



ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΜΔΕ: "ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ"

**«Διερεύνηση υπεύθυνων γονιδίων που σχετίζονται με
ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά σε κλινικά στελέχη
χλαμυδίων»**

Επιβλέπων : Κόλλια Παναγούλα
Αν. Καθηγήτρια ΕΚΠΑ

Μιχαήλ Π. Κουφόπουλος

Αθήνα, Φεβρουάριος 2018

Περιεχόμενα

Περίληψη

Abstract

Εισαγωγή

Θεωρητικό μέρος

Κεφάλαιο 1: Τα χλαμύδια

1.1. Ορισμός χλαμυδίων

1.2. Ταξινόμηση χλαμυδίων

1.2.1. Παλιά ταξινόμηση των χλαμυδίων

1.2.2. Νέα ταξινόμηση των χλαμυδίων

1.3 Τα χαρακτηριστικά των χλαμυδίων

1.3.1. Τα γενικά χαρακτηριστικά των χλαμυδίων

1.3.2. Τα δομικά/ γενετικά χαρακτηριστικά των χλαμυδίων

1.4 Οι ασθένειες που επιφέρουν οι λοιμώξεις προερχόμενες από τα χλαμύδια

1.5 Η παθογένεια των λοιμώξεων προερχόμενων από τα χλαμύδια

1.6 Επιδημιολογία

1.6.1. Επιδημιολογία των λοιμώξεων προερχόμενων από τα χλαμύδια παγκοσμίως

1.6.2. Επιδημιολογία των λοιμώξεων προερχόμενων από τα χλαμύδια στην Ελλάδα

1.7 Οι μέθοδοι της διάγνωσης των λοιμώξεων προερχόμενων από τα χλαμύδια

- 1.7.1. Κυτταροκαλλιέργεια
- 1.7.2. Άμεσος Ανοσοφθορισμός
- 1.7.3. Ορολογικές μέθοδοι
- 1.7.4. Μοριακές τεχνικές

Κεφάλαιο 2: Η θεραπευτική προσέγγιση

- 2.1. Θεραπεία των λοιμώξεων προερχόμενες από χλαμύδια
- 2.2. Επιπλοκές της θεραπείας των λοιμώξεων προερχόμενες από χλαμύδια
- 2.3. Ανθεκτικότητα των χλαμυδίων σε μεμονωμένες κατηγορίες αντιβιοτικών
 - 2.3.1. Ριφαμυκίνες
 - 2.3.2. Τετρακυκλίνες
 - 2.3.3. Αμινογλυκοσίδες
 - 2.3.4. Σουλφοναμίδια και τριμεθοπρίμη
 - 2.3.5. Μακρολίδες
 - 2.3.6. Φθοροκινολόνες
 - 2.3.7. Λιβκοσαμίδες

Κεφάλαιο 3: Τα υπεύθυνα γονίδια που ευθύνονται για την εμφάνιση ανθεκτικότητας των κλινικών στελεχών χλαμυδίων στα αντιβιοτικά

Πειραματικό Μέρος

4. Υλικά και Μέθοδοι

- 4.1 Απομόνωση γενωμικού DNA -
- 4.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction-PCR)

4.3 Ηλεκτροφόρηση προϊόντων της PCR σε πηκτή αγαρόζης

4.4 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Πραγματικού Χρόνου (Real-time PCR)

5. Αποτελέσματα

5.1 Επιλογή του πειραματικού υλικού

5.2 Ανάλυση των αποτελεσμάτων

6. Συζήτηση

7. Συμπεράσματα

Βιβλιογραφία

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή: Τα χλαμύδια συνιστούν μια ομάδα αρνητικών κατά-Gram βακτηρίων διαμέτρου περίπου 0,25 μm. Είναι υποχρεωτικά παρασιτικοί μικροοργανισμοί καθώς δεν διαθέτουν μηχανισμούς για την παραγωγή μεταβολικής ενέργειας και δεν μπορούν να συνθέσουν τριφωσφορική αδενοσίνη. Τα χλαμύδια προκαλούν σοβαρές λοιμώξεις στον άνθρωπο και τα ζώα, καθώς παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά. Μεταδίδονται μέσω σεξουαλικής επαφής.

Σκοπός: Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση υπεύθυνων γονιδίων που σχετίζονται με ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά στα κλινικά στελέχη χλαμυδίων

Μεθοδολογία: Χρησιμοποιήθηκαν οι τεχνικές της Real Time PCR και συμβατικής PCR για την ανίχνευση της οικογένειας των *Chlamydiaceae* και για το είδος *Chlamydia trachomatis*, αντίστοιχα

Αποτελέσματα: Το 46,34% των ασθενών που εξετάστηκαν ήταν θετικό είτε για την ευρύτερη οικογένεια *Chlamydiaceae*, είτε για το συγκεκριμένο είδος *C. trachomatis* ενώ το 39,84% ήταν αρνητικό. Στους ασθενείς που βρέθηκαν θετικοί για τα χλαμύδια δόθηκε ειδική θεραπεία με αντιβιοτικά, και το 24,8% αυτών παρουσίασαν ανθεκτικότητα στη θεραπεία. Από τους τελευταίους, το 82,76% ήταν θετικοί στο *Chlamydiaceae*, το 13,79% ήταν αρνητικοί στο *Chlamydiaceae* και το 3,5% ήταν αρνητικοί στο *C. trachomatis*.

Συμπεράσματα: Τα χλαμύδια παρουσιάζουν μορφολογική μεταβλητότητα ανάλογα με τις συνθήκες, καθιστώντας την διάγνωση, άρα και την θεραπεία εξαιρετικά δύσκολες. Σήμερα υπάρχουν νέες μέθοδοι που προάγουν τόσο την απομόνωση όσο και την άμεση χαρτογράφηση των μεταλλάξεων στα γονίδια των χλαμυδίων. Συνίσταται στα ήδη υπάρχοντα δείγματα που είναι θετικά να γίνει επιπλέον έλεγχος αλληλούχισης γονιδίων καθώς και ανίχνευση πιθανών μεταλλάξεων που προσδίδουν ανθεκτικότητα

Λέξεις-κλειδιά: χλαμύδια, ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά, *Chlamydiaceae*, *C. Trachomatis*

ABSTRACT

Introduction: Chlamydiae are a bacterial family of gram-negative cells with 0.25 µm diameter. They are parasitic micro-organisms since they lack mechanisms for metabolic energy production and can not synthesize adenosine triphosphate. Chlamydia may cause serious infections in humans and animals as they are resistant to antibiotics. They are transmitted through sexual contact.

Aim: The purpose of this study was to investigate genes implicated in antibiotic resistance in clinical strains of Chlamydia

Methodology: Real Time and conventional PCR techniques were used to detect Chlamydiaceae and Chlamydia trachomatis, respectively

Results: 46.34% of patients were tested positive for Chlamydiaceae or *C. trachomatis*, while 39.84% were negative. Patients found positive for chlamydia were treated with antibiotics, and 24.8% of them showed resistance to treatment. Of the latter, 82.76% were positive for Chlamydiaceae, 13.79% were negative for Chlamydiaceae and 3.5% negative for *C. trachomatis*.

Conclusion: Chlamydia show variability depending on the circumstances, making diagnosis and treatment extremely difficult. There are currently new methods that enhance isolation and direct mapping of mutations in chlamydia genes. Samples positive for Chlamydia could be further investigated by DNA sequencing for gene mutations that confer resistance.

Key-words: antibiotic resistance, *Chlamydiaceae*, *C. trachomatis*

Εισαγωγή

Τα χλαμύδια συνιστούν μια ομάδα βακτηρίων διαμέτρου περίπου 0,25 μm και έχουν το μικρότερο γνωστό γονιδίωμα μεταξύ των ιατρικά σημαντικών βακτηρίων (περίπου το ένα τέταρτο του μεγέθους του *Escherichia coli*). Τα χλαμύδια μπορούν να θεωρηθούν ως αρνητικά κατά-Gram βακτήρια που δεν διαθέτουν μηχανισμούς για την παραγωγή μεταβολικής ενέργειας και δεν μπορούν να συνθέσουν τριφωσφορική αδενοσίνη. Αυτό το ελάττωμα τα περιορίζει σε μια ενδοκυτταρική ύπαρξη όπου το κύτταρο-ξενιστής παρέχει ενδιάμεσα προϊόντα πλούσια σε ενέργεια. Όλα τα χλαμύδια παρουσιάζουν παρόμοια μορφολογικά χαρακτηριστικά, καθώς μοιράζονται μία κοινή ομάδα αντιγόνων και πολλαπλασιάζονται στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων-ξενιστών τους με έναν ξεχωριστό αναπτυξιακό κύκλο.

Τα χλαμύδια στην ιατρική συνήθως σχετίζονται με ασθένειες που μεταδίδονται μέσω της σεξουαλικής επαφής αποτελώντας σήμερα το πιο κοινό Σεξουαλικά Μεταδιδόμενο Νόσημα. Έχουν συνδεθεί με σοβαρές επιπλοκές, όπως τις καθ' έξην αποβολές στις γυναίκες, τη στειρότητα και τις φλεγμονώδεις ασθένειες της ουρογεννητικής περιοχής και τη χλαμυδιακή ουρηθρίτιδα στους άνδρες. Τα τελευταία χρόνια μελέτες έχουν συνδέσει τη λοίμωξη από χλαμύδια με τις χρόνιες παθήσεις του αναπνευστικού και πεπτικού συστήματος, την ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης και τον καρκίνο.

Δύο γένη χλαμυδίων έχουν κλινική σημασία για τον άνθρωπο, το γένος *Chlamydia* το οποίο περιλαμβάνει το είδος *Chlamydia trachomatis*, και το γένος *Chlamydophila* το οποίο περιλαμβάνει τα είδη *Chlamydophila pneumoniae*, *Chlamydophila psittaci* και *Chlamydophila abortus*. Αυτοί οι οργανισμοί έχουν πολλά κοινά χαρακτηριστικά με τα βακτήρια και είναι ευαίσθητα σε θεραπεία με αντιβιοτικά, ενώ μοιάζουν και με τους ιούς, απαιτώντας ζωντανά κύτταρα για τον πολλαπλασιασμό τους.

Ο κύκλος ζωής των χλαμυδίων μπορεί να διαιρεθεί σε δυο ξεχωριστές φάσεις: μια εξωκυτταρική φάση, κατά την οποία δεν πολλαπλασιάζονται και είναι μολυσματικά και μια υποχρεωτικά ενδοκυττάρια φάση, κατά την οποία πολλαπλασιάζονται και είναι

μη μολυσματικά. Η μολυσματική μορφή ή «στοιχειώδες σωματίο», προσκολλάται στην κυτταρική μεμβράνη και εισέρχεται στο κύτταρο μέσω ενός φαγοσώματος. Μετά την είσοδο τους στα κύτταρα, τα στοιχειώδη σωματία αναδιοργανώνονται σε δικτυωτά σωματία (σχηματίζοντας έγκλειστα) και αρχίζει ο πολλαπλασιασμός τους. Μετά από 18 έως 24 ώρες, τα δικτυωτά σωματία συμπυκνώνονται για να σχηματίσουν τα στοιχειώδη σωματία. Αυτά τα νέα Στοιχειώδη Σωματία απελευθερώνονται, ξεκινώντας εκ νέου ένα νέο κύκλο μόλυνσης. Τα Χλαμύδια του τραχώματος (*Chlamydia trachomatis*) είναι παθογόνοι μικροοργανισμοί που προσβάλλουν αποκλειστικά ανθρώπους

Η χορήγηση αντιβιοτικών αποτελεί την πρώτη γραμμή για τη θεραπευτική αντιμετώπιση της μόλυνσης από τα στελέχη των χλαμυδίων. Τα αντιβιοτικά είναι αποτελεσματικά για τη θεραπεία των περισσότερων χλαμυδιακών λοιμώξεων, ωστόσο υπάρχει ανάγκη για τη δημιουργία και την παραγωγή νέων φαρμάκων και θεραπειών για τον περιορισμό της εμφάνισης δευτερογενών λοιμώξεων (Valdivia, 2012). Σε ορισμένες περιπτώσεις, η λοίμωξη από χλαμύδια μπορεί να συνεχίζεται παρότι ο ασθενής έχει λάβει θεραπευτική αγωγή με αντιβιοτικό. Το φαινόμενο αυτό που ονομάζεται αντίσταση ή ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά, είναι πλέον μια κλινική πραγματικότητα. Έχει διαπιστωθεί ότι η ανάπτυξη της αντίστασης σε αντιβιοτικά όπως οι τετρακυκλίνες, οι φθοροκινολόνες, η κλινδαμυκίνη, οι μακρολίδες και οι ριφαμυκίνες, συνδέεται άμεσα με γονιδιακές μεταλλάξεις που συμβαίνουν σε γονίδια των 23S rRNA και L22 (Stamm, 2010).

Τα χλαμύδια αποτελούν γενικά μια «σιωπηρή νόσο» καθώς το 75% των γυναικών και το 50% των ανδρών που έχουν μολυνθεί δεν εμφανίζουν συμπτώματα. Σε περίπτωση που υπάρξουν συμπτώματα, αυτά εμφανίζονται 1-3 εβδομάδες μετά την πιθανή επαφή με το μικρόβιο. Στις γυναίκες, τα βακτήρια αρχικά προσβάλλουν το τράχηλο ή/και την ουρήθρα. Στο στάδιο αυτό η γυναίκα μπορεί να έχει κάποιας μορφής κολπικές εκκρίσεις ή ένα δυσάρεστο αίσθημα πόνου ή/και καψίματος κατά την ούρηση. Στη συνέχεια, αν η γυναίκα δεν πάρει θεραπεία, τα χλαμύδια «προχωρούν» σταδιακά προς τη μήτρα και κατόπιν στις σάλπιγγες, προκαλώντας τελικά πυελική φλεγμονώδη νόσο. Η πυελική φλεγμονώδης νόσος μπορεί να είναι και αυτή «σιωπηλή» ή η γυναίκα να παρουσιάζει

πυελικό ή κοιλιακό άλγος. Ως αποτέλεσμα της μόλυνσης, μερικές γυναίκες αναπτύσσουν στειρότητα ή έκτοπη κύηση..

Στους άνδρες, τα χλαμύδια προκαλούν συμπτώματα παρόμοια με αυτά της γονόρροιας. Ορισμένες φορές μπορεί να υπάρχει κάποια «περίεργη» έκκριση από το πέος ή ένα αίσθημα καψίματος κατά την ούρηση. Σπανιότερα, μπορεί να παρουσιαστεί πόνος ή και πρήξιμο στον ένα ή και τους δύο όρχεις. Στα νεογέννητα, το πιο συνηθισμένο σύμπτωμα των χλαμυδίων είναι η επιπεφυκίτιδα, αλλά μπορεί να προκληθεί και πνευμονία.

Η ασυμπτωματικότητα της νόσου την καθιστά ιδιαίτερα επικίνδυνη και μεταδοτική. Ασθενείς με χλαμύδια που έχουν εξασθενημένο ανοσοποιητικό μπορούν να νοσήσουν από πληθώρα άλλων μολυσματικών παραγόντων, αλλά και να παρουσιάσουν αντοχή στην θεραπεία της νόσου αυτής. Είναι λοιπόν εξαιρετικής σημασίας η σωστή διάγνωση της νόσου και η πρόληψή της.

Το σημαντικότερο πρόβλημα είναι η μεταλλαγές που συμβαίνουν στα είδη και τα στελέχη των χλαμυδίων και τα καθιστούν ανθεκτικά στα αντιβιοτικά, δυσχεραίνοντας έτσι την θεραπεία. Σκοπό της παρούσας έρευνας αποτελεί η διερεύνηση υπεύθυνων γονιδίων που σχετίζονται με ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά στα κλινικά στελέχη χλαμυδίων.

Ειδικότερα, στο πρώτο μέρος αναπτύσσεται ο ορισμός, η φύση, η ταξινόμηση και οι μέθοδοι της διάγνωσης των χλαμυδίων, όπως και η παγκόσμια επικράτηση τους. Το επόμενο κεφάλαιο εστιάζει στη θεραπευτική προσέγγιση της λοίμωξης από χλαμύδια, στις θεραπευτικές επιπλοκές και στην ανθεκτικότητα τους σε συγκεκριμένες κατηγορίες αντιβιοτικών, όπως οι τετρακυκλίνες, οι αμινογλυκοσίδες και οι φθοροκινολόνες. Το τελευταίο κεφάλαιο αφορά τη διερεύνηση των υπεύθυνων γονιδίων που είναι υπεύθυνα για την εμφάνιση της υπό μελέτη ανθεκτικότητας των κλινικών στελεχών των χλαμυδίων στα αντιβιοτικά. Εν συνεχεία ακολουθεί το ειδικό ερευνητικό μέρος, η ανάλυση της μεθοδολογίας και των αποτελεσμάτων και τα συμπεράσματα της παρούσης μελέτης.

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 1: Τα γλαμύδια

1.1 Ορισμός γλαμυδίων

Τα γλαμύδια συνιστούν ένα κοινό Σεξουαλικά Μεταδιδόμενο Νόσημα (ΣΜΝ) το οποίο θεραπεύεται σχετικά εύκολα. Στην περίπτωση όμως που δεν αντιμετωπιστεί έγκαιρα μπορεί να προκαλέσει οδυνηρές και σοβαρές επιπλοκές και στα δύο φύλα με δυσμενέστερη τη στείριότητα. Η λοίμωξη προκαλείται από τα βακτήρια *Chlamydia trachomatis* τα οποία επιβιώνουν και πληθαίνουν στις περιοχές της μήτρας, του τραχήλου και του κόλπου, της ουρήθρας, του ορθού και μερικές φορές στο λαιμό και στα μάτια. Ο τρόπος μετάδοσης τους είναι κατά βάση η σεξουαλική επαφή (μετάδοση μέσω των κολπικών υγρών και του σπέρματος) [Morrison et al, 2003].

Πρόκειται για μη κινητικούς, Gram αρνητικούς, υποχρεωτικά ενδοκυττάριους παθογόνους οργανισμούς που προκαλούν σοβαρές ασθένειες σε ευρύ φάσμα ξενιστών. Λόγω του υποχρεωτικού ενδοκυτταρικού κύκλου ζωής τους θεωρούνταν λανθασμένα ιοί. Είναι μεταβολικά ανεπαρκείς οργανισμοί διότι δεν μπορούν να συνθέσουν τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP) και έτσι απαιτούν μια εξωγενή πηγή αυτής της υψηλής ενεργειακής ένωσης [Πόγγας & Χαρβάλου, 2011].

Η γλαμυδιακή μόλυνση των κυττάρων ξεκινάει από ένα μολυσματικό, αλλά μεταβολικά αδρανές, στοιχειώδες σώμα (elementary body-EB) που στη συνέχεια διαφοροποιείται σε ένα μεταβολικά ενεργό, αλλά μη μολυσματικό, δικτυωτό σώμα (reticulate body-RB). Η γλαμυδιακή ανάπτυξη λαμβάνει χώρα σε μεμβρανικά κυστίδια που ονομάζονται έγκλειστα. Κατά τη μόλυνση, ένα υποσύνολο κυστιδίων που προέρχονται από τον ξενιστή διακινούνται στο σημείο της μόλυνσης, ως απόκριση στην είσοδο του παθογόνου. Όταν τα γλαμύδια έρθουν σε επαφή με τα κυστίδια του ξενιστή, τα τροποποιούν σε έγκλειστα μέσω έκκρισης πρωτεϊνών που διευκολύνουν αυτήν τη

διαδικασία και χειρίζονται τις οδούς σηματοδότησης του ξενιστή μέσω αλληλεπιδράσεων με άλλες πρωτεΐνες των γλαμυδίων ή κυττάρου ξενιστή [Sandoz et al, 2010].

Η μοναδική διφασική ανάπτυξη μέσω του σχηματισμού διακριτών ενδοκυτταρικών εγκλείστων επιτρέπει την ταυτοποίηση με ανοσοφθορισμό. Τα γλαμύδια είναι ευαίσθητα σε αντιβιοτικά ευρέως φάσματος, ιδιαίτερα στις τετρακυκλίνες και στις μακρολίδες της κατηγορίας της ερυθρομυκίνης. Εξαιτίας της φύσης του κυτταρικού τους τοιχώματος το οποίο είναι διαφορετικό από πολλών βακτηριδίων, τα αντιβιοτικά βήτα-λακτάμης, όπως η πενικιλίνη, στερούνται βακτηριοκτόνου δράσης *in vitro* έναντι αυτών των μικροοργανισμών [Πόγγας & Χαρβάλου, 2011].

1.2. Ταξινόμηση γλαμυδίων

1.2.1. Παλαιά ταξινόμηση των γλαμυδίων

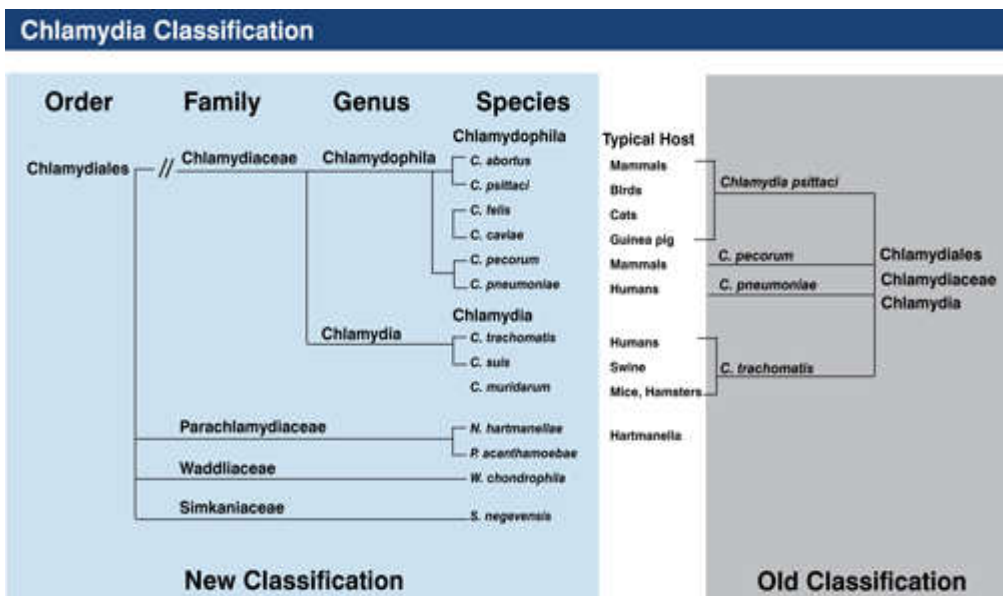
Η ταξινόμηση των γλαμυδίων στο παρελθόν περιελάμβανε την κατηγοριοποίηση στην τάξη *Chlamydiales*, της οικογένειας *Chlamydiaceae*, του γένους *Chlamydia* με τα είδη *Chlamydia pecorum*, *Chlamydia psittaci*, *Chlamydia pneumoniae* και *Chlamydia trachomati*. Οι Everett, Bush & Andersen (1999) επέκριναν την μέχρι τότε επικρατούσα ταξινόμηση και τη χαρακτήρισαν ως περιορισμένη από άποψη γενετικών, φαινοτυπικών και μορφολογικών κριτηρίων. Ως εκ τούτου θεώρησαν πως δεν προσμετρείται η ανάλυση του ριβοσωμικού οπερονίου και των προσφάτως τότε ταυτοποιηθέντων ενδοκυτταρικών οργανισμών με αναπτυξιακό κύκλο αναπαραγωγής σαν αυτό των γλαμυδίων. Αποτέλεσμα της επίκρισης ήταν η κατασκευή ενός νέου συστήματος ταξινόμησης που ενσωμάτωσε τέσσερις διαφορετικές οικογένειες γλαμυδίων βάσει των φυλογενετικών αναλύσεων των γονιδίων 16S και 23S rRNA [Everett et al, 1999].

Πίνακας 1.1.: Περιγραφή της ταξινόμησης των χλαμυδίων βάσει της Διεθνούς Ένωση Μικροβιολογικών Εταιρειών (IAMS) το 1980 [Stamm et al, 2008].

Genus	Species	Biovars	Serovars
Chlamydia	Ch. trachomatis	Trachoma - paratrachoma	A, B, Ba, C
		Urogenital chlamydiosis and neonatal pneumonia	D, E, F, G, H, I, G, K L1, L2, L3
		Lymphogranuloma venereum	1
		Mouse pneumonia	
Ch. psittaci	The primary pathogens of animals	13 (?)	
Ch. pneumoniae	Pneumonia, ARD, atherosclerosis, sarcoidosis, asthma	TWAR, AR, KA, CWL	
Ch. pecorum	The primary pathogens of animals	2, 3, 4, 6, 9	

1.2.2. Νέα ταξινόμηση των χλαμυδίων

Η ανάπτυξη των μεθόδων ταξινόμησης με βάση το DNA κατά τη δεκαετία του '80 προσέφερε νέες τεχνικές για τη διαφοροποίηση των ομάδων χλαμυδίων. Η ταξινόμηση των Everett, Bush & Andersen (1999) επέφερε τη δημιουργία τεσσάρων οικογενειών: της οικογένειας *Parachlamydiaceae*, της *Waddliaceae*, της *Simkaniaceae* και της *Chlamydiaceae*. Παράλληλα διαπιστώθηκε πως εντός της οικογένειας των *Chlamydiaceae* υπάρχουν δύο ξεχωριστές γραμμές που διαιρούνται σε εννέα ξεχωριστές ομάδες. Αναλυτικά η ταξινόμηση των χλαμυδίων παρουσιάζεται στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 1.1) [Everett et al, 1999].



Εικόνα 1.1.: Το διάγραμμα αποτυπώνει τις διαφορές μεταξύ της νέας και της παλαιάς ταξινόμησης της τάξης *Chlamydiales* και οδηγεί στη νέα ταξινόμηση των ειδών *Chlamydomphila abortus*.

Οι σημαντικότεροι εκπρόσωποι της οικογένειας *Chlamydiaceae* είναι το γένος *Chlamydia* με σημαντικότερο είδος το *C. trachomatis* και το γένος *Chlamydomphila* με κυριότερα γένη τα *C. caviae*, *C. Abortus*, *C. felis*, *C. pecorum*, *C. pneumoniae* και *C. psittaci*. [Everett et al, 1999].

1.3 Χαρακτηριστικά των χλαμυδίων

1.3.1. Γενικά χαρακτηριστικά

Τα χλαμύδια είναι μικροοργανισμοί που εμφανίζουν ενδιάμεσα χαρακτηριστικά μεταξύ των βακτηριδίων και των ιών. Τα χλαμύδια έχουν τη δυνατότητα της ανεξάρτητης αναπαραγωγής στον αναπτυξιακό τους κύκλο χρησιμοποιώντας τις μεταβολικές οδούς του κυττάρου-ξενιστή, εφόσον δεν συνθέτουν ATP. Η διάρκεια ζωής τους αντιστοιχεί σε 24 με 48 ώρες και η λοίμωξη που προκαλούν χαρακτηρίζονται από πολυεστιακές αλλαγές και αλλαγές πολυμορφισμού προκαλώντας σοβαρές επιπλοκές. Επιπλέον, συμμετέχουν ενεργά στον ανοσολογικό μηχανισμό στην επέκταση των λοιμώξεων [Choroszy-Król et al., 2012].

1.3.2. Δομικά χαρακτηριστικά

Τα χλαμύδια φέρουν στην επιφάνεια του κυτταρικού τοιχώματος αντιγόνα με πιο κοινό το λιποπολυσακχαριδικό αντιγόνο (Lipopolysaccharides-LPS) ανάλογο με εκείνο στο τοίχωμα ορισμένων Gram-αρνητικών βακτηριδίων. Η κυριότερη εξωτερική μεμβρανική πρωτεΐνη [(Major Outer Membrane Protein (MOMP)] συνιστά τη βασική πρωτεΐνη της εξωτερικής μεμβράνης των χλαμυδίων και κωδικοποιείται από το γονίδιο *ompA* διαφοροποιώντας ταυτόχρονα τα διάφορα είδη των χλαμυδίων [Zhong *et al.*, 2011].

Η MOMP αποτελείται από 5 σταθερές περιοχές και 4 μεταβαλλόμενες που εμφανίζουν σημαντικές διαφοροποιήσεις μεταξύ των ειδών των χλαμυδίων. Οι μεταβαλλόμενες περιοχές της MOMP προωθούν την υποδιαίρεση των *Chlamydia trachomatis* σε οροτύπους, ενώ στη μεταβαλλόμενη περιοχή IV υπάρχει ένας επίτοπος ειδικός του είδους για όλα τα *C. trachomatis* [Zhong *et al.*, 2011].

1.4. Ασθένειες που επιφέρουν οι λοιμώξεις προερχόμενες από τα χλαμύδια

Το γένος *Chlamydia* (σειρά: *Chlamydiales*, τάξη: *Chlamydiaeae*) περιέχει τα είδη *C. trachomatis* και *C. psittaci*, καθώς και ένα μεταγενέστερα ανακαλυφθέν είδος το *C. pneumoniae*. Και τα τρία είδη προκαλούν ασθένεια στους ανθρώπους. Το *Chlamydia psittaci* μολύνει μια ευρεία ποικιλία πτηνών και πολλά θηλαστικά, ενώ το *C. trachomatis* περιορίζεται σε μεγάλο βαθμό στους ανθρώπους. Το είδος *Chlamydia pneumoniae* έχει βρεθεί μόνο στους ανθρώπους. Οι ασθένειες που προκαλούν τα τρία αυτά βακτήρια αναφέρονται αναλυτικά στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 1.2) [Becker *et al.*, 1996].

Πίνακας 1.2: Οι ασθένειες που προέρχονται από τη λοίμωξη από γλαμύδια [Becker et al, 1996].

Species	Serotypes	Disease(s)
<i>C. trachomatis</i>	A, B, Ba, C	Trachoma (hyperendemic, a leading cause of blindness in humans); sexually transmitted infections of the genitals
	D, E, F, G, H, I, J, K	Inclusion conjunctivitis (adult and newborn); cervicitis; salpingitis; proctitis; epididymitis, and pneumonia of newborns; lymphogranuloma venereum
<i>C. psittaci</i>	L-1, L-2, L-3, many unidentified	Pneumonia (psittacosis)
<i>C. pneumoniae</i>	TWAR*	Pneumonia

Το 10% των πνευμονιών οφείλεται σε μόλυνση με *C. pneumoniae* και η πλειοψηφία των πρωτογενών λοιμώξεων δεν είναι σοβαρές, αλλά οι δευτερογενείς λοιμώξεις αποτελούν παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη αθηροσκλήρωσης, χρόνιας βρογχίτιδας, χρόνιας αποφρακτικής πνευμονοπάθειας (ΧΑΠ), άσθματος και νόσου του Alzheimer [Kern et al, 2009]. Το *C. pneumoniae* διαχέεται μέσω των μακροφάγων στους βαθύτερους ιστούς των πνευμόνων, των αρτηριών και των αρθρώσεων, ενώ το *C. trachomatis* μολύνει κινητά μονοκύτταρα που μεταφέρουν τα βακτήρια στους ιστούς των αρθρώσεων προκαλώντας φλεγμονή [Gerard et al., 2009].

Η προσβολή από το *Chlamydia trachomatis* είναι συσχετιζόμενη με μια σειρά κλινικών εκδηλώσεων όπως της πνευμονίας, της επιπεφυκίτιδας και της ρινοφαρυγγίτιδας σε νεαρά βρέφη, της λοίμωξης των γεννητικών οργάνων, του τραχώματος και του λεμφικού κοκκιώματος. Οι οφθαλμικοί και γεννητικοί ορότυποι του *C. trachomatis* μπορούν να μεταδοθούν από το γεννητικό σύστημα των μολυσμένων μητέρων στα βρέφη τους κατά τη γέννηση. Η μόλυνση αφορά περίπου στο 50% των βρεφών που γεννιούνται κολπικά και σε κάποιες σπάνιες περιπτώσεις βρεφών που γεννιούνται με καισαρική τομή με μεμβράνες άθικτες. Ο κίνδυνος επιπεφυκίτιδας στα βρέφη αυτά κυμαίνεται στο 25-50% και ο κίνδυνος πνευμονίας στο 5-30% (Committee on Infectious Diseases et al., 2015). Ο παρακάτω πίνακας αναφέρει τις κλινικές εκδηλώσεις των γλαμυδίων (*Chlamydia trachomatis*). Οι ανησυχίες που προκαλεί η λοίμωξη από γλαμύδια είναι σοβαρές καθώς επιφέρει σημαντικά δυσμενείς συνέπειες, κυρίως σε κατάσταση εγκυμοσύνης. (Committee on Infectious Diseases et al., 2015)

Πίνακας 1.3: Οι κλινικές εκδηλώσεις των γλαυιδίων

Άνδρες	Γυναίκες	Παιδιά
Ουρηθρίτιδα	Βαρθολινίτιδα	Επιπεφυκίτιδα
Μετα-γονοκοκκική ουρηθρίτιδα	Βλεννοπυώδη τραχηλίτιδα	Πνευμονία
Επιδιδυμίτιδα	Ενδομητρίτιδα	Ασυμπτωματική φορεία (φάρυγγας)
Προστατίτιδα	Σαλπινγιίτιδα	Ασυμπτωματική φορεία (γαστρεντερικό)
Πρωκτίτιδα	Πυελική φλεγμονώδη νόσο	Μέση ωτίτιδα
Επιπεφυκίτιδα	Περιηπατίτιδα (Σ. Fitz-Hugh-Curtis)	Τράχωμα
Φαρυγγίτιδα	Ουρηθρίτιδα	
Αφροδίσιο λεμφοκοκκίωμα	Οξύ ουρηθρικό σύνδρομο	
Σύνδρομο Reiter	Αφροδίσιο λεμφοκοκκίωμα	
Αρθρίτιδα	Επιπεφυκίτιδα	
	Φαρυγγίτιδα	
	Υπογονιμότητα	
	Έκτοπη κύηση	
	Πρόωρος τοκετός	
	Πρόωρη ρήξη των υμένων	
	Αρθρίτιδα	

Όπως συμβαίνει με όλα τα ΣΜΝ τα οποία είναι πολλές φορές ασυμπτωματικά, οι παγκόσμιοι οργανισμοί υγείας όπως ο CDC (Centers for Disease Control and Prevention), στις κατευθυντήριες οδηγίες τους παροτρύνουν τις ευπαθείς πληθυσμιακές ομάδες να ελέγχονται ετησίως σε προληπτικό επίπεδο. Όσον αφορά τις γυναίκες, όλες οι σεξουαλικά ενεργές που ανήκουν στις παρακάτω περιπτώσεις διατρέχουν αυξημένο κίνδυνο και πρέπει να ελέγχονται σε ετήσια βάση για τυχόν μόλυνση:

- όσες έχουν νοσήσει από ΣΜΝ, κυρίως από τον ιό HIV,
- όσες έχουν πολλούς ερωτικούς συντρόφους,
- όσες έχουν σεξουαλικό σύντροφο με ΣΜΝ,
- όσες δεν κάνουν χρήση προστασίας από τα ΣΜΝ, όπως το προφυλακτικό,
- όσες κάνουν χρήση ναρκωτικών και
- όσες είναι έγκλειστες σε σωφρονιστικό ίδρυμα.

Αναφορικά με τους άνδρες, ο CDC επιστρά την προσοχή μέσω ετήσιων προληπτικών ελέγχων στους ομοφυλόφιλους. (Committee on Infectious Diseases et al., 2015)

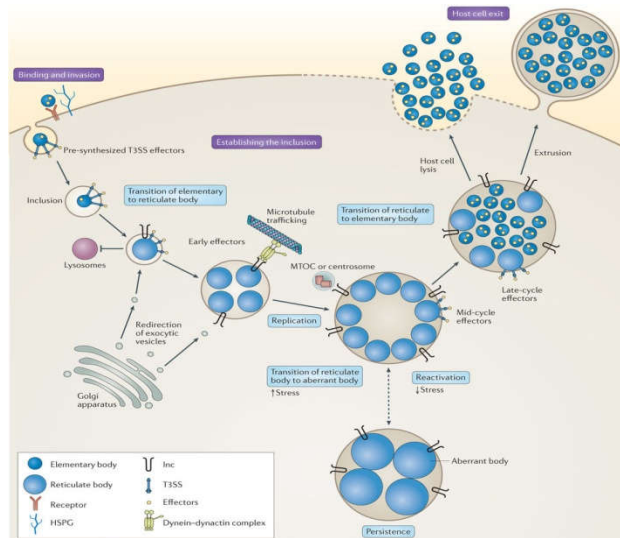
1.5. Η παθογένεια των λοιμώξεων προερχόμενων από χλαμύδια

Όλα τα χλαμύδια μοιράζονται έναν αναπτυξιακό κύκλο στον οποίο η μορφή τους εναλλάσσεται μεταξύ εξωκυτταρικού, μολυσματικού στοιχειώδους σώματος και ενδοκυτταρικού, μη μολυσματικού δικτυωτού σώματος. Τα στοιχειώδη σώματα εισέρχονται στα κύτταρα του βλεννογόνου και διαφοροποιούνται σε δικτυωτά σώματα σε ένα τμήμα που συνδέεται με τη μεμβράνη, δημιουργώντας ένα έγκλειστο. Μετά από αρκετούς κύκλους αναπαραγωγής, τα δικτυωτά σώματα επαναδιαφοροποιούνται σε στοιχειώδη σώματα και απελευθερώνονται από το κύτταρο ξενιστή, έτοιμα να μολύνουν γειτονικά κύτταρα (Εικόνα 1.2) [Ehwell et al., 2016].

Τα στοιχειώδη σώματα και τα δικτυωτά σώματα είναι μορφολογικά και λειτουργικά διακριτά. Τα στοιχειώδη σώματα επιβιώνουν στο δυσμενές εξωκυτταρικό περιβάλλον. Το κυτταρικό τους τοίχωμα, που μοιάζει με σπόριο, σταθεροποιείται από ένα δίκτυο πρωτεϊνών που συνδέονται με δισουλφιδικούς δεσμούς, και ονομάζεται σύμπλεγμα εξωτερικής μεμβράνης και προσδίδει αντίσταση στην οσμωτική και τη φυσική καταπόνηση. Παρόλο που θεωρούνταν μεταβολικά αδρανής, μελέτες υποδηλώνουν ότι τα στοιχειώδη σώματα έχουν υψηλή μεταβολική και βιοσυνθετική δραστηριότητα που εξαρτάται από την 6-φωσφορική-D-γλυκόζη (D-glucose-6-phosphate) ως πηγή ενέργειας. Επιπρόσθετα, ποσοτικές πρωτεομικές μελέτες αποκαλύπτουν ότι τα στοιχειώδη σώματα περιέχουν μεγάλο αριθμό πρωτεϊνών που απαιτούνται για τον κεντρικό μεταβολισμό και τον καταβολισμό της γλυκόζης, οι οποίες μπορεί να χρησιμοποιηθούν για «έκρηξη» μεταβολικής δραστηριότητας κατά την είσοδο στο κύτταρο του ξενιστή και την διαφοροποίηση σε δικτυωτό σωματίο.

Κατά τη διαφοροποίηση, τα αλληλένδετα σύμπλοκα μειώνονται, γεγονός που παρέχει στη μεμβράνη τη ρευστότητα που απαιτείται για την αντιγραφή. Τα δικτυωτά σωματίδια είναι εξειδικευμένα στην πρόσληψη θρεπτικών ουσιών και την αντιγραφή, εκφράζουν έντονα πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην παραγωγή ATP, την πρωτεϊνική

σύνθεση και τη μεταφορά θρεπτικών ουσιών, όπως συνθετάσες ATP τύπου V, ριβοσωμικές πρωτεΐνες και μεταφορείς νουκλεοτιδίων [Elwell et al, 2016].



Εικόνα 1.2: Ο κύκλος ζωής του *Chlamydia trachomatis*

1.6 Επιδημιολογία

1.6.1. Επιδημιολογία των λοιμώξεων προερχόμενων από γλαμύδια παγκοσμίως

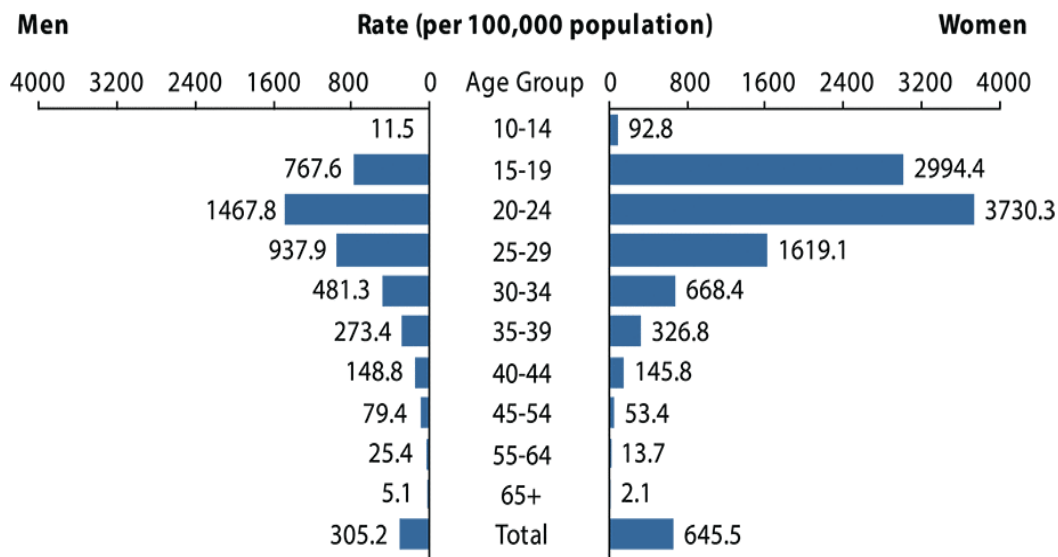
Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (ΠΟΥ) καταγράφει μία ευρύτερη παγκόσμια αύξηση του επιπολασμού των λοιμώξεων από γλαμύδια της τάξεως του 4,1% εντός 3 ετών (από το 2005 στο 2008), όπως περιγράφεται στον παρακάτω πίνακα. Μία αιτιολογία της αύξησης αυτής αποτελεί η αύξηση του πληθυσμού των ενηλίκων ηλικίας 15-49 ετών (από 3,42 σε 3,55 δισεκατομμύρια άτομα) (Πίνακας 1.4) (World Health Organization, 2012).

Πίνακας 1.4: Αύξηση του επιπολασμού των λοιμώξεων από τα γλαμύδια κατά τα έτη 2005- 2008.

	2005	2008	% change
<i>Chlamydia trachomatis</i>	101.5	105.7	4.1
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	87.7	106.1	21.0
Syphilis	10.6	10.6	0
<i>Trichomonas vaginalis</i>	248.5	276.4	11.2
Total	448.3	498.9	11.3

Οι λοιμώξεις από τα *Chlamydia trachomatis* εμφανίζουν υψηλότερη επικράτηση στις ηπείρους της Αφρικής και της Ασίας. Κατά το 2008, η Αφρική παρουσίασε 8,3 εκατομμύρια περιστατικά μόλυνσης, η περιοχή της Ανατολικής Ασίας 7,2 εκατομμύρια και το σύνολο της Αμερικής 26.4 εκατομμύρια. Στο χώρο της Ευρώπης έχει εκτιμηθεί πως υπήρξαν 20,6 εκατομμύρια μολύνσεις από χλαμύδια για το 2008, ενώ 3,2 εκατομμύρια ήταν στην περιοχή της Ανατολικής Ευρωπαϊκής ζώνης. Στην Περιφέρεια του Δυτικού Ειρηνικού (37 χώρες) τα περιστατικά άγγιξαν τα 40 εκατομμύρια (World Health Organization, 2012).

Σύμφωνα με το CDC, τα χλαμύδια αποτελούν την πιο διαδεδομένη σεξουαλικά μεταδιδόμενη ασθένεια στις Ηνωμένες Πολιτείες. Το παρακάτω διάγραμμα (Εικόνα 1.3) απεικονίζει την επικράτηση της λοίμωξης ανά 100,000 πολίτες των Η.Π.Α. και των δύο φύλων για το έτος 2015. Παρατηρείται πως ο επιπολασμός της ασθένειας στο γυναικείο φύλο είναι πολύ υψηλότερος συγκριτικά με το ανδρικό, γεγονός αρκετά ανησυχητικό.



Εικόνα 1.3.: Το διάγραμμα παρουσιάζει τα δεδομένα του CDC σχετικά με τον επιπολασμό των χλαμυδίων στις Ηνωμένες Πολιτείες για το έτος 2015.

Στις Ηνωμένες Πολιτείες οι μολύνσεις από *C. trachomatis* παρουσιάζουν υψηλά ποσοστά μεταξύ των σεξουαλικά ενεργών εφήβων και των νεαρών ενήλικων θηλυκών ατόμων, ενώ συχνά ένα μεγάλο ποσοστό αυτών παραμένει ασυμπτωματικό. Ο επιπολασμός είναι σταθερά υψηλότερος στα νεαρά κορίτσια και στις γυναίκες καθώς παρόντες είναι και οι φυλετικές ανισότητες. Αναλυτικότερα για το έτος 2008, η επικράτηση στα μη ισπανόφωνα μαύρα άτομα ήταν υψηλότερη από την εκτιμώμενη επικράτηση μεταξύ των μη ισπανόφωνων λευκών και μεξικανών (CDC, 2008).

Η National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) διαπίστωσε πως για το διάστημα 2007-2012 περίπου 1.8 εκατομμύρια άτομα ηλικίας 14-39 ετών πάσχουν από χλαμύδια των γεννητικών οργάνων στις Ηνωμένες Πολιτείες. Η μελέτη έδειξε πως η μόλυνση είναι συχνότερη σε έφηβους και νεαρές ηλικίες κάτω των 25 ετών. Ενδεχομένως οι νέοι να διατρέχουν αυξημένο κίνδυνο μόλυνσης εξαιτίας παραγόντων βιολογικού κινδύνου (για παράδειγμα ο εξελισσόμενος και αναπτυσσόμενος τράχηλος στις νεαρές γυναίκες) ή εξαιτίας της απουσίας εφαρμογής μεθόδων πρόληψης, όπως η χρήση προφυλακτικού. Η ακατάλληλη συμπεριφορά για την υγεία και η απουσία της υιοθέτησης βέλτιστων πρακτικών (όπως η χρήση προστατευτικών μέσων κατά τη

διάρκεια κάθε μορφής σεξουαλικής συνεύρεσης) επιβαρύνει σε δραματικό βαθμό την εξάπλωση των χλαμυδίων και γενικά των ΣΜΝ.

1.6.2. Επιδημιολογία των λοιμώξεων προερχόμενων από χλαμύδια στην Ελλάδα

Η μελέτη των Levidiotou *et al* (2005) έλαβε χώρα στα τέλη του 1998 και ολοκληρώθηκε την άνοιξη του 2005. Συνολικά συμμετείχαν 17.869 ασθενείς σε 4 κέντρα της χώρας μας: 1.035 άνδρες ηλικίας 18-65 ετών και 16.834 γυναίκες ηλικίας 18-55 ετών. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, οι λοιμώξεις από χλαμύδια αντιστοιχούσαν στο 11,2% των ανδρών και στο 3,5% των γυναικών, ποσοστά αντίθετα με τα προαναφερθέντα παγκόσμια επιδημιολογικά στοιχεία όπου οι γυναίκες φαίνεται να επικρατούν. Το 71% των συμμετεχόντων είχε περισσότερους από έναν συντρόφους, το 91% είχε νέο ερωτικό σύντροφο τον τελευταίο χρόνο, ενώ το 88% των ασθενών ήταν ηλικίας κάτω από 30 ετών. Οι μελετητές συμπέραναν πως ο επιπολασμός των λοιμώξεων από χλαμύδια ήταν χαμηλός για τα εν λόγω έτη. Επιπλέον οι πολλαπλοί σεξουαλικοί σύντροφοι κατά το τελευταίο έτος και η νεαρή ηλικία ήταν παράγοντες που συσχετίστηκαν με αυξημένο κίνδυνο μόλυνσης από χλαμύδια (Levidiotou *et al.*, 2005).

Το Κέντρο Ελέγχου & Πρόληψης Νοσημάτων (ΚΕΕΛΠΝΟ) έχει δημοσιεύσει επιδημιολογικά δεδομένα για τη χώρα μας που αφορούν στο έτος 2013 και αναφέρει πως σύμφωνα με τα στατιστικά του στοιχεία στην Ελλάδα δηλώθηκαν 708 περιστατικά. Η αντιστοιχία τους με το δημόσιο και ιδιωτικό νοσοκομειακό χώρο είναι 94,6% και 5,4 % (τα 670 από τα 708 περιστατικά δηλώθηκαν σε δημόσιες νοσοκομειακές μονάδες). Τα στοιχεία επιδεικνύουν πως η κύρια ηλικιακή ομάδα που προσεβλήθη είναι αυτή των 25-34 ετών (Πίνακας 1.5).

Πίνακας 1.5: Το σύνολο των δηλωθέντων περιστατικών λοίμωξης από χλαμύδια στη χώρα μας ανά ηλικιακή ομάδα, φύλο και κατηγορία μετάδοσης για το 2013, σύμφωνα με τα επίσημα στοιχεία του ΚΕΕΛΠΝΟ.

2013	Ηλικιακή	Άνδρες			Γυναίκες	ΣΥΝΟΛΟ
	Ομάδα	Ετεροφυλοφιλική Επαφή	Ομο/αμφιφυλοφιλική Επαφή	Άγνωστο	Ετεροφυλοφιλική Επαφή	
	0-4	0	0	0	0	0
	5-14	0	0	0	0	0
	15-19	0	0	0	16	16
	20-24	1	0	0	35	36
	25-34	11	0	0	54	65
	35-44	2	0	0	37	39
	45-64	0	0	0	30	30
	65+	0	0	0	0	0
	Άγνωστο	1	0	50	253	304
	ΣΥΝΟΛΟ	15	0	50	425	490

Ως εκ τούτου, στην Ελλάδα παρατηρείται μία γενικότερη αύξηση των κρουσμάτων λοίμωξης από γλαμύδια με ταυτόχρονα μία μείωση της διεξαγωγής των εξετάσεων διάγνωσης του στα δημόσια νοσοκομεία, γεγονός αρκετά επιβαρυντικό για την άμεση διάγνωση και αντιμετώπιση της κλινικής κατάστασης. Δυστυχώς δεν υπάρχει η δυνατότητα της διαχρονικής σύγκρισης δεδομένων διότι το ΚΕΕΛΠΝΟ ξεκίνησε τη συλλογή των σχετικών ιατρικών στοιχείων από τα ελληνικά δημόσια νοσοκομεία από το 2010 και μετά.

1.7. Μέθοδοι της διάγνωσης των λοιμώξεων προερχόμενων από γλαμύδια

Το ΚΕΕΛΠΝΟ αναφέρει ότι η κλινική διάγνωση της λοίμωξης από γλαμύδια (εκτός από το αφροδίσιο λεμφοκοκκίωμα - LGV) θα πρέπει να περιλαμβάνει τουλάχιστον μία από τις ακόλουθες κλινικές μορφές

- ουρηθρίτιδα,
- επιδιδυμίτιδα,
- οξεία σαλπινγίτιδα,
- οξεία ενδομητρίτιδα,

- τραχηλίτιδα,
- πρωκτίτιδα.

Οι βασικές διαγνωστικές μέθοδοι για τη διαπίστωση της ύπαρξης λοίμωξης από χλαμύδια περιλαμβάνουν τεχνικές κυτταροκαλλιέργειας, ανοσοφθορισμού, ιστολογικές εξετάσεις, ανοσοενζυμική μέθοδο, μοριακές τεχνικές και ορολογικές μεθόδους (Πινάκας 1.4). Να σημειωθεί πως μόνο 60 από τα 132 δημόσια νοσοκομεία διεξάγουν σχετικές εξετάσεις για τη διάγνωση των χλαμυδίων, ενώ εργαστηριακές διαγνώσεις με κυτταροκαλλιέργεια δεν πραγματοποιούνται σε κανένα δημόσιο νοσοκομείο της χώρας. Από τα 60 δημόσια νοσοκομεία, 7 εφαρμόζουν εργαστηριακή διάγνωση με μοριακή δοκιμασία, 13 κάνουν χρήση της εξέτασης του ανοσοφθορισμού, ενώ τα υπόλοιπα χρησιμοποιούν τη μέθοδο της ανοσοχρωματογραφίας ή την ανοσοενζυμική μέθοδο.

Πίνακας 1.6: Συνιστώμενες διαγνωστικές μεθόδους για τα *Chlamydia trachomatis*. (Chernesky,2005)

Specimen	Diagnostic method				
	Microscopy	Culture	AD [*]	NAH [*]	NAA
Conjunctival	+	+	+	+	+
Nasopharyngeal	-	+	-	-	+
Cervical	±	+	+	+	+
Urethral	-	+	+	+	+
Rectal	-	+	± [§]	-	+
Vulval	-	-	-	-	+
Vaginal	-	-	-	-	+
Introital	-	-	-	-	+
Meatal	-	-	-	-	+
Urine	-	-	-	-	+
Bubo pus	-	+	-	-	+
Semen	-	-	-	-	± [¶]

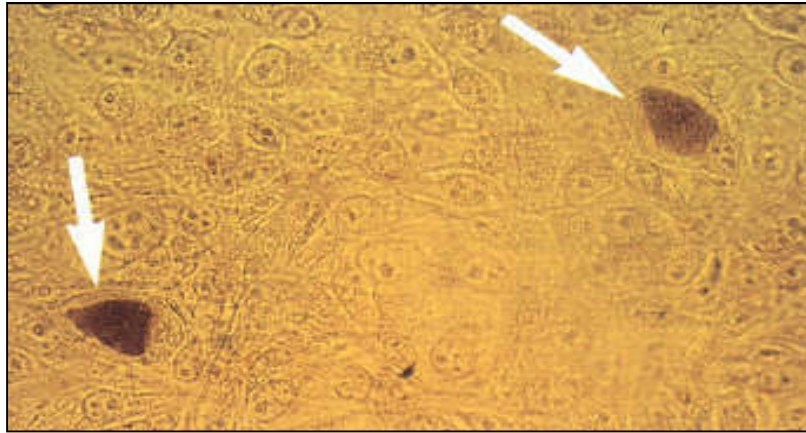
1.7.1

Τεχνικές κυτταροκαλλιέργειας

Μέχρι πρόσφατα, η τεχνική της κυτταροκαλλιέργειας θεωρείτο το χρυσό πρότυπο για την ανίχνευση του *C. trachomatis* στα ουρογεννητικά δείγματα, επειδή έχει μια εξειδίκευση που προσεγγίζει το 100%. Η καλλιέργεια ανιχνεύει μόνο βιώσιμα μολυσματικά στοιχειώδη σωματίδια χλαμυδίων και στην περίπτωση που έχει ελάχιστες πιθανότητες επιμόλυνσεων παραμένει το πρότυπο για την αξιολόγηση δειγμάτων που προέρχονται από σεξουαλική επίθεση και κακοποίηση παιδιών [Black, 1997].

Το σημαντικότερο μειονέκτημα αυτής της τεχνικής είναι ότι απαιτεί εξαιρετικά καλά εκπαιδευμένο εργαστηριακό προσωπικό, μιας και υπάρχει τεράστιος κίνδυνος επιμόλυνσης των χώρων και του προσωπικού και εξάπλωση του μολυσματικού παράγοντα. Επιπλέον, η διαδικασία της καλλιέργειας κυττάρων είναι μια αρκετά δαπανηρή τεχνική. Από την άλλη πλευρά, ένα εξαιρετικά σημαντικό πλεονέκτημα της κυτταροκαλλιέργειας είναι η δυνατότητα συντήρησης των μελετηθέντων κυττάρων για επιπρόσθετες μελέτες, όπως ο προσδιορισμός του γονότυπου ή αντιμικροβιακές δοκιμές ευαισθησίας [Black, 1997].

Η διαδικασία της ανάπτυξης των χλαμυδίων σε κυτταροκαλλιέργεια έχει ως εξής: πραγματοποιείται εμβολιασμός δειγμάτων ύποπτα για μόλυνση με χλαμύδια σε κυτταροκαλλιέργεια με μια στιβάδα ανώτερων ευκαρυωτικών κυττάρων. Εάν υπάρχει επαρκής αριθμός βιώσιμων χλαμυδίων και στοιχειώδη σωματίδια ώστε να μολύνουν τα κύτταρα, τότε τα χλαμύδια αναπτύσσονται και σχηματίζουν ενδοκυτταροπλασματικά έγκλειστα. Τα έγκλειστα μπορούν να οπτικοποιηθούν στις 48-72 ώρες επώασης μέσω της σήμανσης πρωτεϊνών των χλαμυδίων με φθορίζοντα αντισώματα (ανοσοφθορισμός), μια τεχνική που θα αναλυθεί παρακάτω. Εναλλακτικά, τα χλαμύδια μπορούν να σημανθούν με τεχνικές χρώσης όπως η χρωστική Giemsa, το ιώδιο και η χρώση κατά Gram (Εικόνα 1.4) [Black, 1997].



Εικόνα 1.4: Τα βακτήρια *Chlamydia trachomatis* αναπτύσσονται σε κυτταροκαλλιέργειες και ανιχνεύονται από τη χρώση έγκλειστων σωματίων (όπως φαίνεται με τα βέλη) με ιώδιο.

Όσον αφορά το *Chlamydia trachomatis*, παρόλο που μπορεί να μολύνει μία ποικιλία κυττάρων, όπως HeLa 229, Hep-2 και BHK-21, εργαστηριακά γίνεται κυρίως η χρήση των κυττάρων McCoy. Επιπρόσθετα, έχει φανεί πως διαφορετικές κυτταρικές σειρές McCoy διαφέρουν εγγενώς σχετικά με την ευαισθησία τους στη μόλυνση από *C. trachomatis*. Οι 3 κυτταρικές σειρές που έχουν δοκιμαστεί με ταυτόχρονη μόλυνση του εργαστηριακού στελέχους *Chlamydia trachomatis* είναι οι UW - 184 – Ur. Η ποιότητα του κλινικού δείγματος είναι αυτή που καθορίζει την ευαισθησία της μεθόδου της κυτταροκαλλιέργειας αλλά και την επιβίωση των *Chlamydia trachomatis* κατά τη μεταφορά τους (4–8°C σε 24h) [Chernesky, 2005].

Σύμφωνα με το CDC, η τεχνική της κυτταροκαλλιέργειας χρησιμοποιείται για την ανίχνευση του χλαμυδίου σε δείγματα ουρήθρας από γυναίκες και ασυμπτωματικούς άντρες, ρινοφαρυγγικά δείγματα από βρέφη, πρωκτικά δείγματα από όλους τους ασθενείς και κοιλικά δείγματα ανήλικων κοριτσιών. Σε περιπτώσεις υποψίας σεξουαλικής κακοποίησης ή επίθεσης, πρέπει να χρησιμοποιηθούν μόνο δοκιμές καλλιέργειας για τη διάγνωση της λοίμωξης από *C. trachomatis*.

1.7.2. Άμεσος ανοσοφθορισμός

Ο άμεσος ανοσοφθορισμός αποτελεί τη διαδικασία της χρήσης φθορίζοντων αντισωμάτων προκειμένου να εντοπιστούν αντισώματα ή αντιγόνα σε κύτταρα και ιστούς. Ο φθορισμός συνιστά την εκπομπή φωτός ενός συγκεκριμένου μήκους κύματος από μία ουσία που ακτινοβολείται από φως μικρότερου κύματος. Το υπεριώδες φως (UV) πέφτει στα ηλεκτρόνια των ατόμων του φθοριοχρώματος με αποτέλεσμα τη διέγερση τους και την απελευθέρωση τους υπό τη μορφή φωτονίων. Μέρος της υπό διέγερσης ενέργειας καταναλώνεται άμεσα και ως εκ τούτου το φθοριόχρωμα εκπέμπει φως μεγαλύτερου μήκους κύματος συγκριτικά με τη διεγείρουσα ακτινοβολία [Black, 1997].

Η ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος για την εργαστηριακή διάγνωση της λοίμωξης από χλαμύδια είναι η ανίχνευση των αντιγόνων *Chlamydia trachomatis* στο κλινικό δείγμα. Κατά την τεχνική του ανοσοφθορισμού, χρησιμοποιούνται φθορίζοντα αντισώματα κατά των πρωτεϊνών LPS και MOPM. Η τεχνική του άμεσου ανοσοφθορισμού ενέχει ευαισθησία της τάξεως του 75-85% και ταυτόχρονα αποτελεί μία γρήγορη μέθοδο [Novais et al, 2004].

1.7.3 Ορολογικές μέθοδοι

Στις ορολογικές μεθόδους περιλαμβάνονται οι μέθοδοι του μικροανοσοφθορισμού και της ανοσοενζυμικής μεθόδου ELISA και της σύνδεσης του συμπληρώματος. Ο μικροανοσοφθορισμός κυριαρχεί στη διαγνωστική διερεύνηση των λοιμώξεων του γεννητικού συστήματος και η σύνδεση συμπληρώματος στη διερεύνηση του LGV (αφροδίσιου λεμφοκοκκιώματος) σε δείγμα ορού. Στο μικροανοσοφθορισμό, εντοπίζονται τα IgM και IgG αντισώματα του ορού του πλάσματος: η αναλογία τους είναι καθοριστικής σημασίας (IgM \geq 1:32 και IgG \geq 1:2000) και αποτελεί τη βάση του προσδιορισμού για τη διάγνωση της λοίμωξης από χλαμύδια [Black, 1997].

Η ανοσοενζυμική μέθοδος **ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)** είναι βιοχημική μέθοδος ανίχνευσης της παρουσίας ενός αντισώματος ή ενός αντιγόνου σε ένα δείγμα. Πιο συγκεκριμένα, η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής: αρχικά, ένα αντίσωμα προσκολλάται πάνω σε μία σταθερή επιφάνεια (Elisa sandwich) και

κατόπιν προστίθεται το δείγμα μέσα στο οποίο περιέχεται το επιθυμητό αντιγόνο και γίνεται πρόσδεση αντιγόνου-αντισώματος. Στη συνέχεια, προστίθεται αντίσωμα που ανιχνεύει το αντιγόνο και ακολουθεί ποσοτικοποίηση με την χρήση ενός ενζύμου που δεσμεύεται έμμεσα με το σύμπλοκο. Ακολούθως, προστίθεται υπόστρωμα και γίνεται ενζυμική αντίδραση που δίνει έγχρωμο σύμπλοκο το οποίο στη συνέχεια μετρίεται. Η ένταση του φωτός είναι ανάλογη με την συγκέντρωση του βιομορίου που μελετάται [Hsu *et al*, 1982].

Οι διάφορες τεχνικές της μεθόδου ELISA χρησιμοποιούνται τόσο για ποσοτική όσο και για ποιοτική ανάλυση. Η ποσοτική ανάλυση στηρίζεται στη μέτρηση της απορρόφησης του δείγματος και στη σύγκριση αυτής με μία πρότυπη καμπύλη (γρ. παράσταση), ώστε να προσδιοριστεί η συγκέντρωση του αντιγόνου ή του αντισώματος του δείγματος. Η ποιοτική ανάλυση παρέχει ενδείξεις για την ύπαρξη αρνητικού ή θετικού αποτελέσματος στο δείγμα [Hsu *et al*, 1982].

Η ανοσοενζυμική μέθοδος ELISA αποτελεί μέρος των μεθόδων ανίχνευσης του γλαμυδιακού αντιγόνου και κάνει χρήση είτε μονοκλωνικών είτε πολυκλωνικών αντισωμάτων για την ανίχνευση του γλαμυδιακού LPS που είναι περισσότερο διαλυτό από το MOMP. Η χρήση ειδικών μονοκλωνικών αντισωμάτων μπορεί να λύσει το πρόβλημα των ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων εξαιτίας της ομοιότητας με το LPS άλλων μικροβίων [Stephens *et al* , 2011].

Η ανοσοενζυμική μέθοδος είναι ιδιαίτερα σημαντική καθώς επιτυγχάνει τον έλεγχο πληθυσμιακών ομάδων, όπως εφήβων, εγκύων και των σεξουαλικών συντρόφων των μολυσμένων από γλαμύδια ατόμων, σε σύντομο χρονικό διάστημα. Όμως, σημαντική είναι η αναφορά του κινδύνου που ελλοχεύει καθώς η μέθοδος μπορεί να δώσει ψευδώς θετικά αποτελέσματα εξαιτίας της συνύπαρξης Gram-αρνητικών βακτηριδίων στο κλινικό δείγμα που προσκολλώνται αντί για τα γλαμύδια στην Fc περιοχή του αντισώματος. Άλλο ένα μειονέκτημα της μεθόδου είναι η χαμηλή της ευαισθησία που κυμαίνεται στο 65-85%. [Stephens *et al* , 2011].

Θα πρέπει να σημειωθεί πως στην περίπτωση της λοίμωξης από γλαμύδια η εφαρμογή των ορολογικών μεθόδων δεν συστήνεται καθώς τα αντισώματα ενδεχομένως να παραμείνουν στον ορό του ασθενούς για ένα μεγάλο διάστημα μετά τη θεραπευτική

του αγωγής. Επιπρόσθετα, υπάρχει η πιθανότητα εμφάνισης αυξημένων τίτλων αντισωμάτων σε άτομα χωρίς εμφανή σημάδια λοίμωξης, ενώ σε κάποια άλλα άτομα που είναι μολυσμένοι από χλαμύδια η ανοσιακή απόκριση καθυστερεί, γεγονός που θα δώσει αρνητικά αποτελέσματα στην ορολογική δοκιμασία [Stephens et al , 2011].

1.7.4 Μοριακές τεχνικές

- Η βάση των μοριακών μεθόδων είναι η ενίσχυση του νουκλεϊκού οξέος (DNA?) των χλαμυδίων οι οποίες παρά τον κίνδυνο των επιμολύνσεων παρέχουν υψηλότερη ευαισθησία συγκριτικά με την κυτταροκαλλιέργεια. Στις μοριακές μεθόδους περιλαμβάνονται οι μέθοδοι NAAT's (Nucleic Acid Amplification Tests), οι οποίες έχουν υψηλή ευαισθησία κυρίως στα δείγματα από τον πρωκτό και το φάρυγγα. .

Οι δοκιμές ενίσχυσης νουκλεϊκού οξέος (αλυσιδωτή αντίδραση λιγάσης και αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης) παρουσιάζουν σημαντικά πλεονεκτήματα, όπως ταχύτητα, απλότητα και ακρίβεια στην ανίχνευση της λοίμωξης του ουροποιητικού συστήματος από τα *Chlamydia trachomatis* [Corneli, 2005]. Η ευαισθησία των δοκιμών ενίσχυσης DNA είναι περίπου 20% μεγαλύτερη από την κυτταροκαλλιέργεια, τον άμεσο ανοσοφθορισμό και τις ενζυμικές ανοσοδοκιμασίες. Παρόλο που αποτελούν δαπανηρότερες μεθόδους αυξάνουν τη διαγνωστική ικανότητα για τη λοίμωξη από χλαμύδια σε ποσοστό 98 -99,9% [Novais et al, 2004].

Κεφάλαιο 2: Η θεραπευτική προσέγγιση

2.1. Θεραπεία λοιμώξεων προερχόμενες από χλαμύδια

Όπως προαναφέρθηκε η μόλυνση από χλαμύδια εξαρτάται από το είδος του χλαμυδίου και πολλές φορές δεν είναι αυτή καθαυτή που απειλεί την ανθρώπινη ζωή και την ποιότητα της, αλλά οι επιπλοκές που προέρχονται από την ευαισθησία του ανοσοποιητικού συστήματος, το οποίο δεν είναι ικανό να αντιμετωπίσει άλλες μολύνσεις από άλλα βακτήρια ή ιούς.

Τα πρωτογενή αντιβιοτικά, οι τετρακυκλίνες και η αζιθρομυκίνη είναι εξαιρετικά αποτελεσματικά στη θεραπεία των χλαμυδιακών λοιμώξεων (Workowski et al., 2002). Δραστικά φάρμακα για τη θεραπευτική αντιμετώπιση των λοιμώξεων από στελέχη *C. trachomatis* σε καλλιέργειες ιστών περιλαμβάνουν κάποιες φθοροκινολόνες, τετρακυκλίνες, κλινδαμυκίνη, μακρολίδες και ριφαμυκίνες (Stamm, 2008). Εξαιρετικά αποτελεσματική θεωρείται η χρήση των ριφαμυκινών, ωστόσο είναι εύκολο να αναπτυχθεί ανθεκτικότητα σε αυτές. Στα γενικευμένα χλαμύδια δεν χρησιμοποιούνται οι σουλφοναμίδες παρότι τα στελέχη *C. trachomatis* είναι ιδιαίτερος ευαίσθητα (Schachter & Stephens, 2008). Η οφλοξακίνη, όπως και η λεβοφλοξασίνη είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικές αλλά έχουν μεγάλο οικονομικό κόστος (Centers for Disease Control, 2010).

Η ερυθρομυκίνη είναι αποτελεσματική στη θεραπεία των χλαμυδίων, αλλά επιφέρει παρενέργειες, οι οποίες μπορεί να μειώσουν τη συμμόρφωση του ασθενή με την αγωγή. Τα εναλλακτικά σχήματα μπορεί να περιλαμβάνουν βάση ερυθρομυκίνης (500 mg τέσσερις φορές την ημέρα για 7 ημέρες), αιθυλοηλεκτρική ερυθρομυκίνη (800 mg 4 φορές την ημέρα για επτά ημέρες), οφλοξακίνη (300 mg 2 φορές την ημέρα για 7 ημέρες) ή λεβοφλοξασίνη (για περίοδο 7 ημερών) (Centers for Disease Control, 2010).

Στα πλαίσια της θεραπευτικής αντιμετώπισης περιλαμβάνεται και η προληπτική πολιτική του εμβολιασμού, η οποία ενισχύεται ως επιλογή δεδομένης της ασυμπτωματικής φύσης των χλαμυδίων που δυσχεραίνει την έγκαιρη διάγνωσή τους. Η

ανοσία του ξενιστή που προκαλείται από τις γλαμυδιακές λοιμώξεις δεν είναι μακράς διάρκειας και μπορεί να διαρκέσει αρκετούς μήνες ή χρόνια, ενώ παράλληλα μία μόνο μόλυνση με *C. trachomatis* δεν προστατεύει επαρκώς έναντι της επανάληψης της [Schachter et al, 2008]. Σημαντικός είναι και ο παράγοντας της επιθετικής θεραπείας, η οποία μπορεί να αμβλύνει τη φυσιολογική ανοσία του ασθενή (Rekart & Brunham, 2008). Ως εκ τούτου, η διαχείριση των γλαμυδίων θα πρέπει να εξαρτηθεί από ένα ασφαλές και αποτελεσματικό εμβόλιο για καλύτερη ανοσοαπόκριση (συγκριτικά με τη φυσική διαδικασία).

2.2. Επιπλοκές της θεραπείας των λοιμώξεων προερχόμενες από γλαμύδια

Η συνοσηρότητα των γλαμυδίων με άλλους βακτηριακούς, ιϊκούς και παρασιτικούς οργανισμούς αποτελεί τροχοπέδη στη θεραπευτική αντιμετώπιση τους. Για παράδειγμα, περίπου το 60% των ατόμων που έχουν μόλυνση των γεννητικών οργάνων από *Neisseria gonorrhoea* έχουν και μόλυνση από *C. trachomatis*. Συχνή συνύπαρξη αποτελεί επίσης και η μόλυνση των *C. trachomatis* με βακτήρια του είδους *Treponema pallidum*. Οι καταστάσεις αυτές οδηγούν σε επιπλοκές στην θεραπευτική προσπάθεια [Donati et al., 2009]. Η μόλυνση από *T. pallidum* ή *N. gonorrhoeae* μπορεί να θεραπευτεί με τη χορήγηση αντιβιοτικών β-λακτάμης, μία αντιμετώπιση όμως που επιταχύνει την ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό σε περίπτωση συνοσηρότητας με γλαμύδια [Stamm et al, 2010]. Προκειμένου να αποφευχθεί μία τέτοια κατάσταση που αντί να θεραπεύσει θα ενισχύσει την ανθεκτικότητα των γλαμυδίων, είναι αναγκαία η προσεκτική αξιολόγηση της θεραπευτικής αντιμετώπισης με αντιβιοτικά ευρέος φάσματος για βακτηριακές λοιμώξεις των γεννητικών οργάνων.

Επιπλέον, η διεθνής βιβλιογραφία αναφέρει πως στην περίπτωση που διακοπεί ο φυσιολογικός κύκλος ανάπτυξης των γλαμυδίων κατά τη θεραπευτική τους αντιμετώπιση τότε πολύ πιθανόν να επέλθει επίμονη και μακροχρόνια μόλυνση, ανθεκτική στη θεραπεία με αντιβιοτικά. Η κατανόηση και η εις βάθος μελέτη του φαινομένου αυτού είναι επιτακτική, δεδομένων των σοβαρών επαγόμενων επακόλουθων από την επίμονη

φλεγμονή με χλαμύδια, όπως τύφλωση, αρθρίτιδα, άσθμα, στειρότητα, πυελική φλεγμονώδης νόσος και αρτηριοσκλήρωση [Geisler, 2010].

2.3. Ανθεκτικότητα των χλαμυδίων σε μεμονωμένες κατηγορίες αντιβιοτικών

Τα χλαμύδια του αναπνευστικού όσο και του γεννητικού συστήματος εμπλέκονται σε μακροχρόνιες λοιμώξεις παρουσιάζοντας ανθεκτικότητα στην θεραπευτική αντιμετώπιση με αντιβιοτικά. Τα χλαμύδια αποκτούν αντοχή μέσω μεταλλάξεων σε έξι κύριες κατηγορίες αντιβιοτικών. Ο παρακάτω πίνακας (Πίνακας 2.1) περιγράφει την κατανομή της ανθεκτικότητας των διαφόρων στελεχών στα αντιβιοτικά [Sandoz et al, 2010].

Πίνακας 2.1: Η κατανομή της *in vitro* και φυσικής αντίστασης των διαφόρων στελεχών των χλαμυδίων στα αντιβιοτικά σύμφωνα με τους Sandoz & Rockey (2010).

Antibiotic group	Antibiotics	Mechanism of action	C. trachomatis	C. muridarum	C. suis	Cp. pneumoniae	Cp. psittaci	Cp. caviae	Chlamydia-like
Macrolides	Azithromycin	Protein synthesis	S	-	-	-	S	S	-
Tetracyclines		Protein synthesis	R	R	H, R	-	-	-	-
β-lactams		Peptidoglycan synthesis	N	N	N	N	N	N	-
Rifamycins	Rifampin(N) Rifalazil (Z)	RNA polymerase	S _{NZ} , R _N	S _N , R _N	S _N , R _N	S _{NZ}	S _N	S _N	-
Fluoroquinolones	Ofloxacin (O) Sparfloxacin (S) Moxifloxacin (M)	DNA gyrase	S _{OS} , R _O	S _O , R _O	S _O , R _O	S _M	-	-	N
Sulfonamides		Folate synthesis	R	-	U	N	N [†]	-	-
Trimethoprim		Folate synthesis	S, R	-	-	-	N	-	-
Lincosamides		Protein synthesis	S, R	-	-	-	-	-	-
Aminoglycosides	Kasugamycin (K) Spectinomycin (S)	Protein synthesis	S _K	-	-	-	S _{KS} , R _{KS} S _{KS} , R _{KS}	-	-
Fosfomycin		Peptidoglycan synthesis	N	-	-	-	-	-	-

Στα επόμενα υποκεφάλαια θα αναλυθεί η ανθεκτικότητα που παρουσιάζουν τα χλαμύδια σε αντιβιοτικά όπως οι ριφαμυκίνες, οι τετρακυκλίνες, οι αμινογλυκοσίδες, τα σουλφοναμίδια, η τριμεθοπρίμη, οι μακρολίδες, οι φθοροκινολόνες και οι λιβκοσαμίδες.

2.3.1. Ριφαμυκίνες

Οι ριφαμυκίνες αποτελούν βακτηριοκτόνα αντιβιοτικά που αλληλεπιδρούν με την β-υπομονάδα της RNA πολυμεράσης για την αναστολή της βακτηριακής μεταγραφής. Έκθεση των στελεχών των *C. caviae*, *C. psittaci*, *C. suis*, *C. trachomatis*, *C. pneumoniae* και *C. muridarum* σε υπο-ανασταλτικές συγκεντρώσεις ριφαμυκινών έχει αναδείξει την ταχεία εμφάνιση ανθεκτικότητας [Binet & Maurelli, 2005; Kutlin et al., 2005; Dreses-Werringloer et al., 2003]. Πολλά βακτηριακά είδη αναπτύσσουν αντίσταση εξαιτίας μεταλλαγών στα νουκλεοτίδια του γονιδίου *rpoB* που κωδικοποιεί τη β-υπομονάδα της RNA πολυμεράσης. Παρομοίως, τα ανθεκτικά στις ριφαμυκίνες *Chlamydiae* φέρουν μια ποικιλία συντηρημένων και σημειακών μεταλλαγών στα νουκλεοτίδια της κεντρικής περιοχής του *rpoB*. Μία μοναδική αντικατάσταση αμινοξέος αρκεί για να οδηγήσει σε χαμηλού επιπέδου αντίσταση, ωστόσο οι σημειακές αυτές μεταλλάξεις φαίνεται πως αυξάνουν το MIC (ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση) από 0,008 mg/ml σε μεταξύ 0,5 mg/ml και 64 mg/ml σε ορό Serum D του *C. trachomatis* [Suchland et al., 2005].

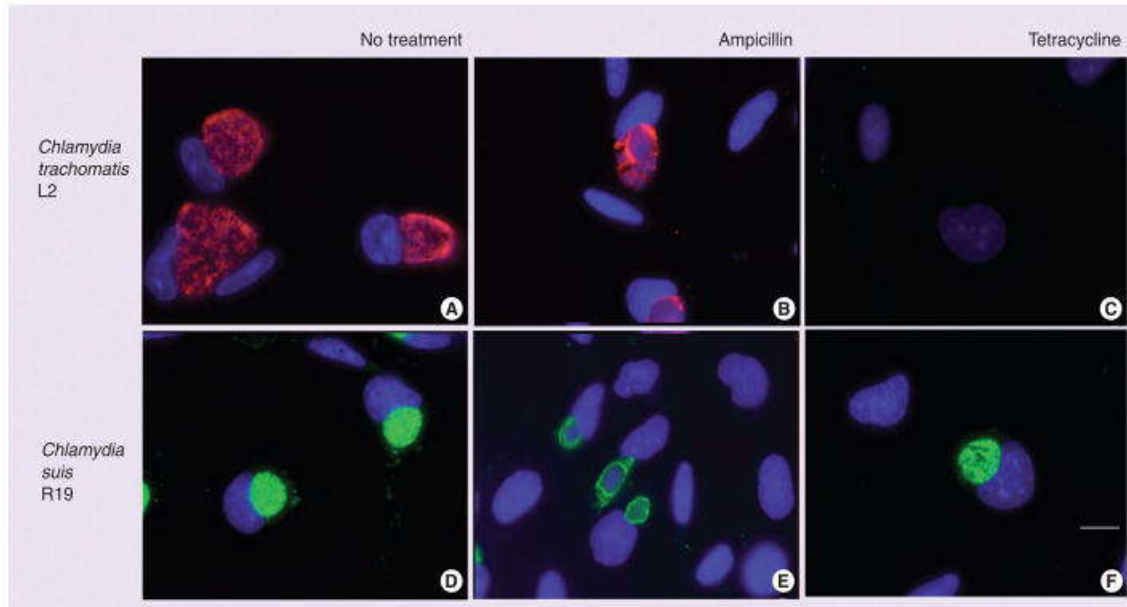
Προηγούμενες εργασίες των Kutlin et al (2005) και Rothstein et al (2008) επιβεβαίωσαν ότι η ανάπτυξη στελεχών *C. pneumoniae* ανθεκτικών στις ριφαμυκίνες οφείλεται ως επί το πλείστον σε μεταλλάξεις στο γονίδιο *rpoB*. Τόσο το στέλεχος TW-183 του *C. trachomatis*, όσο και το *C. pneumoniae* αναπτύσσουν αντοχή στο Rifalazil (ημισυνθετικό παράγωγο της ριφαμυκίνης) όταν διέρχονται σε υπο-ανασταλτικές συγκεντρώσεις του φαρμάκου, η ύπαρξη του οποίου τα οδηγεί να αναπτύξουν απόκριση μεταλλάσσοντας το *rpoB* γονίδιό τους [Kutlin et al., 2005].

2.3.2. Τετρακυκλίνες

Οι τετρακυκλίνες αποτελούν ένα από τα κατεξοχήν χρησιμοποιούμενα σε ευρύ φάσμα αντιβιοτικά, καθώς θεωρούνται ιδιαίτερα αποτελεσματικά και έχουν χαμηλό κόστος. Έχουν χρησιμοποιηθεί από τη δεκαετία του '50 για τη θεραπεία λοιμώξεων από γλαμύδια τόσο στα ζώα όσο και στους ανθρώπους. Όσον αφορά τα ζώα, παλαιότερα οι βιομηχανίες ενσωμάτωναν τετρακυκλίνες στις ζωοτροφές για την πρόληψη λοιμώξεων. Η βασική τους δράση αφορά την αναστολή των βακτηριδιακών πρωτεϊνών μέσω της δέσμευσης της ριβοσωμικής υπομονάδας. Ωστόσο, η ευρεία χρήση τους κυρίως στα ζώα (όπως στους χοίρους) πέρα από προβληματισμούς σχετικά με την ανθρώπινη υγεία, έχει

δημιουργήσει και ανθεκτικότητα στα συγκεκριμένα αντιβιοτικά. (αυτή την πρόταση μην την πετάξεις, απλά δεν μπορώ να το βγάλω)

Οι τετρακυκλίνες είναι αποτελεσματικές κατά των Gram-αρνητικών και Gram-θετικών βακτηρίων, των άτυπων βακτηριδίων (*Chlamydia*, *Mycoplasma*, *Rickettsia*) και κάποιων πρωτόζωων, ενώ παρουσιάζουν καλή απορρόφηση και χαμηλή τοξικότητα (Michalova, Novotna & Schlegelova, 2004). Η αντίσταση στις τετρακυκλίνες ανακαλύφθηκε για πρώτη φορά το 1953 κατά την απομόνωση στελεχών του βακτηρίου *Shigella dysenteriae*. Έρευνες σε κυτταροκαλλιέργειες κυττάρων McCoy, τα οποία επιμολύνονται με χλαμύδια και στην συνέχεια στην μολυσμένη καλλιέργεια επιδρά αντιβιοτικό, κατέδειξαν την ανθεκτικότητα των χλαμυδίων στην τετρακυκλίνη. Συγκεκριμένα, οι Sandoz & Rockey (2010) χρησιμοποίησαν τα στελέχη *Chlamydia trachomatis* L2/434Bu και *Chlamydia suis* R19, στην καλλιέργεια των οποίων πρόσθεσαν αμπικιλίνη και τετρακυκλίνη. Παρατήρησαν λοιπόν, ανθεκτικότητα των *C. trachomatis* στην αμπικιλίνη και των *C. suis* στην αμπικιλίνη και στην τετρακυκλίνη (Εικόνα 2.1) [Sandoz & Rockey, 2010].



Εικόνα 2.1: Εικόνες μικροσκοπίας φθορισμού κυττάρων McCoy που έχουν προσβληθεί από *Chlamydia trachomatis* L2 / 434Bu- ή ανθεκτικά στην τετρακυκλίνη *Chlamydia suis* R19: Τα μολυσμένα κύτταρα καλλιεργήθηκαν παρουσία είτε 10 µg/ml αμπικιλίνης, είτε 1 µg/ml τετρακυκλίνης ή δεν υποβλήθηκαν σε αγωγή με αντιβιοτικό. Το *C. trachomatis* σημαίνεται με αντισώματα έναντι της MOMP (κόκκινο) και το *C. suis* με αντισώματα έναντι του LPS (πράσινο). Το DNA σημαίνεται με μπλε χρώμα με DAPI, το οποίο χαρακτηρίζει κυρίως τους κυτταρικούς πυρήνες του ξενιστή.

Οι τετρακυκλίνες δρουν παρεμποδίζοντας τη σύνθεση των βακτηριακών πρωτεϊνών με την αποτροπή της αλληλεπίδρασης του αμινοακυλο-tRNA με τα ριβοσώματα. Οι μηχανισμοί με τους οποίους τα βακτήρια αποκτούν αντοχή στις τετρακυκλίνες περιλαμβάνουν τα ένζυμα τροποποίησης του φαρμάκου, τη μετάλλαξη του φαρμακευτικού στόχου και τη χρήση εξειδικευμένων πρωτεϊνών ριβοσωμικής προστασίας [Nguyen *et al.*, 2014; Chopra & Roberts, 2001]. Μέχρι το 2005 είχαν ανακαλυφθεί 38 γονίδια που κωδικοποιούν ριβοσωμικές πρωτεΐνες προστασίας ή ένζυμα απενεργοποίησης [Roberts, 2005]. Αρκετά από τα γονίδια ανθεκτικότητας κωδικοποιούν πρωτεΐνες που λειτουργούν έναντι μίας ευρείας περιοχής παραγώγων των τετρακυκλινών και αποδείχθηκε πως τα γλαμύδια παρουσιάζουν σταθερή αντιμικροβιακή αντίσταση σε αυτές. Το 1995 προσδιορίστηκαν 8 ανεξάρτητα στελέχη που παρουσίασαν αντοχή υψηλού επιπέδου στις τετρακυκλίνες, εκ των οποίων τα 6 παρουσίασαν σταθερή αντοχή στη σουλφαδιαζίνη [Lenart *et al.*, 2001].

2.3.3. Αμινογλυκοσίδες

Οι αμινογλυκοσίδες αλληλεπιδρούν με την 30S ριβοσωμική υπομονάδα των βακτηρίων? παρεμποδίζοντας την έναρξη της μετάφρασης, ενώ έχουν μικρή διείσδυση σε κύτταρα θηλαστικών οδηγώντας σε τιμές MIC (ελάχιστες ανασταλτικές συγκεντρώσεις) που είναι εξαιρετικά υψηλές (~1 mg/ml) για χλαμύδια [Binet & Maurelli, 2009a]. Η σπεκτινομυκίνη και η κασουγαμυκίνη χρησιμοποιούνται στο εργαστήριο για την παραγωγή στελεχών χλαμυδίων ανθεκτικών στις αμινογλυκοσίδες. Ανθεκτικά στελέχη 6BC του *C. psittaci* που εξετάστηκαν (συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από το MIC), έφεραν μεταλλάξεις στο γονίδιο *16S rRNA* στη θέση πρόσδεσης της κασουγαμυκίνης [Binet & Maurelli, 2009b]. Αντιθέτως, στελέχη *C. trachomatis* ανθεκτικά στην κασουγαμυκίνη που μελετήθηκαν σε καλλιέργεια με υπο-ανασταλτικές συγκεντρώσεις του αντιβιοτικού, διαπιστώθηκε πως δεν παρουσίασαν μετάλλαξη στο *16S rRNA*, αλλά έφεραν μια εισαγωγή δύο νουκλεοτιδίων στο γονίδιο *ksgA* που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη KsgA, υπεύθυνη για την μετα-μεταγραφική μεθυλίωση υπολειμμάτων ριβοσωματικής αδενοσίνης σε άλλα βακτήρια [Binet & Maurelli, 2009b].

Παρόμοια με την κασουγαμυκίνη, η *in vitro* παραγόμενη ανθεκτικότητα στην σπεκτινομυκίνη σχετίζεται με μεταλλάξεις στο γονίδιο του *16S rRNA*. Η καλλιέργεια στελεχών *C. psittaci* 6BC σε υπο-ανασταλτικές συγκεντρώσεις σπεκτινομυκίνης είχε ως αποτέλεσμα την ανακάλυψη 4 διαφορετικών μεταλλάξεων που προκαλούν ανθεκτικότητα. Οι σημειακές αυτές μεταλλάξεις στο *16S rRNA* διέφεραν στην καταλληλότητά τους σε δοκιμασίες ανταγωνισμού με το αγρίου τύπου στέλεχος *C. psittaci*. Μία εξ αυτών δεν επέφερε σημαντική επίδραση στη φυσική κατάσταση των βακτηριδίων, ενώ οι άλλες 3 που εντοπίζονται σε γειτονικά νουκλεοτίδια μείωσαν σημαντικά τη βακτηριακή κατάσταση [Binet & Maurelli, 2009a].

2.3.4. Σουλφοναμίδια και τριμεθοπρίμη

Τα αντιβιοτικά σουλφοναμίδια και τριμεθοπρίμη δρουν μέσω της παρεμπόδισης της σύνθεσης του βακτηριακού φυλλικού οξέος που είναι καθοριστικό για την επιδιόρθωση και μεθυλίωση του DNA. Στελέχη *C. trachomatis* καλλιεργημένα *in vitro*

σε υπο-ανασταλτικές συγκεντρώσεις της τριμεθοπρίμης παρουσίασαν σταθερές μεταλλάξεις με ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις [Demars *et al.*, 2007].

Τα *C. psittaci* 6BC, *C. suis* και *C. trachomatis* L2, με εξαίρεση κάποιων στελεχών ανθεκτικών στις τετρακυκλίνες, είναι σε όλο το εύρος τους ευαίσθητα στα σουλφοναμίδια. Ταυτόχρονα, τα δοκιμασμένα στελέχη του *C. psittaci* και τα στελέχη του *C. pneumoniae* είναι φυσικά ανθεκτικά στο αντιβιοτικό αυτό. Έχει καταδειχθεί πως ειδικές επαναλήψεις, παρεμβολές και σημειακές μεταλλάξεις στο γονίδιο *folP* προσδίδουν αντίσταση στα φάρμακα της σουλφαίνης, ενώ φαίνεται πως προσδίδουν αντίσταση και στην τριμεθοπρίμη [Sköld, 2001].

2.3.5. Μακρολίδες

Η αζιθρομυκίνη αποτελεί φάρμακο πρώτης γραμμής για την θεραπευτική αντιμετώπιση των χλαμυδίων όντας αναστολέας της βακτηριακής πρωτεϊνικής σύνθεσης. Προκειμένου να εξακριβωθεί η αντίσταση των χλαμυδίων στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό επιλέχθηκε το στέλεχος L2 του *C. trachomatis* σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις αζιθρομυκίνης, ενώ η αντοχή υψηλού επιπέδου εξετάστηκε σε στελέχη *C. psittaci* 6BC και *C. caviae* GPIC [Binet *et al.*, 2010].

Η καλλιέργεια ανθεκτικότητας ήταν ανεπιτυχής σε απομονωμένα κλινικά προϊόντα με *C. pneumoniae* με αυξημένα MIC στην αζιθρομυκίνη, ενώ τα ανθεκτικά στην αζιθρομυκίνη στελέχη του *C. psittaci* ήταν επίσης ανθεκτικά σε άλλες μακρολίδες και στην λινκοσαμίδα που μοιράζονται παρόμοιες θέσεις στόχου του 23S rRNA. Τα ανθεκτικά στελέχη ήταν σταθερά και επιβίωσαν στη μετάβαση απουσία του αντιβιοτικού. Επιπλέον, το ανθεκτικό στην αζιθρομυκίνη στέλεχος *C. trachomatis* παρουσίασε μία μετάλλαξη στο γονίδιο *rplD* που κωδικοποιεί την ριβοσωματική πρωτεΐνη L4 [Riska *et al.*, 2004].

2.3.6. Φθοροκινολόνες

Οι φθοροκινολόνες είναι βακτηριοκτόνα αντιβιοτικά που αναστέλλουν την τοποϊσομεράση II και IV του DNA [Jacoby, 2005]. Έχει επιβεβαιωθεί πως τα στελέχη *C.*

suis, *C. muridarum* και *C. trachomatis* μπορούν να αναπτύξουν αντίσταση σε περιβάλλον με κινολόνη *in vitro*, όταν εκτίθενται σε υπο-ανασταλτικές συγκεντρώσεις αντιβιοτικού. Το MIC των στελεχών *C. trachomatis* αυξήθηκε από 1 έως 64 mg/ml μετά από 4 στάδια σε 0,5 mg/ml οφλοξακίνης, ενώ παρόμοιο αποτέλεσμα εντοπίστηκε μετά από 4 στάδια σε 0,015 mg/ml σπαρφλοξασίνης [Suchland *et al.*, 2009; DeMars & Weinfurter, 2008; Demars *et al.*, 2007].

Η ανθεκτικότητα στελεχών του *C. trachomatis* στην κινολόνη έχει διαπιστωθεί ότι οφείλεται σε μετάλλαξη στην περιοχή προσδιορισμού της αντοχής στην κινολόνη του γονιδίου *gyrA*, ενώ υποκατάσταση αμινοξέων στην ίδια περιοχή ενέχεται και στην ανθεκτικότητα του *C. pneumoniae* στην μοξιφλοξασίνη [Rupp *et al.*, 2005]. Παρόμοιες μεταλλάξεις του *gyrA* προωθούν τη φυσική αντίσταση στην κινολόνη τόσο σε στελέχη του *C. muridarum* όπως και σε άλλους γλαμυδιακούς τύπους (*Parachlamydia acanthamoebae*, *Neochlamydia hartmannellae*, *Simkania negevensis*, *Waddlia chondrophila*) [Goy & Greub, 2009; Greub, 2009].

2.3.7. Λιβκοσαμίδες

Η λινκομυκίνη αποτελεί έναν αναστολέα της βακτηριοστατικής πρωτεϊνικής σύνθεσης που προκαλεί πρόωρη διάσπαση του πεπτιδυλο-tRNA από το ριβόσωμα [Tenson *et al.*, 2003]. Οι Demars *et al.* (2007) ανέφεραν μία μοναδική εργαστηριακή παρατήρηση σχετικά με γονιδιακές μεταλλάξεις των στελεχών *C. trachomatis* ανθεκτικών στην λινεσοκίνη, οι οποίες ανιχνεύθηκαν σε πολύ χαμηλές συχνότητες μέσω της καλλιέργειας μολυσμένων κυττάρων σε υπο-ανασταλτικές συγκεντρώσεις αντιβιοτικού. Τα μολυσμένα κύτταρα έφεραν μετάλλαξη και στα δύο γονίδια *23S rRNA*, που αντιστοιχούσαν σε περιοχές στην *E. Coli* που παρείχαν παρόμοια αντίσταση.

Κεφάλαιο 3: Γονίδια που ευθύνονται για την εμφάνιση ανθεκτικότητας των κλινικών στελεχών γλαμυδίων στα αντιβιοτικά

Όπως αναφέρθηκε εκτενώς στο προηγούμενο κεφάλαιο, πολλές φορές η θεραπεία κατά της λοίμωξης των γλαμυδίων είναι αναποτελεσματική, καθώς τα στελέχη και τα είδη των γλαμυδίων μπορεί να αναπτύξουν φυσική ανθεκτικότητα σε μεγάλο αριθμό αντιβιοτικών που χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπισή τους. Η ικανότητα των γλαμυδίων για απόκριση στην "επίθεση" του αντιβιοτικού αποτελεί ικανότητα όλων των μικροοργανισμών, ενώ το φαινόμενο, γνωστό ως μικροβιακή αντοχή/ανθεκτικότητα, θεωρείται εξελικτική διαδικασία [Munita *et al*, 2016]. Η "επιβίωση του ικανότερου" είναι συνέπεια μιας εκτεταμένης γενετικής πλαστικότητας των μικροοργανισμών και των παθογόνων παραγόντων που ενεργοποιούν ειδικές αντιδράσεις με αποτέλεσμα τη δημιουργία μεταλλάξεων προσαρμογής, πρόσληψη εξωγενούς γενετικού υλικού ή αλλοίωση της γονιδιακής έκφρασης που παράγει αντίσταση σε σχεδόν όλα τα αντιβιοτικά που διατίθενται σήμερα στην κλινική πρακτική [Munita *et al*, 2016]. Αυτή η ιδιαιτερότητα των μικροοργανισμών τους επιτρέπει να ανταποκριθούν σε τεράστιο αριθμό περιβαλλοντικών αλλαγών, συμπεριλαμβανομένης της παρουσίας αντιβιοτικών μορίων που μπορεί να θέσουν σε κίνδυνο την βιωσιμότητά τους και κατ' επέκταση την ύπαρξη ολόκληρου του είδους και του γένους τους. Με στόχο την εξελικτική διατήρησή τους, έχουν αναπτύξει αρχαίους μηχανισμούς για να αντέξουν το αποτέλεσμα του επιβλαβούς αντιβιοτικού μορίου και συνεπώς, η εγγενής αντίστασή τους επιτρέπει να ευδοκιμήσουν στην παρουσία του.

Οι μικροοργανισμοί ως επί το πλείστον χρησιμοποιούν δύο σημαντικές γενετικές στρατηγικές μικροβιοανθεκτικότητας, μεταλλάξεις σε γονίδιο/α που συχνά συνδέονται με το μηχανισμό δράσης της ένωσης και πρόσληψη εξωγενούς DNA που κωδικοποιεί την ανθεκτικότητα μέσω οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων [Munita *et al*, 2016]. Όπως και οι υπόλοιποι μικροοργανισμοί, έτσι και τα γλαμύδια ανεξάρτητα είδους, προσαρμόζονται στην ύπαρξη αντιβιοτικού στο περιβάλλον τους, στρατολογώντας τον μηχανισμό μικροβιοανθεκτικότητάς τους. Μεγάλο πλήθος μελετών έχει ερευνήσει τους μηχανισμούς αυτούς και τα γονίδια που μεταλλάσσονται ώστε τα γλαμύδια να

αποκτήσουν ανθεκτικότητα σε πληθώρα αντιβιοτικών όπως οι τετρακυκλίνες, οι κινολόνες, οι μακρολίδες, οι ριφαμυκίνες κ.α.

Όπως αναφέρουν οι *Somani et al* (2000) υπάρχουν κλινικά στελέχη των *Chlamydia trachomatis* που παρουσιάζουν αντίσταση στην αζιθρομυκίνη ενισχύοντας έτσι την υποτροπή της λοίμωξης. Η αντίσταση αυτή σχετίζεται συχνά με μεταλλάξεις των γονιδίων των ριβοσωματικών πρωτεϊνών, ιδιαίτερα των L4 και L22, καθώς και με μεταλλάξεις στην περιοχή πεπτιδυλο-τρανσφεράσης του γονιδίου 23S rRNA [*Pihlajamäki et al.*, 2002; *Vester et al*, 2001].

Σύμφωνα με τους *Kohlhoff & Hammerschlag* (2015) τα στελέχη *C. pneumoniae* και *C. trachomatis* έχουν *in vitro* ευαισθησία σε ένα ευρύ φάσμα αντιβιοτικών, όπως οι τετρακυκλίνες, οι κινολόνες, οι μακρολίδες και ριφαμυκίνες. Η (*in vitro*) έκθεση τους σε αντιβιοτικά β-λακτάμης προκαλεί μετατροπή του *C. trachomatis* RB στο φαινότυπο AB (*Kintner et al.*, 2014). Τα στελέχη του *C. trachomatis* παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στις ριφαμυκίνες μέσω των μεταλλάξεων στο γονίδιο της β-υπομονάδας της πολυμεράσης, *proB*, στις μακρολίδες μέσω των μεταλλάξεων του γονιδίου 23S rRNA και στις κινολόνες μέσω των μεταλλάξεων στο γονίδιο της DNA τοποϊσομεράσης, *gyrA*, όταν καλλιεργηθούν παρουσία υπο-ανασταλτικών συγκεντρώσεων αντιβιοτικών (*Borel et al.*, 2016).

Οι *Misyurina et al* (2004) επεδίωξαν την εύρεση κλινικών απομονωμένων στελεχών *Chlamydia trachomatis* ανθεκτικών σε μακρολίδια και διερεύνησαν πιθανές μεταλλάξεις στα γονίδια 23S rRNA, L22 και L4. Οι συμμετέχοντες που έλαβαν μέρος στη μελέτη ήταν 4 και οι ερευνητές έλαβαν τα προϊόντα απομόνωσης *Chlamydia trachomatis* κατά την περίοδο 2000-2002. Οι ερευνητές τοποθέτησαν τα κύτταρα McCoy σε πλάκες καλλιέργειας κυττάρων και επώαστηκαν στους 37 °C για 24 ώρες. Η κυτταρική μονοστιβάδα μολύνθηκε με ένα ενοφθάλμισμα το οποίο παρήγαγε 20 έως 30 έγκλειστα ανά πεδίο υπό μεγέθυνση x 400. Τα μολυσμένα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν στα 1.700 x g για μία ώρα και επώαστηκαν για 2 ώρες στους 37 °C, ενώ τα κύτταρα πλύθηκαν με 0,5 ml μέσου Eagle.

Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν οι αντιβακτηριακοί παράγοντες ερυθρομυκίνη, δαζαμυκίνη και η αζιθρομυκίνη και έγινε χρήση του ανοσοφθορισμού. Προκειμένου να προσδιοριστούν οι ελάχιστες βακτηριοκτόνες συγκεντρώσεις τα κύτταρα πλύθηκαν από το αντιβιοτικό 72 ώρες μετά τη μόλυνση και η μονοστιβάδα των νωπών κυττάρων επανεμφανίστηκε. Ο παρακάτω πίνακας περιγράφει την ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά των *Chlamydia trachomatis*, παρουσία ή όχι μεταλλάξεων στα γονίδια *23S rRNA* και *L22*, όπως διαπιστώθηκε στη μελέτη αυτή (Misyurina et al., 2004).

Πίνακας 3.1: Η ανθεκτικότητα των *Chlamydia trachomatis* στα αντιβιοτικά σχετιζόμενων με μεταλλάξεις στα γονίδια *23S rRNA* και *L22* [Misyurina et al., 2004]

Patient and description	Isolate and date obtained	Antibiotic susceptibility (µg/ml)						Sero-type	Mutation	
		Erythromycin		Azithromycin		Josamycin			23S rRNA ^a	L22 ^b
		MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC			
1, chronic salpingitis	1, 4/10/2000	>5.12	>5.12	>5.12	>5.12	>5.12	>5.12	G	+	-
2, endocervicitis (the first episode of infection was observed in 1997; spiramycin was used for treatment)	2, 1/5/2000	>5.12	>5.12	>5.12	>5.12	>5.12	>5.12	D	+	+
3, vaginal discharge (treated with josamycin [500 mg] twice daily from 12/12/2001 to 12/21/2001)	3-1 (before treatment), 1/5/2000	0.16	0.16	0.08	0.08	0.04	0.04	B	-	+
	3-2 (after treatment), 10/20/2001	0.16	0.32	0.08	0.08	0.04	0.04	B	-	+
4, urethritis (treated with josamycin [500 mg] twice daily from 6/26/2002 to 7/5/2002)	4-1 (before treatment), 6/17/2002	>5.12	>5.12	>5.12	>5.12	>5.12	>5.12	I	+	+
	4-2 (after treatment), 10/2/2002	>5.12	>5.12	>5.12	>5.12	>5.12	>5.12	I	+	+
7, <i>trachomatis</i> reference strain D/UW-3/Cx (ATCC VR-885)		0.04	0.16	0.02	0.02	0.04	0.08	D	-	-

Η μελέτη διαπίστωσε πως ένα κλινικό προϊόν απομόνωσης *C. trachomatis* μπορεί να περιέχει οργανισμούς που διαφέρουν στο επίπεδο ευαισθησίας στα αντιβιοτικά. Μερικοί εξ αυτών ήταν ανθεκτικοί στα μακρολίδια και έφεραν μεταλλάξεις στο *23S rRNA* γονίδιο, ενώ άλλοι που ήταν εξίσου ανθεκτικοί δεν παρουσίασαν κάποια τέτοια μετάλλαξη. Επιπλέον διαπιστώθηκε πως βιωσιμότητα των βακτηρίων που φέρουν τις μεταλλάξεις και στα δύο αλληλόμορφα του γονιδίου *23S rRNA* είναι χαμηλή (Misyurina et al., 2004).

Οι *Andersen et al* (1998) χρησιμοποίησαν το πρότυπο στέλεχος S45 του *C. Suis*, το οποίο απομονώθηκε από κόπρανα ασυμπτωματικού χοίρου στην Αυστρία στα τέλη της δεκαετίας του '60 και έχει διαπιστωθεί η ευαισθησία του στις τετρακυκλίνες (Tet^R). Συγκεκριμένα έχει διαπιστωθεί η ανθεκτικότητα 8 στελεχών στο αντιβιοτικό και επιπλέον, 6 από τα 8 στελέχη παρουσίασαν ανθεκτικότητα και στη σουλφαδιαζίνη (*Andersen & Rogers*, 1998).

Ο σταθερός φαινότυπος *C. suis* Tet^R συνδέθηκε με το γονίδιο αντίστασης *tetC* και 7 στελέχη Tet^R περιείχαν τα 4 σχετικά γονίδια που είχαν μεταφερθεί στα χρωμοσώματα. Και τα 7 ανθεκτικά στελέχη έφεραν το *tetC* γονίδιο και τον καταστολέα των τετρακυκλινών Tet^R και αποτέλεσαν το πρώτο παράδειγμα αντιβιοτικής αντοχής που αποκτήθηκε σε ένα υποχρεωτικό ενδοκυτταρικό βακτήριο μέσω οριζόντιας γονιδιακής μεταφοράς (*Dugan et al.*, 2004).

Η μελέτη των *Tian et al* (2015) εξέτασε την οριζόντια γονιδιακή μεταφορά του 16S rRNA σε προκαρυωτικούς οργανισμούς και εξήγησε 4 στελέχη *C. trachomatis* με γονίδια 16S rRNA από το *C. suis*. Το γεγονός αυτό αναδεικνύει ότι *C. trachomatis* φέρουν τα γονίδια 16S rRNA από το *C. Suis* και αυξάνει την ανησυχία ότι τα γονίδια ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά θα μεταφερθούν στο *C. trachomatis*, είτε από το *C. suis* είτε από άλλα γλαμύδια.

Ωστόσο, θα πρέπει να τονισθεί πως από το 2010 δεν έχουν προκύψει εμπειριστατωμένες επιστημονικές αποδείξεις για την *in vivo* αντίσταση σε ανθρώπινα γλαμυδιακά είδη (*Sandoz & Rockey*, 2010), ενώ πρόσφατες μελέτες απέτυχαν να αναγνωρίσουν ανθεκτικούς οργανισμούς κατά την απομόνωση στελεχών γλαμυδίων από μολυσμένους ασθενείς μετά τη θεραπεία (*Borel et al.*, 2016). Η μελέτη των *Hong et al* (2009) απομόνωσε 7 στελέχη *C. trachomatis* κατά τη διάρκεια μιας προσπάθειας ελέγχου του *Ethiopian trachoma*. Τα στελέχη αυτά είχαν απομονωθεί από ασθενείς που είχαν προηγουμένως λάβει τετρακυκλίνες ή αζιθρομυκίνη και η ανάλυση δεν έδειξε αύξηση της MIC (εξήγηση τι είναι αυτό) για κανένα από τα δύο φάρμακα συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου που δεν είχε λάβει αντιβιοτικά.

Ερωτηματικά για την αντίσταση των χλαμυδίων στα αντιβιοτικά έθεσε και η μελέτη των *West et al* (2014) που απομόνωσε 15 στελέχη από ασθενείς μετά τη θεραπεία με αζιθρομυκίνη ή δοξυκυκλίνη. Κανένα από τα στελέχη αυτά δεν έδειξαν αντίσταση των χλαμυδίων στα αντιβιοτικά. Όμοια, η μελέτη των *Sternak et al* (2013) σε 24 στελέχη *C. trachomatis* γεννητικών οργάνων δεν αναγνώρισε ανθεκτικότητα στην αζιθρομυκίνη ή δοξυκυκλίνη.

Παρόμοια ερευνητικά αποτελέσματα παρουσιάζουν παλαιότερες μελέτες (από το 1994-2000) που εστίασαν σε στελέχη *C. pneumoniae* που απομονώθηκαν από ασθενείς με πνευμονία. Οι μελέτες δεν αποκάλυψαν στοιχεία για ομοτυπική αντίσταση (*Kohlhoff & Hammerschlag*, 2015). Ως εκ τούτου παρά την παρατήρηση του αποκτώμενου Tet^R στο *C. Suis*, τα ανθρώπινα είδη των χλαμυδίων δεν έχουν φτάσει στο στάδιο αυτό (*Borel et al.*, 2016).

Έχει προταθεί ότι η αντίσταση στα αντιβιοτικά μπορεί να αποδοθεί στις φαινοτυπικές μεταβολές καθώς λόγω ελλείψεως γενετικών δεδομένων υπάρχει η υπόθεση της ετεροτυπικής αντίστασης αντί για την ομοτυπική αντοχή (*Bhengraj et al.*, 2010). Η μελέτη των *O'Neill et al* (2013) εστίασε στη διερεύνηση της ευαισθησίας μέσω της γονιδιωματικής ανάλυσης δύο κλινικών στελεχών *C. trachomatis*, των IU824 και IU888, που είχαν αναφερθεί ως Tet^R σε παλαιότερες έρευνες. Ωστόσο, οι δοκιμασίες MIC δεν έδειξαν φαινοτυπικό Tet^R *in vitro* σε κάποια από τα υπό μελέτη στελέχη.

Η αλληλούχιση ολόκληρου του γονιδιώματος δεν αποκάλυψε κανένα γνωστό στοιχείο Tet^R, αν και παρατηρήθηκαν πολυμορφισμοί ενός νουκλεοτιδίου στο γονίδιο *rRNA)23S* και στα 2 στελέχη. Έτσι, οι ερευνητές κατέληξαν ότι η παρατηρούμενη αντίσταση ήταν ετεροτυπική και δεν μπορεί να έχει προκύψει από γενετικές μεταβολές, οδηγώντας στην αναποτελεσματικότητα της θεραπείας που παρατηρείται στους ανθρώπους (*O'Neill et al.*, 2013).

Το *C. trachomatis* είναι μια σημαντική αιτία βακτηριακών σεξουαλικά μεταδιδόμενων λοιμώξεων παγκοσμίως. Το 2007, οι *Magbanua et al*, επιχείρησαν τον χαρακτηρισμό παραλλαγμένου στελέχους *C. trachomatis* από ασθενή με μη γονοκοκκική ουρηθρίτιδα (non-gonococcal urethritis NGU), του οποίου τα πρώτα κενά??(τι σημαίνει)

ούρα (first void urine-FVU) εμφάνισαν διακριτά αποτελέσματα στις δοκιμές για *C. trachomatis* και παρουσίασε κλινική ανταπόκριση στη θεραπεία. Το δείγμα FVU αντιδρούσε ισχυρά με τα ανοσολογικά τεστ για το *C. trachomatis*, αλλά ήταν αρνητικό για την ύπαρξη πλασμιδίου. Ο προσδιορισμός της αλληλουχίας του γονιδίου omp1 έδειξε την παρουσία αλλαγής που οφείλεται στο γονίδιο?? (serovar I). Η ανάλυση PCR έδειξε ότι η αλλαγή αυτή δεν οφείλεται στην ύπαρξη πλασμιδίου. Ο ασθενής δεν ανταποκρίθηκε σε εφάπαξ δόση αζιθρομυκίνης, αλλά στη συνέχεια ανταποκρίθηκε σε θεραπεία με δοξυκυκλίνη.

Οι *Unemo et al* (2010), αναφέρουν ότι, το 2006, μια νέα παραλλαγή του *C. trachomatis* (nvCT), που φέρει απαλοιφή 377 bp εντός του πλασμιδίου, ταυτοποιήθηκε στη Σουηδία. Αυτή η απαλοιφή περιελάμβανε περιοχές- στόχους που χρησιμοποιούνταν από εμπορικό διαγνωστικό κιτ των εταιρειών Roche και Abbott. Το nvCT(new variant *C. trachomatis*) είναι κλωνικό (ορόσημο/γενώσιμο-serovar / genovar E) και εξαπλώθηκε γρήγορα στη Σουηδία, μη μπορώντας να διαγνωσθεί από αυτά τα συστήματα.

Οι *Unemo et al* (2010) προσπάθησαν να περιγράψουν το γονιδίωμα του nvCT και να συγκρίνουν το γονιδίωμα του nvCT με όλες τις διαθέσιμες αλληλουχίες γονιδιώματος *C. trachomatis* καθώς και να ερευνήσουν τις βιολογικές ιδιότητες του. Ένα πρώιμο προϊόν απομόνωσης nvCT (Sweden2) αναλύθηκε με προσδιορισμό γονιδιακής αλληλουχίας, κινητική ανάπτυξης, μικροσκοπία, δοκιμασία τροπισμού κυττάρων και δοκιμές αντιμικροβιακής ευαισθησίας. Συγκρίθηκε με τα σχετικά στελέχη *C. trachomatis*, συμπεριλαμβανομένου ενός παρόμοιου ορόσημου?? E (serovar E) άγριου τύπου *C. trachomatis* που κυκλοφόρησε στη Σουηδία πριν από την αρχικά μη ανιχνευθείσα επέκταση του nvCT.

Το γονιδίωμα του nvCT δεν περιέχει σημαντικούς γενετικούς πολυμορφισμούς. Τα γονίδια του κεντρικού μεταβολισμού, ο κύκλος ανάπτυξης και η λοιμοτοξικότητα???? Διατηρούνται, ενώ δεν υπάρχουν φαινοτυπικά χαρακτηριστικά που υποδεικνύουν οποιαδήποτε αλλοίωση της βιολογικής κατάστασης. Αυτό υποστηρίζεται από τις παρατηρήσεις ότι οι μολύνσεις από το nvCT και οι αντίστοιχες του άγριου τύπου *C. trachomatis* είναι πολύ παρόμοιες όσον αφορά την επιδημιολογία και ότι οι διαφορές στα κλινικά σημεία περιγράφονται, σε μία μελέτη, μόνο στις γυναίκες. . Ως εκ τούτου, η

ταχεία μετάδοση του pVCT στη Σουηδία οφειλόταν στην αδυναμία ταυτοποίησης μέσω του kit και κατεπέκταση στην ταυτοποίηση του σε άτομα με υψηλής συχνότητας μεταδοτικότητα [Unemo et al, 2010; Herrmann et al, 2008].

Όπως φαίνεται και από τις μελέτες που περιγράφηκαν και παραπάνω μπορεί να υπάρξουν παραλλαγές των χλαμυδίων σε μεγάλο αριθμό. Συγκεκριμένα πολλές παραλλαγές έχουν περιγραφεί και στο *C. trachomatis*. Οι πιο συχνά αναφερόμενες παραλλαγές σε επίπεδο στελέχους του *C. trachomatis* αντικατοπτρίζουν διαφορές στην πρωτεΐνη MOMP(?? Εξήγηση). Οι κυριότερες μεταλλαγές που επηρεάζουν την αναγνώριση του είδους της μόλυνσης είναι στο γονίδιο *ompA*, που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη αυτή. Η πρωτεΐνη αυτή σε γενική ομολογία καθορίζει τα χαρακτηριστικά κάθε στελέχους [Byrne, 2010].

Επίσης, μέσω της αλληλούχισης του *C. trachomatis* έχουν αναγνωρισθεί πολυμορφικά γονίδια της πρωτεΐνης εξωτερικής μεμβράνης (*mpm*). Όλα τα μέλη της οικογένειας του γονιδίου *mpm* (*mpm* A-I) στο *C. trachomatis* εμφανίζονται να μεταγράφονται και μερικά μπορεί να κωδικοποιούν πρωτεΐνες κυμαινόμενες σε μέγεθος από 95,5 kDa (*Pmp* A) έως 187 kDa (*Pmp* C). Ολόκληρη η οικογένεια αυτή των γονιδίων με τα 9 μέλη αντιπροσωπεύει σχεδόν το 14% της συνολικής ικανότητας κωδικοποίησης για το *C. Trachomatis*. Η λειτουργία αυτών των πρωτεϊνών, είναι πιθανόν να σχετίζεται με την έκκριση και την είσοδο των χλαμυδίων στον ξενιστή. Είναι, λοιπόν, σαφές ότι μεταλλαγές στα γονίδια που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες αυτές μπορεί να έχουν ως αποτέλεσμα την εδραίωση τους στον ξενιστή, ακόμη και παρουσία αντιβιοτικού [Byrne, 2010].

Μια άλλη ομάδα πρωτεϊνών πολύ σημαντικές για τη μολυσματικότητα των χλαμυδίων είναι τα συστήματα έκκρισης τύπου III (Type III secretion systems, TTSS). Πρόκειται για πολύπλοκες διατάξεις των δομών που έχουν σχεδιαστεί για να προάγουν τη μεταφορά της παθογόνου πρωτεΐνης-τελεστή μετά την επαφή με το κύτταρο ξενιστή. Η κατανόηση της λειτουργίας αυτού του συστήματος μπορεί να δώσει εξηγήσεις για την εξέλιξη της νόσου αλλά και των πιθανών μεταλλαγών σε τελεστές αυτής της οδού. Πολλές μελέτες έχουν εστιαστεί σε αυτό το σύστημα, όπως και στη δράση χλαμυδιακών τοξινών, στις χλαμυδιακές πρωτεΐνες απόκρισης στο στρες και στις μεταβολικές

διαδικασίες των γλαμυδίων, στους γλαμυδιακούς λιποπολυσακχαρίτες (LPS) και στα κρυπτικά πλασμίδια, με στόχο την κατανόηση της μολυσματικότητας και της μικροβιοανθεκτικότητας των γλαμυδίων [Byrne, 2010].

Το ενδιαφέρον για το γλαμυδιακό πλασμίδιο έχει κορυφωθεί τα τελευταία χρόνια. Αρκετοί ερευνητές έχουν εντοπίσει στελέχη χωρίς πλασμίδια και ένα τέτοιο πλασμιδιακό στέλεχος, το *C. Muridarum*, απέτυχε να προκαλέσει παθολογία της ανώτερης γεννητικής οδού σε μοντέλο ποντικού. Υπήρξε λοιπόν η πρόταση ότι η πλασμιδιακή μεταγραφική δραστηριότητα συμμετέχει στη ρύθμιση της έκφρασης των χρωμοσωμικών γονιδίων του γλαμυδίου, αλλά και το γονιδιακό προϊόν του πλασμιδίου έχει άμεση επίδραση στη λοιμογόνο δράση. Ένα στέλεχος γλαμυδίου που στερείται πλασμιδίου θα μπορούσε να αποτελέσει μοντέλο μελέτης, ως σύστημα που παρέχει προστασία από την παθολογία της ασθένειας. Η προσοχή στρέφεται δικαιολογημένα στην παρουσία και απουσία πλασμιδίου σε κλινικά απομονωμένα στελέχη, ειδικά στο πλαίσιο των μη εμφανών λοιμώξεων και την ανάπτυξη φυσικής ανοσίας [Byrne, 2010].

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

4. Υλικά και μέθοδοι

4.1 Απομόνωση γενωμικού DNA

Για την απομόνωση γενωμικού DNA από δείγματα αίματος, σωματικού υγρού ή μίγματος λευκών αιμοσφαιρίων και αιμοπεταλίων ασθενών ύποπτων για λοίμωξη με χλαμύδια χρησιμοποιήθηκε το σετ αντιδραστηρίων (κιτ) NucleoSpin Blood® της Macherey-Nagel (REF 740951.250) και ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία σύμφωνα με τις οδηγίες χρήσης:

Λύση των κυττάρων του δείγματος:

1. Προσθήκη 200μl δείγματος σε σωληνάριο φυγοκέντρησης (τύπου eppendorf) όγκου 1,5ml.
2. Προσθήκη 25μl πρωτεϊνάσης K
3. Προσθήκη 200μl διαλύματος B3 (Buffer B3) (περιέχεται στο κιτ)
4. Ανάμιξη με ισχυρό vortex για 10-20sec
5. Επώαση στους 70°C για 10-15min

Προσαρμογή συνθηκών δέσμευσης του DNA

6. Προσθήκη 210μl αιθανόλης (96-100%) σε κάθε δείγμα και ανάμιξη με vortex

Δέσμευση του DNA

7. Για κάθε δείγμα χρησιμοποιώ μία στήλη NucleoSpin® Blood Column (η οποία τοποθετείται σε ένα σωληνάριο-συλλέκτη. Κάθε δείγμα τοποθετείται στην στήλη του και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1 min στα 11,000 g. Απόρριψη του σωληναρίου-συλλέκτη.

Πλύσεις

8. 1^η πλύση: Τοποθέτηση της στήλης NucleoSpin® Blood Column σε νέο σωληνάριο-συλλέκτη (2 mL) και προσθήκη 500 µl διαλύματος BW (Buffer BW). Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1 min στα 11,000 g. Απόρριψη του σωληναρίου-συλλέκτη.
9. 2^η πλύση: Τοποθέτηση της στήλης NucleoSpin® Blood Column σε νέο σωληνάριο-συλλέκτη (2 mL) και προσθήκη 600µl διαλύματος B5 (Buffer B5). Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1 min στα 11,000 g. Απόρριψη του σωληναρίου-συλλέκτη.

Ξήρανση

10. Τοποθέτηση της στήλης NucleoSpin® Blood Column σε νέο σωληνάριο-συλλέκτη. Φυγοκέντρηση για 1 min στα 11.000 g.

Έκλουση υψηλής καθαρότητας DNA

11. Η στήλη NucleoSpin® Blood Column τοποθετείται σε 1,5mL σωληνάριο μικροφυγοκέντρου και προσθήκη 100µL διαλύματος BE (Buffer BE), το οποίο έχει προθερμανθεί στους 70 ° C.
12. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 min και φυγοκέντρηση για 1 min στα 11.000 g.

4.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction-PCR)

Η PCR ανακαλύφθηκε το 1983 από τον Kary Mullis και είναι μια μοριακή τεχνική που έχει ως στόχο την ενίσχυση ενός τμήματος DNA, δημιουργώντας χιλιάδες έως εκατομμύρια αντίγραφα της συγκεκριμένης αλληλουχίας με βάση τους εκκινητές που επιλέγονται. Η τεχνική PCR είναι μία αντίδραση που καταλύεται από το ένζυμο πολυμεράση και εφαρμόζεται μεταξύ άλλων και για την ανίχνευση λοιμωδών νοσημάτων.

Τα βασικά συστατικά της αντίδρασης είναι:

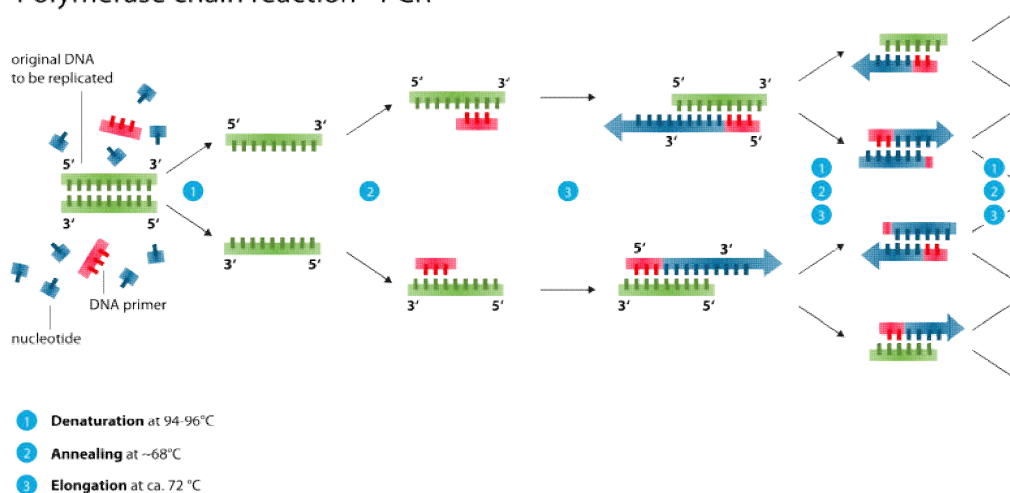
- **DNA μήτρα (template):** το DNA του οποίου η αλληλουχία πρόκειται να ενισχυθεί
- **Εκκινητές (primers):** μικρά τμήματα DNA μεγέθους περίπου 15-20 bp που είναι συμπληρωματικοί προς ένα τμήμα της αλληλουχίας που θέλουμε να ενισχύσουμε. Οι δύο εκκινητές είναι συμπληρωματικές προς τα 3' άκρα για κάθε κωδική και μη κωδική αλυσίδα του DNA στόχου.
- **DNA Πολυμεράση:** το ένζυμο που θα καταλύσει την αντίδραση της PCR. Πρέπει να είναι θερμοανθεκτική, συνήθως είναι η Taq πολυμεράση ή οποιαδήποτε DNA πολυμεράση την οποίας η βέλτιστη θερμοκρασία είναι περίπου 70°C.
- **Τριφωσφορικά νουκλεοτίδια (dNTPs):** τα δομικά συστατικά από τα οποία η DNA πολυμεράση συνθέτει το νέο μόριο DNA
- **Ρυθμιστικό διάλυμα:** διάλυμα που παρέχει κατάλληλο χημικό περιβάλλον ώστε η πολυμεράση να δρα με βέλτιστη δραστηριότητα και σταθερότητα
- **Δισθενή κατιόντα:** μαγνήσιο (Mg^{2+}) ή μαγγάνιο (Mn^{2+}), κυρίως χρησιμοποιείται το Mg^{2+} γιατί οι υψηλότερες συγκεντρώσεις Mn^{2+} αυξάνουν το ποσοστό σφαλμάτων κατά την σύνθεση του DNA. Τα δισθενή κατιόντα απαιτούνται και αυτά για την δραστηριότητα της πολυμεράσης, πολλές φορές εμπεριέχονται στο ρυθμιστικό διάλυμα. Χωρίς την ύπαρξη του Mg^{2+} η πολυμεράση δεν αναγνωρίζει τα dNTPs ως υπόστρωμα. Το Mg^{2+} είναι απαραίτητο για την απομάκρυνση των φωσφορικών ομάδων στο πλαίσιο της επιμήκυνσης του DNA.

Η μέθοδος της PCR βασίζεται σε θερμική κυκλοποίηση, η οποία αποτελείται από επαναλαμβανόμενους κύκλους θέρμανσης και ψύξης, ώστε να είναι δυνατή η τήξη του DNA και η ενζυμική αντιγραφή του. Οι εκκινητές περιέχουν αλληλουχίες συμπληρωματικές προς την περιοχή-στόχο και μαζί με την DNA πολυμεράση, είναι τα βασικά συστατικά για να επιτραπεί η επιλεκτική και επαναλαμβανόμενη ενίσχυση. Όπως προχωρεί η αντίδραση PCR, το DNA που παράγεται είναι το ίδιο που χρησιμοποιείται ως πρότυπο για αντιγραφή, θέτοντας σε κίνηση μια αλυσιδωτή αντίδραση στην οποία το DNA-μήτρα ενισχύεται εκθετικά [Bartlett et al, 2003; Saiki et al, 1988; Pavlov et al, 2004].

Τα βήματα της αντίδρασης είναι τα εξής (Εικόνα 4.1):

- **Στάδιο αρχικής αποδιάταξης (initialization step):** είναι βήμα απαραίτητο για την ενεργοποίηση της πολυμεράσης και την πλήρη αποδιάταξη του δίκλωνου μορίου DNA. Στο στάδιο αυτό χρησιμοποιείται θερμοκρασία 94-96° C για 3-5 λεπτά.
- **Στάδιο μετουσίωσης (denaturation step):** το πρώτο βήμα κάθε κύκλου, η θερμοκρασία βρίσκεται στους 94-95° C για 20-30 δευτερόλεπτα. Στο στάδιο αυτό αποδιατάσσεται η διπλή έλικα του DNA και σπάζουν οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των βάσεων του. Το DNA βρίσκεται πλέον σε μονόκλωνη μορφή.
- **Στάδιο πρόσδεσης (annealing step):** το δεύτερο βήμα κάθε κύκλου, η θερμοκρασία κυμαίνεται στους 53-65°C (η θερμοκρασία είναι ειδική για κάθε ζευγάρι εκκινητών) για 20-40 δευτερόλεπτα, ώστε να προσδεθεί ο κάθε εκκινητής στη συμπληρωματική αλυσίδα του μορίου DNA μήτρα.
- **Στάδιο επιμήκυνσης (elongation step):** η θερμοκρασία σε αυτό το βήμα εξαρτάται από την πολυμεράση. Η Taq πολυμεράση έχει βέλτιστη δραστηριότητα σε θερμοκρασία 72-75°C και συνήθως χρησιμοποιείται στους 72°C. Σε αυτό το στάδιο η DNA πολυμεράση συνθέτει τους νέους κλώνους που είναι συμπληρωματικοί προς τους κλώνους του μορίου DNA-μήτρα.
- **Στάδιο τελικής επιμήκυνσης (final elongation):** αφού ολοκληρωθούν οι κύκλοι της αντίδρασης, συνήθως 30-35, ακολουθεί η τελική επιμήκυνση όπου υβριδοποιούνται όσα τμήματα του DNA ήταν μονομερή, ώστε το προϊόν της PCR να έχει επεκταθεί πλήρως. Η θερμοκρασία σε αυτό το βήμα βρίσκεται στους 72-75 °C για 5-15 λεπτά [Rychlik et al, 1990; Chien et al, 1976; Lawyer et al, 1993].

Polymerase chain reaction - PCR



Εικόνα 4.1: Σχηματική απεικόνιση των σταδίων της αντίδρασης PCR

Στο συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκε το Chlamydia Trachomatis 330/740 IC Amplification Kit (REF B-1-100R) της εταιρείας Sacace Biotechnologies, και η πειραματική πορεία πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο και τις οδηγίες της εταιρείας.

4.3 Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR σε πήκτωμα αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση είναι μια ευρέως διαδεδομένη τεχνική για την ανάλυση των νουκλεϊκών οξέων. Βασίζεται στο διαχωρισμό φορτισμένων μορίων (π.χ. DNA) κατά μήκος ενός στερεού πορώδους υποστρώματος στα άκρα του οποίου εφαρμόζεται ηλεκτρική τάση. Τα φορτισμένα μόρια κινούνται μέσα στο υπόστρωμα και διαχωρίζονται ανάλογα με το μέγεθός τους. Κατάλληλες τεχνικές επιτρέπουν την οπτικοποίηση των νουκλεϊκών οξέων με ειδικές χρώσεις, με παρατήρηση σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας (UV).

Η πιο συχνή μορφή ηλεκτροφόρησης είναι η ηλεκτροφόρηση μορίων DNA σε πήκτωμα αγαρόζης. Η μέθοδος είναι απλή και αποτελεσματική και επιτρέπει τον διαχωρισμό μορίων DNA μεγέθους από 500 bp έως 25 kb. Η αγαρόζη χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά στη βιολογία από τον Robert Koch, το 1882, ως καλλιεργητικό μέσο για τα βακτήρια της φυματίωσης. Είναι ένας πολυσακχαρίτης που προέρχεται από φύκη (red algae). Το πήκτωμα αγαρόζης φέρει ευμεγέθεις πόρους και είναι κατάλληλο για το διαχωρισμό μεγάλων μορίων DNA και RNA.

Η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης χωρίζεται σε τρία στάδια:

- Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης, κατάλληλης συγκέντρωσης για το μέγεθος των μορίων του DNA που επιθυμούμε να διαχωρίσουμε.

- Χρώση του πηκτώματος (αν αυτή δεν έχει πραγματοποιηθεί κατά το στάδιο παρασκευής του) με κατάλληλες ουσίες που προσδένονται στο DNA
- Τοποθέτηση των δειγμάτων στις θέσεις υποδοχής τους στο πήκτωμα και εφαρμογή της κατάλληλης ηλεκτρικής τάσης στη συσκευή ηλεκτροφόρησης για τη βέλτιστη χρονική περίοδο για το διαχωρισμό των μορίων DNA.
- Άμεση παρατήρηση και φωτογράφιση του σε τράπεζα υπερϊώδους ακτινοβολίας.

Ανάλογα με το μέγεθος των μορίων DNA που επιθυμούμε να διαχωρίσουμε χρησιμοποιείται και διαφορετική συγκέντρωση του πηκτώματος αгарόζης (Πίνακας 4.1). Στα πηκτώματα μεγαλύτερης συγκέντρωσης αгарόζης μπορούν να κινηθούν εύκολα μόνο τα μικρά μόρια DNA, τα οποία και διαχωρίζονται επιτυχώς, σε αντίθεση με τα πηκτώματα μικρότερης συγκέντρωσης αгарόζης όπου διαχωρίζονται ευκρινώς τα μεγαλύτερα μόρια DNA.

Πίνακας 4.1: Συγκεντρώσεις πηκτώματος αгарόζης ανάλογα με το μέγεθος το DNA που ηλεκτροφορείται

% (w/v) πήκτωμα αгарόζης	Εύρος διακριτικής ικανότητας
0,5	1kb-30kb
0,7	800bp-12kb
1,0	500 bp-10kb
1,2	400bp-7kb
1,5	200bp-3kb
2,0	50bp-2kb

Εξίσου σημαντικό για την ηλεκτροφόρηση είναι το ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιείται ως ηλεκτροφοριστικό μέσο. Το ρυθμιστικό διάλυμα διατηρεί σταθερό το pH και περιέχει τα απαραίτητα ιόντα για την αύξηση της ηλεκτρικής αγωγιμότητας. Απουσία ιόντων, η ηλεκτρική αγωγιμότητα είναι ελάχιστη και το DNA μετακινείται ελάχιστα μέσα στο πήκτωμα [Voytas, 2001].

Στο συγκεκριμένο πείραμα ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

1. Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης συγκέντρωσης 2%. Η κατάλληλη ποσότητα αγαρόζης ζυγίζεται και προστίθεται σε κατάλληλη ποσότητα διαλύματος TBE 1X. Το διάλυμα θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι η αγαρόζη να διαλυθεί πλήρως και το διάλυμα να γίνει διαυγές.

TBE (1X): 89mM Tris base, 89mM Boric acid, 2 mM EDTA.

2. Η κωνική φιάλη με την αγαρόζη ψύχεται στους ~ 55°C. Στο στάδιο αυτό προστίθεται 8% βρωμιούχο αιθίδιο, χρωστική που προσδένεται στο DNA και διευκολύνει την παρατήρηση του με την επίδραση UV ακτινοβολίας.
3. Η διαλυμένη αγαρόζη αποχύνεται στο εκμαγείο του πηκτώματος, αφού έχουν τοποθετηθεί τα χτενάκια εντός του εκμαγείου. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 20min ώστε να δημιουργηθεί το πήκτωμα.
4. Εφόσον πήξει το πήκτωμα, αφαιρούνται τα χτενάκια και φορτώνονται σε αυτά ο μάρτυρας μοριακού βάρους (πχ. 100bp ladder) και στη συνέχεια τοποθετούνται τα προϊόντα της PCR με την προσθήκη κατάλληλης ποσότητας διαλύματος χρωστικής (loading buffer).

Τα διαλύματα χρωστικής περιέχουν μία ουσία υψηλής πυκνότητας (συνήθως γλυκερόλη) και μία ή δύο χρωστικές που μετακινούνται στο πήκτωμα με ταχύτητα περίπου ίδια με μικρά μόρια DNA (συνήθως μπλε της βρωμοφαινόλης και κυανό του ξυλενίου). Η παρουσία της γλυκερόλης διασφαλίζει ότι τα δείγματα έχουν πυκνότητα μεγαλύτερη του υδατικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης και μπορούν να καθιζάνουν στις θέσεις υποδοχής. Επιπλέον, οι δύο χρωστικές χρωματίζουν τα δείγματα, γεγονός που διευκολύνει τη διαδικασία του φορτώματος στο πήκτωμα αγαρόζης. Κατά τη διαδικασία της ηλεκτροφόρησης οι ορατές ζώνες μας προσφέρουν μια αδρή εκτίμηση του ρυθμού μετακίνησης των μορίων DNA στο πήκτωμα[*Voigtas, 2001*].

5. Εφαρμογή ηλεκτρικής τάσης: Στη συσκευή ηλεκτροφόρησης τα μόρια κινούνται ανάλογα με το φορτίο τους και το μέγεθός τους. Το DNA έχει αρνητικό φορτίο λόγω των φωσφορικών ομάδων και γι' αυτό τα μόρια DNA που ηλεκτροφορούνται κινούνται προς την κάθοδο. Τα ηλεκτρόδια του τροφοδοτικού

συνδέονται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης (Εικόνα 4.2). Το θετικό ηλεκτρόδιο (κάθοδος) τοποθετείται πάντα απέναντι από τις θέσεις υποδοχής των δειγμάτων, προκειμένου τα μόρια του DNA να μετακινηθούν κατά τη σωστή φορά στο πήκτωμα. Το πήκτωμα ηλεκτροφορείται στα 95volt για 30min



Εικόνα 4.2: Συσκευή ηλεκτροφόρησης

Απεικόνιση του πηκτώματος: Για να απεικονιστούν οι ζώνες των μορίων DNA στο πήκτωμα αγαρόζης είναι απαραίτητη μια ουσία που να καθιστά ορατά τα μόρια του DNA. Το βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr) είναι μια χρωστική που έχει χρησιμοποιηθεί

ευρύτατα γι' αυτόν τον σκοπό. Παρεμβάλλεται στη μεγάλη αύλακα του DNA (ή του RNA) μέσω σχηματισμού δεσμών Van Der Waals και έχει την ιδιότητα να φθορίζει όταν εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία 302-366 nm. Ο φθορισμός του συμπλόκου EtBr-DNA είναι 20-30 φορές ισχυρότερος από αυτόν του ελεύθερου βρωμιούχου αιθιδίου. Η χρωστική προστίθεται στο πήκτωμα είτε κατά την παρασκευή του είτε με εμφύσησή του σε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου 0,5 µg/ml για 15-20 λεπτά μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης. Η χρήση του βρωμιούχου αιθιδίου απαιτεί ιδιαίτερη προσοχή γιατί η ουσία έχει μεταλλαξιογόνο δράση.

Το πήκτωμα τοποθετείται σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας που βρίσκεται σε σκοτεινό θάλαμο. Με την έκθεσή τους σε υπεριώδη ακτινοβολία τα μόρια του DNA φθορίζουν και γίνονται ορατά ως πορτοκαλόχρωμες ζώνες. Κατά την παρατήρηση του πηκτώματος λαμβάνονται μέτρα προστασίας. Η υπεριώδης ακτινοβολία είναι επιβλαβής για τους οφθαλμούς και το δέρμα. Η φωτογράφιση του πηκτώματος γίνεται με τη βοήθεια φωτογραφικών κώνων και ψηφιακής φωτογραφικής μηχανής. Ορισμένα εργαστήρια διαθέτουν ειδικό εξοπλισμό παρατήρησης με σκοτεινό θάλαμο και κάμερα, που επιτρέπει τη λήψη και αποθήκευση φωτογραφιών απευθείας σε ψηφιακή μορφή [*Voytas, 2001*].

4.4 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Πραγματικού Χρόνου (Real-time PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Real-time PCR) σε πραγματικό χρόνο βασίζεται στη μέθοδο της συμβατικής PCR. Η Real-time PCR ανιχνεύει την ενίσχυση ενός στοχευόμενου μορίου DNA κατά την διάρκεια της PCR, δηλαδή σε πραγματικό χρόνο, και όχι στο τέλος της, όπως στη συμβατική PCR. Η Real-time PCR μπορεί να χρησιμοποιηθεί ποσοτικά ή ημι-ποσοτικά, δηλαδή επάνω ή κάτω από ένα ορισμένο ποσό μορίων DNA [*Watson et al, 2004; Heid et al, 1996*].

Η ενίσχυση του μορίου DNA-μήτρα γίνεται με τον ίδιο τρόπο όπως και στη συμβατική PCR, όπου χρησιμοποιούνται ένα ζεύγος ειδικών εκκινητών, δεοξυριβονουκλεοτίδια, ένα κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα και μια θερμο-σταθερή DNA πολυμεράση. Στο μίγμα αυτό προστίθεται ένα υπόστρωμα που σημαίνεται με

ειδικό φθορίζον. Η αντίδραση λαμβάνει χώρα σε ειδικό θερμοκυκλοποιητή που περιέχει αισθητήρες για τη μέτρηση του φθορισμού του φθορίζοντος μορίου, το οποίο έχει διεγερθεί στο απαιτούμενο μήκος κύματος και έτσι επιτρέπεται η μέτρηση του ρυθμού δημιουργίας ενός ή περισσότερων συγκεκριμένων προϊόντων. Μέσω αυτής της διαδικασίας επιτρέπεται η μέτρηση του ρυθμού δημιουργίας του ενισχυμένου προϊόντος που προκύπτει σε κάθε κύκλο της PCR [Watson et al,2004; Heid et al, 1996].

Τα δεδομένα που προκύπτουν από την ανίχνευση του φθορισμού του φθορίζοντος μορίου, αναλύονται μέσω ειδικού λογισμικού για να υπολογιστεί η σχετική έκφραση ενός γονιδίου στα διάφορα δείγματα ή η παρουσία μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA σε αυτά τα δείγματα. Αυτή η μέτρηση γίνεται μετά από κάθε κύκλο ενίσχυσης και αυτός είναι ο λόγος για τον οποίο η μέθοδος αυτή ονομάζεται PCR πραγματικού χρόνου . Στην περίπτωση του ποσοτικού προσδιορισμού μορίων RNA, το μόριο-μήτρα είναι το συμπληρωματικό DNA (cDNA), το οποίο λαμβάνεται με αντίστροφη μεταγραφή του ριβονουκλεϊκού οξέος (RNA) [Watson et al,2004; Heid et al, 1996].

Στην συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τα κίτ: Real time PCR detection kit for Chlamydiaceae (all species) της εταιρείας Primerdesing (Genesig) και Chlamydia trachomatis PCR kit της GeneProof (REF CHT/SEX/050) και η πειραματική πορεία πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο και τις οδηγίες των εταιρειών.

5. Αποτελέσματα

5.1 Επιλογή του πειραματικού υλικού

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 247 δείγματα ασθενών που είχαν τα κλινικά χαρακτηριστικά μόλυνσης με χλαμύδια. Δείγματα αίματος ή σωματικού υγρού ασθενών ύποπτων για χλαμυδιακή λοίμωξη ελέγχθηκαν είτε για την ύπαρξη οποιουδήποτε είδους της ευρύτερης οικογένειας *Chlamidiaceae* με την μέθοδο της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης Πραγματικού Χρόνου (Real Time PCR), είτε για την ύπαρξη του χλαμυδίου *C. trachomatis* με την μέθοδο της συμβατικής Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR).

Σύμφωνα με ιατρική επιλογή για κάθε ασθενή τα δείγματα εξετάστηκαν είτε ως προς την ανίχνευση της ύπαρξης της οικογένειας χλαμυδίων *Chlamidiaceae* (*Chlamidiaceae* family-CF), είτε για το είδος *C. trachomatis* (CT), είτε και για τα δύο. Ο παρακάτω πίνακας παρουσιάζει τον αριθμό των δειγμάτων, την εξέταση, η οποία έγινε και το αποτέλεσμα (Πίνακας 5.1).

Πίνακας 5.1: Ο αριθμός, το είδος και το αποτέλεσμα της εξέτασης των δειγμάτων. Με **κόκκινο** χρώμα σημειώνονται τα θετικά (+) δείγματα, με **μπλε** τα δείγματα όπου έχει γίνει έλεγχος για *C. trachomatis* (CT) και με **γκρι υπογράμμιση** τα δείγματα των ασθενών που παρουσίασαν ανθεκτικότητα στην πρώτη θεραπεία.

Αριθμός Δείγματος	Είδος εξέτασης	Αποτέλεσμα
1	CT	ΘΕΤΙΚΟ (+)
2	CT	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
3	CT	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
4	CT	ΘΕΤΙΚΟ (+)
5	CT	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
6	CT	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
7	CT	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
8	CT	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)

9	CT	ΘΕΤΙΚΟ (+)
10	CT	ΘΕΤΙΚΟ (+)
11	CT	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
12	CT	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
13	CT	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
14	CT	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
15	CT	ΘΕΤΙΚΟ (+)
16	CT	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
17	CT	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
18	CT	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
19	CT	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
20	CT	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
21	CT	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
22	CT	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
23	CT	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
24	CT	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
25	CT	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
26	CT	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
27	CT	ΘΕΤΙΚΟ (+)
28	CT	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
29	CT	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
30	CF	ΘΕΤΙΚΟ (+)
31	CF	ΘΕΤΙΚΟ (+)
32	CF	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
33	CF	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
34	CF	ΘΕΤΙΚΟ (+)
35	CF	ΘΕΤΙΚΟ (+)
36	CF	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
37	CF	ΘΕΤΙΚΟ (+)
38	CF	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)

39	CT	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
40	CT	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
41	CT	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
42	CT	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
43	CT	ΘΕΤΙΚΟ (+)
44	CT	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
45	CF	ΘΕΤΙΚΟ (+)
46	CF	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
47	CF	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
48	CF	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
49	CF	ΘΕΤΙΚΟ (+)
50	CF	ΘΕΤΙΚΟ (+)
51	CF	ΘΕΤΙΚΟ (+)
52	CF	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
53	CF	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
54	CF	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
55	CT	ΘΕΤΙΚΟ (+)
56	CF	ΘΕΤΙΚΟ (+)
57	CF	ΘΕΤΙΚΟ (+)
58	CF	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
59	CF	ΘΕΤΙΚΟ (+)
60	CF	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
61	CF	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
62	CF	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
63	CF	ΘΕΤΙΚΟ (+)
64	CF	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
65	CF	ΘΕΤΙΚΟ (+)
66	CT	ΘΕΤΙΚΟ (+)
67	CF	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
68	CF	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)

69	CF	ΘΕΤΙΚΟ (+)
70	CF	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
71	CF	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
72	CF	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
73	CF	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
74	CF	ΘΕΤΙΚΟ (+)
75	CF	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
76	CF	ΘΕΤΙΚΟ (+)
77	CF	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
78	CF	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
79	CF	ΘΕΤΙΚΟ (+)
80	CF	ΘΕΤΙΚΟ (+)
81	CF	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
82	CF	ΘΕΤΙΚΟ (+)
83	CF	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
84	CF	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
85	CF	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
86	CF	ΘΕΤΙΚΟ (+)
87	CF	ΘΕΤΙΚΟ (+)
88	CF	ΘΕΤΙΚΟ (+)
89	CF	ΘΕΤΙΚΟ (+)
90	CF	ΘΕΤΙΚΟ (+)
91	CF	ΘΕΤΙΚΟ (+)
92	CF	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
93	CF	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
94	CF	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
95	CF	ΘΕΤΙΚΟ (+)
96	CF	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
97	CF	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
98	CF	ΘΕΤΙΚΟ (+)

99	CF	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
100	CF	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
101	CF	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
102	CF	ΘΕΤΙΚΟ (+)
103	CF	ΘΕΤΙΚΟ (+)
104	CF	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
105	CT	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
106	CF	ΘΕΤΙΚΟ (+)
107	CF	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
108	CF	ΘΕΤΙΚΟ (+)
109	CF	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
110	CF	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
111	CF	ΘΕΤΙΚΟ (+)
112	CF	ΘΕΤΙΚΟ (+)
113	CF	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
114	CF	ΘΕΤΙΚΟ (+)
115	CF	ΘΕΤΙΚΟ (+)
116	CF	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
117	CF	ΘΕΤΙΚΟ (+)
118	CF	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
119	CF	ΘΕΤΙΚΟ (+)
120	CF	ΘΕΤΙΚΟ (+)
121	CF	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
122	CF	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
123	CF	ΘΕΤΙΚΟ (+)
124	CF	ΘΕΤΙΚΟ (+)
125	CF	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
126	CF	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
127	CF	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
128	CF	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)

129	CF	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
130	CF	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
131	CF	ΘΕΤΙΚΟ (+)
132	CF	ΘΕΤΙΚΟ (+)
133	CF	ΘΕΤΙΚΟ (+)
134	CF	ΘΕΤΙΚΟ (+)
135	CT	ΘΕΤΙΚΟ (+)
136	CF	ΘΕΤΙΚΟ (+)
137	CF	ΘΕΤΙΚΟ (+)
138	CF	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
139	CT	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
140	CF	ΘΕΤΙΚΟ (+)
141	CF	ΘΕΤΙΚΟ (+)
142	CF	ΘΕΤΙΚΟ (+)
143	CF	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
144	CF	ΘΕΤΙΚΟ (+)
145	CF	ΘΕΤΙΚΟ (+)
146	CF	ΘΕΤΙΚΟ (+)
147	CF	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
148	CF	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
149	CF	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
150	CF	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
151	CF	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
152	CF	ΘΕΤΙΚΟ (+)
153	CF	ΘΕΤΙΚΟ (+)
154	CF/ CT	ΘΕΤΙΚΟ (+) /ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
155	CF	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
156	CF	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
157	CF	ΘΕΤΙΚΟ (+)
158	CF	ΘΕΤΙΚΟ (+)

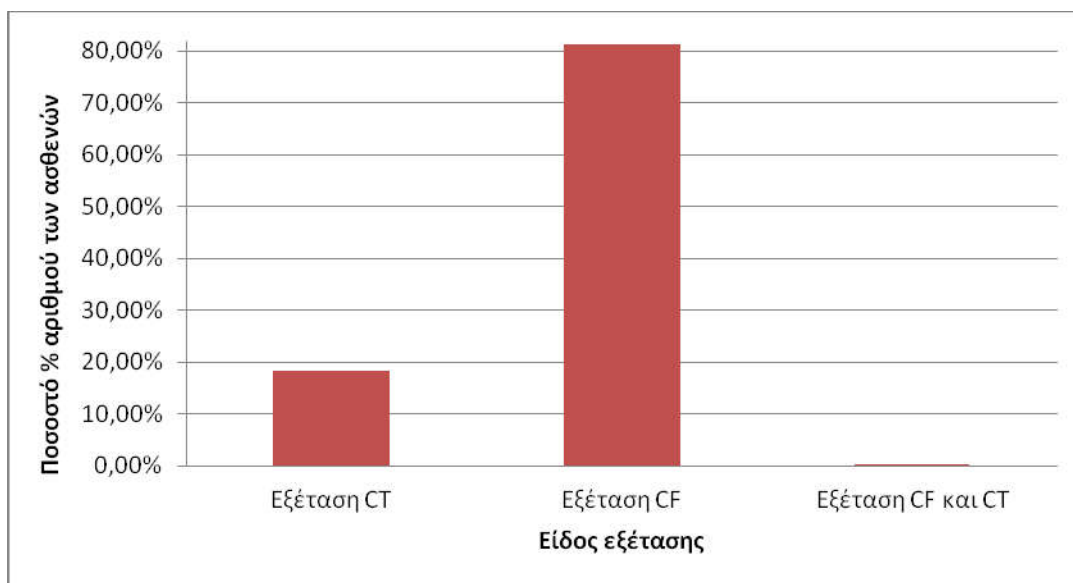
159	CT	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
160	CF	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
161	CF	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
162	CF	ΘΕΤΙΚΟ (+)
163	CF	ΘΕΤΙΚΟ (+)
164	CT	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
165	CT	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
166	CF	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
167	CF	ΘΕΤΙΚΟ (+)
168	CF	ΘΕΤΙΚΟ (+)
169	CF	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
170	CF	ΘΕΤΙΚΟ (+)
171	CF	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
172	CF	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
173	CF	ΘΕΤΙΚΟ (+)
174	CF	ΘΕΤΙΚΟ (+)
175	CF	ΘΕΤΙΚΟ (+)
176	CF	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
177	CF	ΘΕΤΙΚΟ (+)
178	CF	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
179	CF	ΘΕΤΙΚΟ (+)
180	CF	ΘΕΤΙΚΟ (+)
181	CF	ΘΕΤΙΚΟ (+)
182	CF	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
183	CF	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
184	CF	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
185	CT	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
186	CF	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
187	CF	ΘΕΤΙΚΟ (+)
188	CF	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)

189	CF	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
190	CF	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
191	CF	ΘΕΤΙΚΟ (+)
192	CF	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
193	CF	ΘΕΤΙΚΟ (+)
194	CF	ΘΕΤΙΚΟ (+)
195	CF	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
196	CF	ΘΕΤΙΚΟ (+)
197	CF	ΘΕΤΙΚΟ (+)
198	CF	ΘΕΤΙΚΟ (+)
199	CF	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
200	CF	ΘΕΤΙΚΟ (+)
201	CF	ΘΕΤΙΚΟ (+)
202	CF	ΘΕΤΙΚΟ (+)
203	CF	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
204	CF	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
205	CF	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
206	CF	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
207	CF	ΘΕΤΙΚΟ (+)
208	CF	ΘΕΤΙΚΟ (+)
209	CF	ΘΕΤΙΚΟ (+)
210	CF	ΘΕΤΙΚΟ (+)
211	CF	ΘΕΤΙΚΟ (+)
212	CF	ΘΕΤΙΚΟ (+)
213	CF	ΘΕΤΙΚΟ (+)
214	CF	ΘΕΤΙΚΟ (+)
215	CF	ΘΕΤΙΚΟ (+)
216	CF	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
217	CF	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
218	CF	ΘΕΤΙΚΟ (+)

219	CF	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
220	CF	ΘΕΤΙΚΟ (+)
221	CF	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
222	CF	ΘΕΤΙΚΟ (+)
223	CF	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
224	CF	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
225	CF	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
226	CF	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
227	CF	ΘΕΤΙΚΟ (+)
228	CF	ΘΕΤΙΚΟ (+)
229	CF	ΘΕΤΙΚΟ (+)
230	CF	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
231	CF	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
232	CF	ΘΕΤΙΚΟ (+)
233	CF	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
234	CF	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
235	CF	ΘΕΤΙΚΟ (+)
236	CF	ΘΕΤΙΚΟ (+)
237	CF	ΘΕΤΙΚΟ (+)
238	CF	ΘΕΤΙΚΟ (+)
239	CF	ΘΕΤΙΚΟ (+)
240	CF	ΘΕΤΙΚΟ (+)
241	CF	ΘΕΤΙΚΟ (+)
242	CF	ΘΕΤΙΚΟ (+)
243	CF	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
244	CF	ΘΕΤΙΚΟ (+)
245	CF	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
246	CF	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)
247	CF	ΑΡΝΗΤΙΚΟ (-)

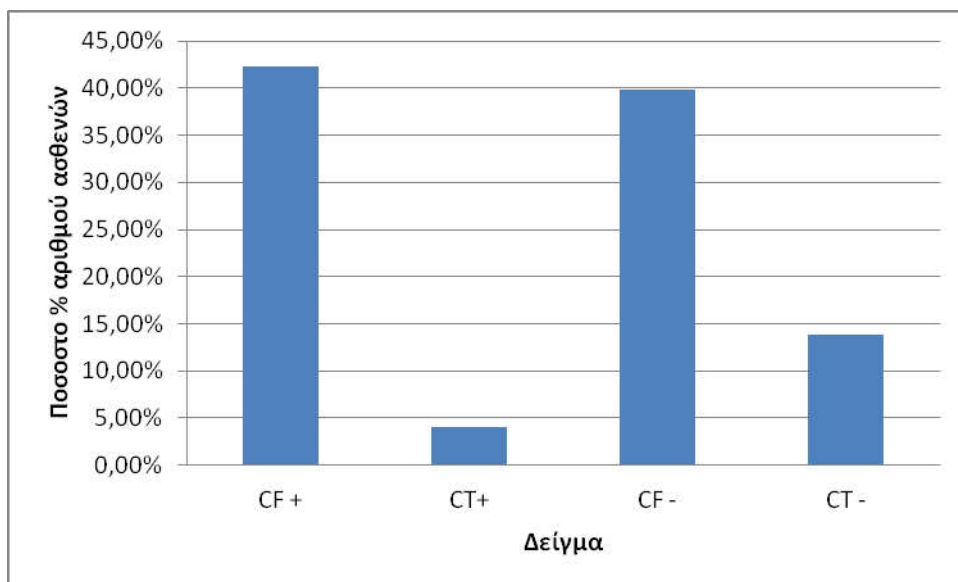
5.2 Ανάλυση των αποτελεσμάτων

Σύμφωνα με τον Πίνακα 5.1, 45 (18,3%) από του 247 ασθενείς εξετάστηκαν για CT, 1(0,4%) ασθενής εξετάστηκε για CT και CF, ενώ οι υπόλοιποι 241(81,3%) εξετάστηκαν μόνο για CF. Τα αποτελέσματα αυτά παρουσιάζονται στο διάγραμμα της Εικόνας 5.1.



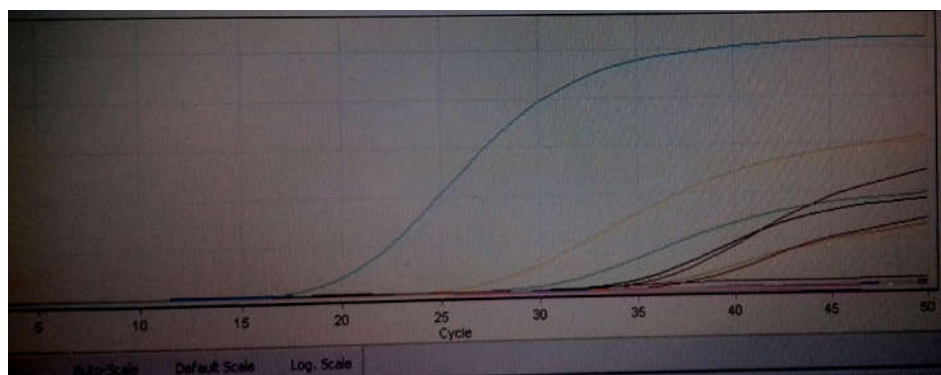
Εικόνα 5.1: Διάγραμμα που παρουσιάζει το ποσοστό των ασθενών που συμμετείχαν σε κάθε είδος εξέτασης [*Chlamidiaceae* family (CF), *C. trachomatis* (CT)],

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα το 46,34% των ασθενών (115 στους 247 ασθενείς) είναι μολυσμένο είτε από *Chlamidiaceae* είτε συγκεκριμένα από το είδος *C. trachomatis*. Ατομα σε ποσοστό 42,34% είναι θετικά για την *Chlamidiaceae* και 4% για το *C. trachomatis*, ενώ 39,84% είναι αρνητικά για τη *Chlamidiaceae* και 13,82% αρνητικά μόνο για το *C. trachomatis*. Τα αποτελέσματα αυτά παρουσιάζονται στο ραβδόγραμμα της Εικόνας 5.2.



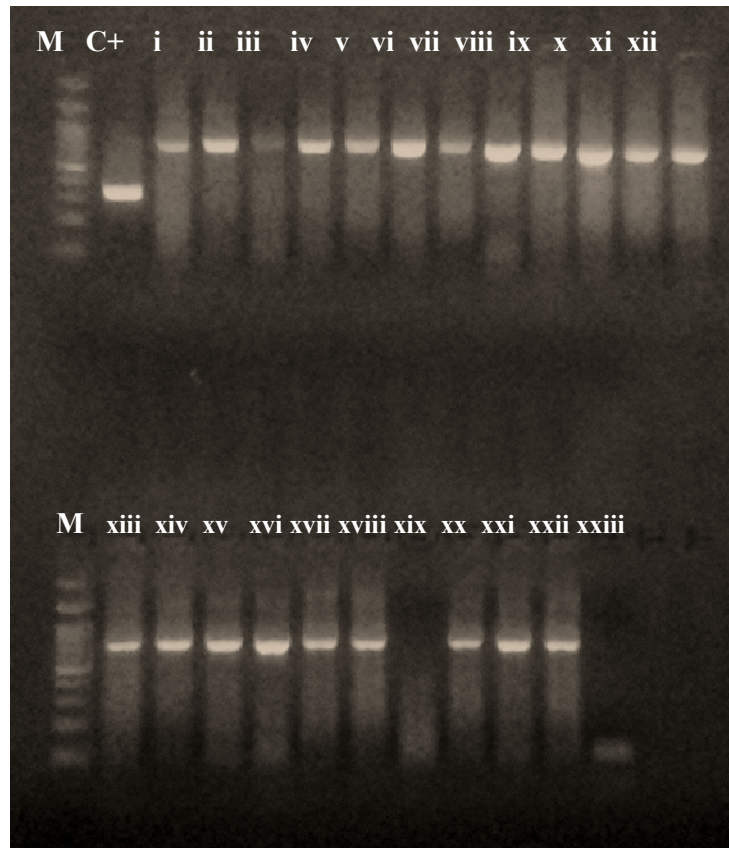
Εικόνα 5.2: Ραβδόγραμμα απεικόνισης των θετικών και αρνητικών ασθενών για την *Chlamydiaceae* (CF+ και CF- αντίστοιχα) και των θετικών και αρνητικών ασθενών για το *C. Trachomatis* (CT+ και CT-, αντίστοιχα).

Ο έλεγχος παρουσίας *Chlamydiaceae* έγινε με τη μέθοδο της Real Time PCR. Στο παρακάτω διάγραμμα (Εικόνα 5.3) απεικονίζεται το παραχθέν προϊόν ενίσχυσης κατά τη διάρκεια της PCR αντίδρασης, ο θετικός μάρτυρας στην πρώτη καμπύλη, τα αρνητικά δείγματα και ο αρνητικός μάρτυρας απεικονίζονται με τις καμπύλες που βρίσκονται στον οριζόντιο άξονα, ενώ οι ενδιάμεσες καμπύλες είναι τα θετικά δείγματα. Όσο πιο κοντά στον θετικό μάρτυρα είναι μια καμπύλη τόσο μεγαλύτερο το μικροβιακό φορτίο (ως προς τα χλαμύδια) του δείγματος.



Εικόνα 5.3: Καμπύλες που απεικονίζουν το παραχθέν προϊόν ενίσχυσης κατά την διάρκεια της Real Time PCR αντίδρασης

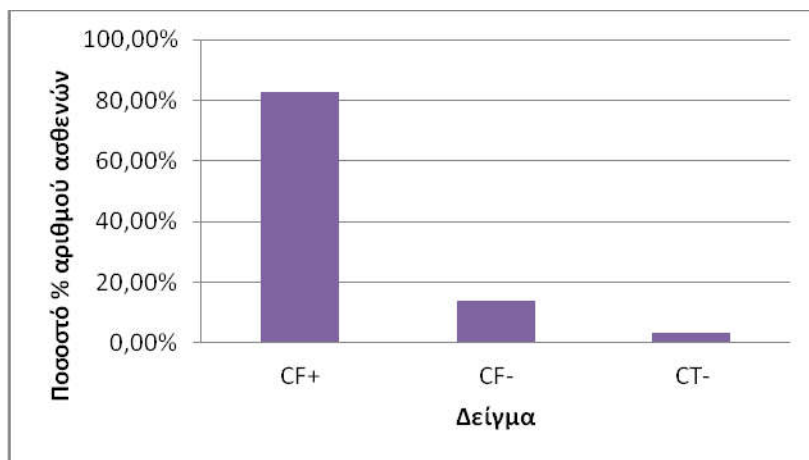
Στη συνέχεια έγινε περαιτέρω έλεγχος των δειγμάτων που είναι θετικά για το *Chlamydiaceae* (CF+), ως προς την θετικότητα τους για το *C. trachomatis*, με τη μέθοδο της συμβατικής PCR. Παρατηρούμε στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 5.4) ότι τα δείγματα που είναι θετικά για τη *Chlamydiaceae* είναι αρνητικά για το *C. trachomatis*. Αυτό φαίνεται από την διαφορετικού μοριακού βάρους ζώνη που υπάρχει στα δείγματα i-xviii και xx-xxii σε σχέση με το θετικό μάρτυρα (C+) ή με την έλλειψη ζώνης στα δείγματα xix και xxiii. Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώθηκε και με την χρήση της μεθόδου της Real Time PCR για το *C. trachomatis*.



Εικόνα 5.4: Απεικόνιση δειγμάτων θετικά για *Chlamydiaceae* (CF+), και αρνητικά για *C. trachomatis* (CT-)

Οι ασθενείς συνέχισαν να εξετάζονται αφού έλαβαν θεραπεία. Παρατηρήθηκε ότι 24,8% των ασθενών, οι οποίοι ήταν θετικοί για χλαμύδια, παρουσίασε ανθεκτικότητα στην πρώτη θεραπεία. Από τους ασθενείς αυτούς, το 82,76% ήταν θετικοί στο

Chlamydiaceae, το 13,79% ήταν αρνητικοί στο *Chlamydiaceae* και το 3,5% ήταν αρνητικοί στο *C. trachomatis*. Τα δεδομένα αυτά παρουσιάζονται στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 5.5).



Εικόνα 5.5: Αποτελέσματα ανθεκτικότητας στην πρώτη θεραπεία [*Chlamydiaceae* (CF), *C. Trachomatis* (CT)].

6. Συζήτηση

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας έδειξαν ότι ...(σχολιάζεις τα αποτελέσματα τα συνολικά για CF θετικά αρνητικά) και CT). Συγκρίνεις με άλλες μελέτες στην Ελλάδα, αν υπάρχουν, ή και με εξωτερικού.

Στην παρούσα μελέτη, η εξέταση κάθε ασθενούς έγινε σύμφωνα με τα συμπτώματα που παρουσίαζαν και τη διακριτική ικανότητα του ιατρού. Ως εκ τούτου κάποιοι ασθενείς εξετάστηκαν μόνο για CF και κάποιοι μόνο για CT. Οι ασθενείς όμως που είναι θετικοί για CF, εξετάστηκαν περαιτέρω για το αν το είδος του χλαμυδίου με το οποίο είναι προσβεβλημένοι αυτοί οι ασθενείς είναι το *C. Trachomatis* Συνοψίζοντας, μελετήθηκαν 247 δείγματα εκ των οποίων το 46%, ήταν θετικά για την οικογένεια Chlamydiaceae και για Chlamydia trachomatis. Το 25% από τα θετικά της οικογένειας Chlamydiaceae, παρουσίασαν ανθεκτικότητα στην 1^η θεραπεία. Κανένα από τα δείγματα που παρουσίασε ανθεκτικότητα δεν βρέθηκε θετικό σε Chlamydia trachomatis.

Οι παραπάνω έλεγχοι πραγματοποιήθηκαν με τεχνικές μοριακής βιολογίας και συγκεκριμένα ο έλεγχος CF έγινε με την μέθοδο της Real Time PCR και την χρήση ειδικών εκκινητών για το γονίδιο του 16S rRNA της οικογένειας Chlamidiaceae. Αντίθετα ο έλεγχος CT γίνεται με την χρήση της συμβατικής PCR με την χρήση ειδικών εκκινητών για το κρυπτικό πλασμίδιο που είναι ενδεικτικό του είδους *C. trachomatis*. Τα θετικά για το CF δείγματα ελέγχονται επιπλέον και για την θετικότητά τους στο CT.

Είναι γνωστό ότι η Real Time PCR είναι πιο αξιόπιστη μέθοδος σε σχέση με την συμβατική PCR. Με σκοπό να διασφαλιστεί η εγκυρότητα του αποτελέσματος έγινε επιπλέον έλεγχος στα CT δείγματα με Real Time PCR, στην οποία χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές για το κρυπτικό πλασμίδιο που είναι ενδεικτικό του είδους *C. trachomatis*. Στην προκειμένη περίπτωση τα αποτελέσματα είναι ταυτόσημα μεταξύ των δυο μεθόδων. Συμπερασματικά, δεν προκύπτει θέμα χαμηλής ευαισθησίας της συμβατικής PCR, έναντι της Real Time PCR.

Δεδομένα από παλιότερες μελέτες υποδεικνύουν ότι η αποτυχία της θεραπείας αποτελεί σημαντικό πρόβλημα κατά τη διάρκεια των λοιμώξεων από χλαμύδια (Borel et al., 2016). Οι Batteiger et al (2010) για παράδειγμα αναφέρουν την ύπαρξη

επαναλαμβανόμενων μολύνσεων από *C. trachomatis* σε έφηβες κοπέλες σε ποσοστό 13,7% εξαιτίας της αποτυχίας της θεραπευτικής προσέγγισης των γεννητικών οργάνων παρά το γεγονός ότι δεν ανέφεραν καμία σεξουαλική επαφή μετά τη θεραπεία και πλήρη συμμόρφωση με τη φαρμακευτική αγωγή. Μεταγενέστερη μελέτη αναφέρει ποσοστό αποτυχίας της θεραπευτικής αγωγής σε ποσοστό 5-23%, ανάλογα με τον εξεταζόμενο πληθυσμό ασθενών (Horner, 2012). Τα δεδομένα αυτά σε συνδυασμό με τις έρευνες που έχουν επιβεβαιώσει την ανάπτυξη αντίστασης των στελεχών των χλαμυδίων στα αντιβιοτικά γεννούν σημαντικές ανησυχίες για τη δημόσια υγεία παγκοσμίως.

7. Συμπεράσματα

Η χλαμυδιακή μόλυνση είναι ένα σεξουαλικά μεταδιδόμενο νόσημα, το οποίο οφείλεται στην παρουσία βακτηρίων της ευρύτερης οικογένειας *Chlamydiaceae*, με σημαντικότερο και περισσότερο μολυσματικό το *C. trachomatis*. Τα βακτήρια αυτά είναι μη κινητά και αρνητικά στη χρώση κατά Gram. Τα χλαμύδια αποτελούν γενικά μια «σιωπηρή νόσο» εφόσον σημαντικό ποσοστό γυναικών (75%) και ανδρών (50%) που έχουν μολυνθεί δεν εμφανίζουν συμπτώματα. Αυτό παρατηρείται γιατί τα συμπτώματα εμφανίζονται 1-3 εβδομάδες μετά την πιθανή επαφή με το μικρόβιο.

Πρόκειται για υποχρεωτικά παρασιτικούς μικροοργανισμούς καθώς δεν είναι ικανοί να συνθέσουν ATP, έτσι χρησιμοποιούν όλους τους μεταβολικούς μηχανισμούς του ξενιστή. Ο κύκλος ζωής των χλαμυδίων μπορεί να διαιρεθεί σε δυο ξεχωριστές φάσεις: μια εξωκυτταρική φάση, κατά την οποία δεν πολλαπλασιάζονται και είναι μολυσματικά και μια υποχρεωτικά ενδοκυττάρια φάση, κατά την οποία πολλαπλασιάζονται και είναι μη μολυσματικά. Η μολυσματική μορφή ή «στοιχειώδες σωματίο», προσκολλάται στην κυτταρική μεμβράνη και εισέρχεται στο κύτταρο μέσω ενός φαγοσώματος. Μετά την είσοδο τους στα κύτταρα, το στοιχειώδες σωματίο αναδιοργανώνεται σε δικτυωτά σωματία (σχηματίζοντας έγκλειστα) και αρχίζει ο πολλαπλασιασμός τους. Μετά από 18 έως 24 ώρες, τα δικτυωτά σωματία συμπυκνώνονται για να σχηματίσουν τα στοιχειώδη σωματία. Αυτά τα νέα στοιχειώδη σωματία απελευθερώνονται ξεκινώντας ένα νέο κύκλο μόλυνσης.

Ο τρόπος με τον οποίο, τα χλαμύδια μολύνουν τον ξενιστή είναι ιδιαίτερα σημαντικός για την πορεία της ασθένειας. Η χρήση των μεταβολικών μηχανισμών του ξενιστή εξασθενεί το ανοσοποιητικό σύστημα των ασθενών με αποτέλεσμα την περαιτέρω μόλυνση με άλλου είδους μικροοργανισμούς.

Τα τελευταία χρόνια παρουσιάζεται έντονα η ανθεκτικότητα τεράστιου αριθμού βακτηρίων στα αντιβιοτικά, ένα από τα οποία είναι και τα χλαμύδια και ένας μεγάλος αριθμός γονιδίων, τα οποία μεταλλάσσονται ή μεταφέρονται από άλλους μικροοργανισμούς, ευθύνονται για αυτή την ανθεκτικότητα. Για το λόγο αυτό η διερεύνηση αυτού το φαινομένου σε ασθενείς με κλινικά συμπτώματα μόλυνσης από χλαμύδια αποτέλεσε στόχο της παρούσας έρευνας.

Δείγματα από ασθενείς με κλινικά συμπτώματα χλαμυδιακής μόλυνσης ελέγχθηκαν για την ύπαρξη είτε της οικογένειας *Chlamidiaceae* είτε του είδους *C. trachomatis* με μοριακές μεθόδους ανίχνευσης DNA (Real Time PCR και συμβατική PCR). Σημαντικό ποσοστό των δειγμάτων (46,34%)είναι θετικά είτε για την ευρύτερη οικογένεια είτε για το συγκεκριμένο είδος και 39,84% είναι αρνητικά για χλαμύδια (αρνητικά για την ευρύτερη οικογένεια χλαμυδίων).

Στους ασθενείς που βρέθηκαν θετικοί για τα χλαμύδια δόθηκε ειδική θεραπεία με αντιβιοτικά και το 24,8% των ασθενών αυτών παρουσίασαν ανθεκτικότητα στη θεραπεία. Από τους ασθενείς αυτούς, το 82,76% ήταν θετικοί στο *Chlamidiaceae*, το 13,79% ήταν αρνητικοί στο *Chlamidiaceae* και το 3,5% ήταν αρνητικοί στο *C. trachomatis*.

Τα παραπάνω αποτελέσματα δεν μπορούν ελεγχθούν ως προς την στατιστική τους σημαντικότητα, πρωτίστως διότι θα πρέπει το ίδιο πείραμα να γίνει αρκετές φορές (>3) με διαφορετικά δείγματα ασθενών, πράγμα εξαιρετικά δύσκολο και δευτερευόντως λόγω της δύσκολης φύσης των παθογόνων μικροβίων, μια και συνεχώς συμβαίνουν μεταλλάξεις που καθιστούν τα μικρόβια αυτά ανθεκτικά.

Επιπλέον, όπως προαναφέρθηκε, υπάρχουν περιπτώσεις μίμησης, δηλαδή ένα είδος χλαμυδίου εκφράζει πρωτεΐνες ή γονίδια ενδεικτικά για άλλο είδος και σχετικές έρευνες ανέφεραν τη δημιουργία στελεχών που μεταλλάχθηκαν έτσι ώστε να

διαφεύγουν των έλεγχου συχνά χρησιμοποιούμενων διαγνωστικών τεστ. Η μεταβλητότητα αυτών των παθογόνων καθιστούν τόσο τη διάγνωση όσο και τη θεραπεία εξαιρετικά δύσκολες.

Σήμερα υπάρχουν νέες μέθοδοι που προάγουν τόσο την απομόνωση όσο και την άμεση χαρτογράφηση των μεταλλάξεων στα γονίδια των χλαμυδίων σε συνδυασμό με τις πρόσφατες αναφορές του επιτυχούς μετασχηματισμού του *C. trachomatis* με πλασμιδιακό DNA, οι οποίες δείχνουν ότι οι γενετικές προσεγγίσεις θα δώσουν σύντομα νέα στοιχεία για τη φύση των χλαμυδίων (Song et al., 2013; Nguyen & Valdivia, 2012). Βέβαια, η ύπαρξη της αντίστασης στα αντιβιοτικά στις μολύνσεις από χλαμύδια είναι γεγονός και η διερεύνηση των αιτιών είναι επιτακτική (Pitt et al, 2013).

Με βάση τα παραπάνω θα μπορούσε στα υπάρχοντα δείγματα που είναι θετικά να γίνει ένας έλεγχος γονιδίων και ανίχνευση πιθανών μεταλλάξεων στα δείγματα που παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά, με σκοπό την κατανόηση των μηχανισμών δράσης των χλαμυδίων και την επαγόμενη πρόληψη και θεραπεία της λοίμωξης την οποία προκαλούν.

Βιβλιογραφία

Andersen A, Rogers D. (1998). *Resistance to tetracycline and sulphadiazine in swine C. trachomatis isolates*. In: Stephens R. (ed). *Proc. 9th Int. symposium Hum. chlamydial Infect.* USA: San Francisco.

Bartlett JMS, Stirling D, A short History of the Polymerase Chain Reaction, *Methods in Molecular Biology*, volume 226, 2003, pp3-6

Batteiger BE, Tu W, Ofner S, Van Der Pol B, Stothard DR, Orr DP, Katz BP, Fortenberry JD. Repeated *Chlamydia trachomatis* genital infections in adolescent women. *J Infect Dis*, 201(1):42-51.

Becker Y. (1996). *Chlamydia*. In: Baron S, editor. *Medical Microbiology*. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston.

Bhengraj AR, Vardhan H, Srivastava P, Salhan S, Mittal A. (2010). Decreased susceptibility to azithromycin and doxycycline in clinical isolates of *Chlamydia trachomatis* obtained from recurrently infected female patients in India. *Chemotherapy*, 56(5):371-7.

Binet R, Bowlin AK, Maurelli AT, Rank RG. (2010). Impact of azithromycin resistance mutations on the virulence and fitness of *Chlamydia caviae* in guinea pigs. *Antimicrob Agents Chemother*, 54(3):1094-101.

Binet R, Maurelli AT. (2005). Frequency of spontaneous mutations that confer antibiotic resistance in *Chlamydia* spp. *Antimicrob Agents Chemother*, 49:2865-2873.

Binet R, Maurelli AT. (2009a). Transformation and isolation of allelic exchange mutants of *Chlamydia psittaci* using recombinant DNA introduced by electroporation. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 106(1):292-7.

Binet R, Maurelli AT. (2009b). The chlamydial functional homolog of KsgA confers kasugamycin sensitivity to *Chlamydia trachomatis* and impacts bacterial fitness. *BMC Microbiol*, 9:279.

Black C M, Current methods of laboratory diagnosis of Chlamydia trachomatis infections, Clin Microbiol Rev. 1997 Jan; 10(1): 160–184

Borel N., Leonard C., Slade J., Schoborg R.V. (2016). Chlamydial Antibiotic Resistance and Treatment Failure in Veterinary and Human Medicine. *Current Clinical Microbiology Reports*, 3:10-18.

Burton MJ, Mabey DC. (2009). The global burden of trachoma: a review. *PLoS Negl Trop Dis*, 3:E460.

Byrne G I, *Chlamydia trachomatis* strains and virulence: rethinking links to infection prevalence and disease severity, J Infect Dis. 2010 Jun 15; 201(Suppl 2): S126–S133

CDC. (2008). *National Health and Nutrition Examination Survey, 2007-2008*. U.S. Department of Health and Human Services.

Centers for Disease Control. (2010). Sexually transmitted diseases treatment guidelines. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. ;55:79–85.

Chernesky M.A. (2005). The laboratory diagnosis of Chlamydia trachomatis infections. *The Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology*, 16(1):39-44.

Chien A, Edgar DB, Trela JM, Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*, J Bacteriol. 1976 Sep; 127(3): 1550–1557

Chopra I, Roberts M. (2001). Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev*, 65(2):232-60.

Choroszy-Król IC, Frej-Mądrzak M, Jama-Kmiecik A, Bober T, Jolanta Sarowska J. (2012). Characteristics of the Chlamydia trachomatis species - immunopathology and infections. *Adv Clin Exp Med*, 21(6):799-808.

Committee on Infectious Diseases, American Academy of Pediatrics et al. (2015). *Red Book*. Διαθέσιμο στην ιστοσελίδα της American Association of Pediatrics <https://redbook.solutions.aap.org/chapter.aspx?sectionid=88187122&bookid=1484>.

Πρόσβαση στις 15/06/2017.

control. *Future Microbiol*, 7:427-429.

Corneli HM. (2005). Nucleic acid amplification tests (polymerase chain reaction, ligase chain reaction) for the diagnosis of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in pediatric emergency medicine. *Pediatric Emergency Care*, 21(4):264-270.

D. Voytas, "Agarose gel electrophoresis," in *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc., 2001

Demars R, Weinfurter J, Guex E, Lin J, Potucek Y. (2007). Lateral gene transfer in vitro in the intracellular pathogen *Chlamydia trachomatis*. *J Bacteriol*, 189:991–1003.

Demars R, Weinfurter J, Guex E, Lin J, Potucek Y. (2007). Lateral gene transfer in vitro in the intracellular pathogen *Chlamydia trachomatis*. *J Bacteriol*, 189(3):991-1003.

Demars R, Weinfurter J, Guex E, Lin J, Potucek Y. (2007). Lateral gene transfer in vitro in the intracellular pathogen *Chlamydia trachomatis*. *J Bacteriol*, 189(3):991-1003.

DeMars R, Weinfurter J. (2008). Interstrain gene transfer in *Chlamydia trachomatis* in vitro: mechanism and significance. *J Bacteriol*, 190(5):1605-14.

Donati M, Di Francesco A, D'Antuono A, et al. (2009). *Chlamydia trachomatis* serovar distribution and other concurrent sexually transmitted infections in heterosexual men with urethritis in Italy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 28:523-526.

Dreses-Werringloer U, Padubrin I, Kohler L, Hudson AP. (2003). Detection of nucleotide variability in *rpoB* in both rifampin-sensitive and rifampin-resistant strains of *Chlamydia trachomatis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 47:2316-2318.

Dugan J, Rockey DD, Jones L, Andersen AA. (2004). Tetracycline resistance in *Chlamydia suis* mediated by genomic islands inserted into the chlamydial *inv*-like gene. *Antimicrob Agents Chemother*, 48(10):3989-95.

Dukers-Muijers NH, Speksnijder AG, Morr  SA, Wolffs PF, van der Sande MA, Brink AA, van den Broek IV, Werner MI, Hoebe CJ. (2013). Detection of anorectal and cervicovaginal *Chlamydia trachomatis* infections following azithromycin treatment:

prospective cohort study with multiple time-sequential measures of rRNA, DNA, quantitative load and symptoms. *PLoS One*, 20;8(11):e81236.

Elwell C., Mirrashidi K., Engel J. (2016). Chlamydia cell biology and pathogenesis. *Nature Reviews. Microbiology*, 14(6):385-400.

Engström P, Nguyen BD, Normark J, Nilsson I, Bastidas RJ, Gylfe A et al. (2013). Mutations in hemG mediate resistance to salicylidene acylhydrazides, demonstrating a novel link between protoporphyrinogen oxidase (HemG) and *Chlamydia trachomatis* infectivity. *J Bacteriol*, 195(18):4221-30.

Everett K.D.E., Bush R.M., Andersen A.A. (1999). Emended description of the order Chlamydiales, proposal of Parachlamydiaceae fam. nov. and Simkaniaceae fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family Chlamydiaceae with description of five new species, and standards for the identification of organisms. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 49, 415-440.

Geisler WM. (2010). Duration of untreated, uncomplicated *Chlamydia trachomatis* genital infection and factors associated with chlamydia resolution: a review of human studies. *J Infect Dis*, 2:S104-13.

Gerard HC, Whittum-Hudson JA, Carter JD, Hudson AP. (2009). Molecular biology of infectious agents in chronic arthritis. *Rheum Dis Clin North Am*, 35:1–19.

Goy G, Greub G. (2009). Antibiotic susceptibility of *Waddlia chondrophila* in *Acanthamoeba castellanii* amoebae. *Antimicrob Agents Chemother*, 53:2663-2666.

Greub G. (2009). *Parachlamydia acanthamoebae*, an emerging agent of pneumonia. *Clin Microbiol Infect*, 15:18-28.

Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM, Real time quantitative PCR, *Genome Res.* 1996 Oct;6(10):986-94

Herrmann B, Törner A, Low N, Klint M, Nilsson A, Velicko I, Söderblom Th , Blaxhult A, Emergence and Spread of *Chlamydia trachomatis* Variant, Sweden, *Emerg Infect Dis.* 2008 Sep; 14(9): 1462–1465

Hong KC, Schachter J, Moncada J, Zhou Z, House J, Lietman TM. (2009). Lack of macrolide resistance in *Chlamydia trachomatis* after mass azithromycin distributions for trachoma. *Emerg Infect Dis*, 15(7):1088-90.

Hsu J. F. , Evans A. S., Niederman J. C., and Cenabre L. C., An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for measurement of heterophile antibody, *Yale J Biol Med.* 1982 Sep-Dec; 55(5-6): 429–436.

J. Infect. Dis, 1(2):S88-S95 Horner PJ. (2012). Azithromycin antimicrobial resistance and genital *Chlamydia trachomatis* infection: duration of therapy may be the key to improving efficacy. *Sex Transm Infect*, 88(3):154-6.

Jacoby GA. (2005). Mechanisms of resistance to quinolones. *Clin Infect Dis*, 41(2):S120-6.

Kern JM, Maass V, Maass M. (2009). Molecular pathogenesis of chronic *Chlamydia pneumoniae* infection: a brief overview. *Clin Microbiol Infect*, 15:36–41.

Kintner J, Lajoie D, Hall J, Whittimore J, Schoborg RV. (2014). Commonly prescribed β -lactam antibiotics induce *C. trachomatis* persistence/stress in culture at physiologically relevant concentrations. *Front Cell Infect Microbiol*, 4:44.

Kohlhoff SA, Hammerschlag MR. (2015). Treatment of Chlamydial infections: 2014 update. *Expert Opin Pharmacother*, 16(2):205-12.

Kutlin A, Kohlhoff S, Roblin P, Hammerschlag MR, Riska P. (2005). Emergence of resistance to rifampin and rifalazil in *Chlamydia pneumoniae* and *Chlamydia trachomatis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 49:903-907.

Lawer FC, Stoffel S, Saiki RK, Chang Sh, Landre Ph, Abramson RD, Gelfand DH, High-level Expression, Purification and Enzymatic Characterization of Full-length *Thermus aquaticus* DNA Polymerase and a Truncated Form Deficient in 5' to 3' Exonuclease Activity, *PCR Methods and Applications*, 2:275-287, 1993

Lenart J, Andersen AA, Rockey DD. (2001). Growth and development of tetracycline-resistant *Chlamydia suis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 45:2198–2203.

Levidiotou S, Vrioni G, Papadogeorgaki H et al. (2005). *Chlamydia trachomatis* infections in Greece: first prevalence study using nucleic acid amplification test. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 24(3):207-213.

Ljubin-Sternak S, Mestrovic T, Vilibic-Cavlek T, Mlinaric-Galinovic G, Sviben M, Markotic A, Skerk V. (2013). In vitro susceptibility of urogenital *Chlamydia trachomatis* strains in a country with high azithromycin consumption rate. *Folia Microbiol (Praha)*, 58(5):361-5.

Magbanua J P V, Beng Tin Goh, Claude-Edouard Michel, Aura Aguirre Andreasen, Sarah Alexander, Ines Ushiro-Lumb, Catherine Ison, Helen Lee, *Chlamydia trachomatis* variant not detected by plasmid based nucleic acid amplification tests: molecular characterization and failure of single dose azithromycin, *Sex Transm Infect* 2007;83:339–343.

Michalova E, Novotna P, Schlegelova J. (2004). Tetracyclines in veterinary medicine and bacterial resistance to them. *Vet Med*, 49:79-100.

Morrison RP. (2003). New insights into a persistent problem - chlamydial infections. *The Journal of Clinical Investigation*, 111:1647-1649.

Munita J M, Arias C A, Mechanisms of Antibiotic Resistance, *Microbiol Spectr*. 2016 April ; 4(2)

Nguyen BD, Valdivia RH. (2012). Virulence determinants in the obligate intracellular pathogen *Chlamydia trachomatis* revealed by forward genetic approaches. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 109:1263-1268.

Nguyen F, Starosta AL, Arenz S, Sohmen D, Dönhöfer A, Wilson DN. (2014). Tetracycline antibiotics and resistance mechanisms. *Biol Chem*, 395(5):559-75.

Novais C.M., Pires-Alves M., Silva F.F. (2004). PCR em tempo real. *Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, 33:10-13.

O'Neill CE, Seth-Smith HM, Van Der Pol B, Harris SR, Thomson NR, Cutcliffe LT, Clarke IN. (2013). *Chlamydia trachomatis* clinical isolates identified as tetracycline resistant do not exhibit resistance in vitro: whole-genome sequencing reveals a mutation in *porB* but no evidence for tetracycline resistance genes. *Microbiology*, 159(4):748-56.

Pavlov AR, Pavlova NV, Kozyavkin SA, Slesarev AI, Recent developments in the optimization of thermostable DNA polymerases for efficient applications, *Trends in Biotechnology*, volume 22, issue 5, p 253-260, 1 May 2004

Pitt RA, Alexander S, Horner PJ, Ison CA. (2013). Presentation of clinically suspected persistent chlamydial infection: a case series. *Int J STD AIDS*, 24(6):469-75.

Rekart ML, Brunham RC. (2008). Epidemiology of chlamydial infection: are we losing ground? *Sex Transm Infect*, 84(2):87-91.

Riska PF, Kutlin A, Ajiboye P, Cua A, Roblin PM, Hammerschlag MR. (2004). Genetic and culture-based approaches for detecting macrolide resistance in *Chlamydia pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 48(9):3586-90.

Roberts MC. (2005). Update on acquired tetracycline resistance genes. *FEMS Microbiol Lett*, 245:195-203.

Rothstein DM, Suchland RJ, Xia M, Murphy CK, Stamm WE. (2008). Rifalazil retains activity against rifampin-resistant mutants of *Chlamydia pneumoniae*. *J Antibiot (Tokyo)*, 61:489-495.

Rupp J, Gebert A, Solbach W, Maass M. (2005). Serine-to-asparagine substitution in the GyrA gene leads to quinolone resistance in moxifloxacin-exposed *Chlamydia pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 49:406-407.

Rychlik W, Spencer WJ, Rhoads RE, Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro, *Nucleic Acids Research*, volume 18, issue 21, pp 6409-6412, 1990

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA, Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase, *Science*, vol.239, no. 4839, pp. 487-491, 29 January 1988

Sandoz K.M., Rockey D.D. (2010). Antibiotic resistance in Chlamydiae. *Future Microbiology*, 5(9):1427-1442.

Schachter J, Stephens R. (2008). *Biology of Chlamydia trachomatis*. In: Homes K, Sparling P, Mardh P-A, et al (eds). *Sexually Transmitted Diseases*. New York: McGraw Hill; .

Sköld O. (2001). Resistance to trimethoprim and sulfonamides. *Vet Res*, 32(4):261-73.

Song L, Carlson JH, Whitmire WM, Kari L, Virtaneva K, Sturdevant DE, Watkins H, et al. (2013). The *Chlamydia trachomatis* plasmid-encoded Pgp4 is a transcriptional regulator of virulence associated genes. *Infect. Immun*, 81:636-644.

Stamm LV. (2010). Global challenge of antibiotic-resistant *Treponema pallidum*. *Antimicrob. Agents Chemother*, 54:583-589.

Stamm W. (2008). *Chlamydia trachomatis infections of the adult*. In: Homes K, Sparling P, Mardh P-A, et al (eds). *Sexually Transmitted Diseases*. New York: McGraw Hill.

Stamm W.E. (2008). *Chlamydia trachomatis*. In: KK Holmes et al., eds., *Sexually Transmitted Diseases*, 4th ed.– New York: McGraw-Hill.

Stephens AJ, Aubuchon M, Schust DJ. (2011). Antichlamydial antibodies, human fertility, and pregnancy wastage. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*, 525182.

Suchland RJ, Bourillon A, Denamur E, Stamm WE, Rothstein DM. (2005). Rifampin-resistant RNA polymerase mutants of *Chlamydia trachomatis* remain susceptible to the ansamycin rifalazil. *Antimicrob Agents Chemother*, 49:1120-1126.

Suchland RJ, Sandoz KM, Jeffrey BM, Stamm WE, Rockey DD. (2009). Horizontal transfer of tetracycline resistance among *Chlamydia* spp. in vitro. *Antimicrob Agents Chemother*, 53(11):4604-11.

Tenson T, Lovmar M, Ehrenberg M. (2003). The mechanism of action of macrolides, lincosamides and streptogramin B reveals the nascent peptide exit path in the ribosome. *J Mol Biol*, 330(5):1005-14.

Thomson NR, Clarke IN. (2010). *Chlamydia trachomatis*: small genome, big challenges. *Future Microbiol*, 5(4):555-61.

Tian RM, Cai L, Zhang WP, Cao HL, Qian PY. (2015). Rare Events of Intragenus and Intraspecies Horizontal Transfer of the 16S rRNA Gene. *Genome Biol Evol*, 7(8):2310-20.

Unemo M, Seth-Smith H M B, Cutcliffe L T , Skilton R J , Barlow D, Goulding D , Persson K, Harris S R , Kelly A, Bjartling C, Fredlund H, Per Olce' n, Thomson N R, Clarke I N, The Swedish new variant of *Chlamydia trachomatis*: genome sequence, morphology, cell tropism and phenotypic characterization, *Microbiology* (2010), 156, 1394–1404

Valdivia RH. (2012). Thinking outside the box: new strategies for antichlamydial

Watson, J D; Baker, T A; Bell, S P; Gann, A; Levine, M; Losick, R (2004). *Molecular Biology of the Gene* (Fifth ed.). San Francisco: Benjamin Cummings.

West SK, Moncada J, Munoz B, Mkocho H, Storey P, Hardick J, Gaydos CA, Quinn TC, Schachter J. (2014). Is there evidence for resistance of ocular *Chlamydia trachomatis* to azithromycin after mass treatment for trachoma control? *J Infect Dis*, 210(1):65-71.

Workowski KA, Levine WC, Wasserheit JN, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia. (2002). U.S. Centers for Disease Control and Prevention guidelines for

the treatment of sexually transmitted diseases: an opportunity to unify clinical and public health practice. *Ann Intern Med*,137(4):255-62.

World Health Organization. (2012). *Global incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted infections - 2008*. Geneva: World Health Organization.

Wyrick PB. (2010). *Chlamydia trachomatis* persistence *in vitro*: an overview.

Zhong G., Lei L., Gong S., Lu C., Qi M., Chen D. (2011). Chlamydia-secreted proteins in chlamydial interactions with host cells. *Current Chemical Biology*, 5:29–37.

Πόγγας Ν., Χαρβάλου Α. (2011). *Ιατρική Μικροβιολογία*. Αθήν: Οδυσσέας.