após a fertilização e está presente tanto nos estágios embrionários iniciais quanto logo após o parto¹³. Portanto, mulheres com imunidade pré-existente para Chsp60, nos estágios iniciais de gravidez podem sofrer reativação de linfócitos sensibilizados contra HSP60 por meio de uma reação cruzada. A resposta imunológica pró-inflamatória subsequente pode promover rejeição imunológica ao embrião. Resposta imune dirigida contra HSP60 tem sido associada a abortos espontâneos e dificulta o sucesso de técnicas de fertilização¹⁵.

Spandorfer et al.¹⁶ realizaram um estudo correlacionando infecções silenciosas por clamídia, infertilidade tubária e a presença de anticorpos contra as Chsp 60 e insucessos com técnicas de FIV. Os resultados demonstraram que pelo menos 75% das mulheres no estudo, que eram incapazes de engravidar devido à oclusão das tubas uterinas, não tinham história prévia de DST. No entanto, a oclusão tubária foi fortemente associada aos anticorpos circulantes para os antígenos estruturais de *C. trachomatis*. Isto destaca o caráter assintomático das infecções do trato genital e a relação entre o "silêncio" da DIP assintomática e infertilidade tubária. Os resultados ressaltam a necessidade de técnicas de rastreamento para

infecções assintomáticas em mulheres sexualmente ativas, podendo auxiliar no controle e tratamento da paciente, bem como a busca desse micro-organismo em casais com problemas de fertilidade¹⁶.

A *C. trachomatis* atinge pessoas de ambos os sexos e tal infecção independe da idade, número de parceiros e condições socioeconômicas, entretanto a infecção possui um maior impacto na saúde reprodutiva das mulheres¹.

No que diz respeito à sorologia positiva para clamídia nos homens, os resultados também foram significativamente correlacionados com um fator para danos tubário em suas parceiras, o que sugere a infecção como causa ou cofator de infertilidade dos casais. No entanto, os demais fatores envolvidos com a fertilidade masculina como: volume de ejaculação, pH, viabilidade e concentração de frutose no líquido seminífero e motilidade de espermatozoides não estavam alterados em pacientes positivos para infecção⁷.

Os potenciais mecanismos para o efeito na fertilidade de infecções por clamídia em homens não foram ainda bem descritos, porém existem teorias que sugerem efeitos diretos e/ou indiretos em espermatozoides ou inflamação dos túbulos acarretando obstrução e/ou danos epiteliais que resultam em diminuição da espermatogênese¹⁷.

Diagnóstico

Alguns critérios clínicos objetivos como secreção mucopurulenta endocervical, eritema e sangramento de mucosa podem ser utilizados para o diagnóstico de infecção por *C. trachomatis*, no entanto, a maioria dos casos de infecção clamidial são assintomáticos ou minimamente sintomáticos, e não demonstram sinais clínicos específicos¹⁸.

Os principais testes para o diagnóstico de infecção por clamídia são a pesquisa de antígenos, por meio de cultura, imunofluorescência direta (IFD), imunoensaio enzimático, pesquisa de ácidos nucleicos por métodos de amplificação (PCR) ou pesquisa de anticorpos por imunofluorescência indireta (IFI), microimunofluorescência indireta e imunoensaio enzimático indireto⁸.

A técnica considerada padrão ouro para teste de anticorpos específicos para clamídia é a microimunofluorescência (MIF), porém esta é muito trabalhosa e precisa de muito treinamento do analista para uma correta interpretação dos dados, o que limita a sua utilização pela maioria dos laboratórios¹⁹.

Anticorpos Anticlamidial (IgG CAT) são utilizados como marcadores de contato prévio com estes micro-organismos²⁰. Desde que a associação entre as infecções por *C. trachomatis*, a presença de IgG em soro e a patologia tubária foi observada, o teste sorológico para pesquisa de anticorpo IgG (CAT) foi introduzido como padrão para triagem de DIP no tratamento de infertilidade humana²⁰.

Infecções recorrentes por *C. trachomatis* afetam principalmente os adolescentes e persistem por uma década ou mais. Estas infecções podem permanecer silenciosas até que as mulheres apresentem subfertilidade ou infertilidade. Os anticorpos séricos IgG são conhecidos por permanecer detectáveis durante muitos anos²¹.

Chlamydia hsp 60 (chsp60) é uma proteína clamidial gênero específica que pode ser utilizada pelo sistema imune como fator antigênico. A presença de anticorpos para chsp60 foi sugerida como marcadora para inflamação crônica e pode ser um bom indicador para o risco de patologia tubária²².

Impacto na Reprodução

Uma melhor compreensão do papel de infecções persistentes por *C. trachomatis* na infertilidade, associada ao fator tubário, pode ser útil na otimização de técnicas de fertilização, incorporando-se os testes de seleção para persistência de infecções de *C. trachomatis*.

Mesmo sendo um assunto de interesse, os trabalhos presentes em bancos de dados (SciELO, Pubmed, Bireme) são genéricos quanto ao assunto e deixam algumas perguntas sem respostas, entre elas: qual o melhor exame para detectar infecções silenciosas? Quanto tempo após o tratamento recomenda-se a fertilização? Qual a porcentagem de insucessos na fertilização em decorrência de infecções por *C. Trachomatis*?

Nos últimos 25 anos cerca de 11.780 artigos foram publicados sobre *C. trachomatis*, no entanto, quando o termo é associado à fertilização (78) ou falha do processo de fertilização *in vitro* (8), o número de publicações sofre uma drástica redução. Estes dados demonstram que existe uma carência em relação ao número de artigos publicados sobre infecções por *C. trachomatis* e insucessos de fertilização *in vitro*. Esse fato é curioso, pois este é um assunto de grande importância, visto que infecções associadas à essa bactéria têm sido constantemente relacionadas aos problemas de fertilidade humana.

Esses artigos estão distribuídos em diversas áreas do conhecimento como: medicina, imunologia e

microbiologia, bioquímica, genética e biologia molecular, farmacologia, toxicologia, farmácia e veterinária, porém poucas revistas especializadas no assunto publicaram sobre o tema. Revistas científicas como: Human Reproduction, Human Reproduction Update, Ceska Gynekologie e Fertility Sterility, publicaram em média apenas cinco artigos sobre o tema *C. trachomatis* no período referido.

Outras palavras-chave foram associadas a infecções por *C. trachomatis*. As mais recorrentes, no período avaliado, foram: doença sexualmente transmissível (508) e infecção sexualmente transmissível (463). No entanto, novas pesquisas são necessárias, principalmente aquelas relacionadas à conduta clínica após uma infecção por *C. trachomatis* para garantir que a fertilização seja bem sucedida.

Técnicas de fertilização *in vitro* são dispendiosas e requerem dedicação especial por parte do casal. Esse esforço pode ser perdido em decorrência das falhas na conduta pré-fertilização, como a falta de diagnóstico para infecções por *C. trachomatis*.

Os ginecologistas, muitas vezes, conseguem estimar as chances de sucesso com os procedimentos e gravidez, bem como a melhor conduta para a fertilização, com base em experiências clínicas. No entanto, um estudo relatou que essa estimativa é mais assertiva para casos de gravidez espontânea quando comparada aos casos de gravidez após fertilização *in vitro*²³. A importância de estimar as chances de concepção após a conclusão da fertilização gerou trabalhos baseados nas taxas de sucesso do tratamento no histórico dos pacientes, principalmente no diagnóstico das DSTs, entre elas a infecção por *C. trachomatis*²⁴. Essa previsão pode diminuir o estresse e a angústia após a fertilização e ajudar no sucesso da técnica empregada.

Diversos artigos descrevem a infecção por *C. trachomatis* como a principal causa de infertilidade e, também sua associação com a falha de FIV e consequente aborto espontâneo¹⁹. No entanto, não se encontram artigos epidemiológicos que comprovem especificamente que a falha de FIV seja causada pela infecção por essa bactéria.

O problema para os centros especializados em reprodução assistida reside na avaliação de pacientes que desconhecem se tiveram ou não infecção por clamídia ou ainda, que fizeram tratamento com antibióticos, mas que apresentam sequelas condizentes com infecções assintomáticas causadas por clamídia, uma vez que a reativação da doença pode levar ao insucesso das técnicas de fertilização.

Embora uma vasta revisão da literatura tenha sido realizada, os resultados apresentados nestes artigos são contraditórios, concluindo que, ambos os anticorpos anti-estrutural clamídia e anti-chsp60, não podem ser considerados padrão ouro para prever o resultado de FIV em casais infectados por *C. trachomatis*. Portanto, a fim de definir o melhor marcador, ou a melhor associação de marcadores, estudos mais aprofundados são necessários²⁵.

A busca de informações sobre os mecanismos pelos quais as infecções causadas por *C. trachomatis* provocam insucessos em FIV direcionam a investigação para causas relacionadas às sequelas ou à infertilidade masculina. Raros trabalhos abordam o problema do ponto de vista da infecção masculina, entretanto, quando a profilaxia é necessária, o tratamento do casal é recomendado.

Os baixos índices de publicação sobre infecção masculina por clamídia pode ser justificado pelo tratamento prévio de centrifugação do material seminal que é realizado na técnica de FIV. No entanto, Al-Mously et al.²⁶ realizaram um experimento com 100 amostras de sêmen, sendo que 13 continham níveis detectáveis de DNA de *C. trachomatis* e, em apenas 7 amostras, este componente foi completamente removido depois da lavagem do esperma. Nas 6 amostras restantes com a presença de DNA positivo, o número de cópias após preparação variou, mas permaneceu capaz de provocar uma infecção *in vitro*. Como conclusão o trabalho alerta para o fato de que infecções não diagnosticadas por *C. trachomatis* em homens poderia levar à infecção ou contaminação do sistema de cultura pela FIV, pois o método de lavagem de esperma não é 100% eficaz²⁶.

Outro ponto relevante é a contaminação após a fertilização, ou a reativação da infecção. Este fato pode ocorrer caso o parceiro não seja tratado para infecção clamidial. Caso a exposição aconteça durante a gravidez, pode ocorrer ectopia cervical. A corioamnionite pode ocorrer devido à emissão de citocinas no líquido amniótico, promovendo secreção de prostaglandinas (PGE2), responsável por contrações uterinas que levam ao aborto espontâneo²⁵. Em mães não tratadas, o fator de risco de contaminação para o feto, que não é totalmente protegido pelos anticorpos maternos, é de 20-50% para conjuntivite e 10-20% para síndrome da doença respiratória com pneumonia. Estes resultados reforçam a necessidade de detecção de clamídia entre 24-26 semanas de gestação²⁷.

O levantamento realizado demonstrou que embora muito se saiba sobre a infertilidade por oclusão de tuba uterina em infecções silenciosas decorrentes de

reações autoimunes. Ainda não existe consenso quanto ao melhor exame para detecção dessas infecções e qual a melhor conduta para evitar falhas em técnicas de fertilização *in vitro*. A falha em FIV por infecções por clamídia é um assunto relevante que, portanto, necessita ainda de extensa pesquisa.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

- *C. trachomatis* está relacionada como um dos maiores problemas para a reprodução humana, podendo causar ruptura de membranas, parto prematuro, DIP, gestação ectópica e endometrite pós-parto;
- Foi observado, de acordo com a literatura, que a maioria dos homens e das mulheres apresenta infecção assintomática;
- O mecanismo de infertilidade está associado à presença de autoanticorpos contra hsp60, induzidos por infecções silenciosas de clamídia, responsáveis por danificar o embrião. Isso ocorre quando os embriões em estágios iniciais de desenvolvimento expressam hsp60 que são reconhecidas pelos anticorpos maternos, levando à destruição do embrião e consequente falha da FIV;
- Os principais testes para diagnóstico de infecção por clamídia são imunofluorescência direta (IFD), pesquisa de ácidos nucleicos por método de amplificação (PCR), imunofluorescência indireta (IFI), microimunofluorescência (MIF), imunoenensaio enzimático indireto e pesquisa de anticorpos para Chsp60;
- Há poucos trabalhos que discorrem sobre o melhor exame para a detecção de infecções silenciosas, o tempo recomendado para a fertilização após tratamento e a porcentagem de insucessos em fertilização em decorrência de infecção por *C. trachomatis*.

REFERÊNCIAS

1. Guzzatto P, Scarton J, Anzolch KJ, Oliveira OLM. Prevalência de *Chlamydia trachomatis* em pacientes com leucocitospermia. *RBAC*. 2010; 42(3):205-7.
2. World Health Organization (WHO). Department of Reproductive Health and Research. Sexually transmitted and other reproductive tract infections: a guide to essential practice. 2005; 92(4):196.
3. Paavonen J, Eggert-Kruse W. *Chlamydia trachomatis*: impact on human reproduction. *Hum Reprod Update*. 1999; 5(5):433-47.
4. Carter TC, Olney RS, Mitchell AA, Romitti PA, Bell EM, Druschel CM, et al. Maternal self-reported genital tract infections during

- pregnancy and the risk of selected birth defects. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2011; 91(2):108-16.
5. Den Hartog JE, Morré SA, Land JA. *Chlamydia trachomatis*-associated tubal factor subfertility: Immunogenetic aspects and serological screening. *Hum Reprod Update.* 2006; 12(6):719-30.
 6. Mpiga P, Ravaoarino M. *Chlamydia trachomatis* persistence: an update. *Microbiol Res.* 2006; 161(1):9-19.
 7. Eggert-Kruse W, Rohr G, Demirakca T, Rusu R, Näher H, Petzoldt D, et al. Chlamydial serology in 1303 asymptomatic subfertile couples. *Hum Reprod.* 1997; 12(7):1464-75.
 8. Carvalho NSd, Pegoraro MG, Takimura M, Oliveira FCJ. Prevalência da Infecção por *Chlamydia trachomatis* em Parturientes Jovens Atendidas em uma Maternidade Pública. DST - J Bras Doenças Sex Transm. 2010; 22(3):141-4.
 9. McCormack WM. Pelvic inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1994; 330(2):115-9
 10. Beatty WL, Byrne GI, Morrison RP. Repeated and persistent infection with *Chlamydia* and the development of chronic inflammation and disease. *Trends Microbiol.* 1994; 2(3):94-8.
 11. Refaat B, Al-Azemi M, Geary I, Eley A, Ledger W. Role of activins and inducible nitric oxide in the pathogenesis of ectopic pregnancy in patients with or without *Chlamydia trachomatis* infection. *Clin Vaccine Immunol.* 2009; 16(10):1493-503.
 12. Andersen B, Østergaard L, Puho E, Skriver MV, Schönheyder HC. Ectopic pregnancies and reproductive capacity after *Chlamydia trachomatis* positive and negative test results: a historical follow-up study. *Sex Transm Dis.* 2005; 32(6):377-81.
 13. Neuer A, Spandorfer SD, Giraldo P, Dieterle S, Rosenwaks Z, Witkin SS. The role of heat shock proteins in reproduction. *Hum Reprod Update.* 2000; 6(2):149-59.
 14. Neuer A, Mele C, Liu HC, Rosenwaks Z, Witkin SS. Monoclonal antibodies to mammalian heat shock proteins impair mouse embryo development in vitro. *Hum Reprod.* 1998; 13(4):987-90.
 15. Kligman I, Jeremias J, Rosenwaks Z, Witkin SS. Cell-mediated immunity to human and *Escherichia coli* 60-kDa heat shock protein in women: association with a history of spontaneous abortion and endometriosis. *Am J Reprod Immunol.* 1998; 40(1):32-6.
 16. Spandorfer SD, Neuer A, LaVerda D, Byrne G, Liu HC, Rosenwaks Z, et al. Previously undetected *Chlamydia trachomatis* infection, immunity to heat shock proteins and tubal occlusion in women undergoing in-vitro fertilization. *Hum Reprod.* 1999; 14(1):60-4.
 17. Cunningham KA, Beagley KW. Male genital tract chlamydial infection: implications for pathology and infertility. *Biol Reprod.* 2008; 79(2):180-9.
 18. Brunham RC, Paavonen J, Stevens CE, Kiviat N, Kuo CC, Critchlow CW, et al. Mucopurulent cervicitis--the ignored counterpart in women of urethritis in men. *N Engl J Med.* 1984; 311(1):1-6.
 19. Witkin SS, Linhares IM. *Chlamydia trachomatis* in subfertile women undergoing uterine instrumentation: an alternative to direct microbial testing or prophylactic antibiotic treatment. *Hum Reprod.* 2002; 17(8):1938-41.
 20. Punnonen R, Terho P, Nikkanen V, Meurman O. Chlamydial serology in infertile women by immunofluorescence. *Fertil Steril.* 1979; 31(6):656-9.
 21. Gijzen AP, Land JA, Goossens VJ, Slobbe ME, Bruggeman CA. *Chlamydia* antibody testing in screening for tubal factor subfertility: the significance of IgG antibody decline over time. *Hum Reprod.* 2002; 17(3):699-703.
 22. Kaufmann SH. Heat shock proteins and the immune response. *Immunol Today.* 1990; 11(4):129-36.
 23. Wiegerinck MA, Bongers MY, Mol BW, Heineman MJ. How concordant are the estimated rates of natural conception and in-vitro fertilization/embryo transfer success? *Hum Reprod.* 1999; 14(3):689-93.
 24. Gnoth C, Godehardt E, Frank-Herrmann P, Friol K, Tigges J, Freundl G. Definition and prevalence of subfertility and infertility. *Hum Reprod.* 2005; 20(5):1144-7.
 25. Askienazy-Elbhar M. Immune consequences of *Chlamydia* infections in pregnancy and in vitro fertilization outcome. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 1996; 4(3):143-8.
 26. Al-Mously N, Cross NA, Eley A, Pacey AA. Real-time polymerase chain reaction shows that density centrifugation does not always remove *Chlamydia trachomatis* from human semen. *Fertil Steril.* 2009; 92(5):1606-15.
 27. Bell TA, Stamm WE, Kuo CC, Wang SP, Holmes KK, Grayston JT. Risk of perinatal transmission of *Chlamydia trachomatis* by mode of delivery. *J Infect.* 1994; 29(2):165-9.