



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΟΣ

ΚΛΙΝΙΚΗ ΜΑΙΕΥΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΑΣ

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΗΣ ΤΡΑΧΗΛΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ
ΧΛΩΡΙΔΑΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΣΥΣΤΑΣΗΣ ΤΟΥ ΑΜΝΙΑΚΟΥ ΥΓΡΟΥ ΣΕ
ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΗΣ ΚΥΗΣΗΣ**

ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ ΓΙΑΣΛΑΚΙΩΤΗΣ

ΙΑΤΡΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2024



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΟΣ

ΚΛΙΝΙΚΗ ΜΑΙΕΥΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΑΣ

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΗΣ ΤΡΑΧΗΛΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ
ΧΛΩΡΙΔΑΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΣΥΣΤΑΣΗΣ ΤΟΥ ΑΜΝΙΑΚΟΥ ΥΓΡΟΥ ΣΕ
ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΗΣ ΚΥΗΣΗΣ**

ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ ΓΙΑΣΛΑΚΙΩΤΗΣ

ΙΑΤΡΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος).

Ημερομηνία αίτησης του κ. Γιασλακιώτη Βασιλείου: 07-12-2017

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: Γ.Σ. αριθμ. 855/15-05-2018

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων:

Στέφος Θεόδωρος, Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας με έμφαση στην Εμβρυομητρική Ιατρική του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη:

Γεωργίου Ιωάννης, Καθηγητής Ιατρικής Γενετικής και Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Μαιευτικής-Γυναικολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ζηκόπουλος Κωνσταντίνος, Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας με έμφαση στην Υποβοηθούμενη Αναπαραγωγή του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 12-06-2018

«Διερεύνηση του ρόλου της τραχηλικής μικροβιακής χλωρίδας και της σύστασης του αμνιακού υγρού σε σχέση με την εξέλιξη της κύησης»

Ανασυγκρότηση Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: Γ.Σ. αριθμ. 1080α/14-12-2023

Επιβλέπων:

Στέφος Θεόδωρος, Ομότιμος Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας με έμφαση στην Εμβρυομητρική Ιατρική του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη:

Γεωργίου Ιωάννης, Καθηγητής Ιατρικής Γενετικής και Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Μαιευτικής-Γυναικολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Σκέντου Χαρίκλεια, Επίκουρη Καθηγήτρια Μαιευτικής-Γυναικολογίας με έμφαση στην Εμβρυομητρική του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ: 1117α/11-07-2024

1. **Στέφος Θεόδωρος**, Ομότιμος Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας με έμφαση στην Εμβρυομητρική Ιατρική του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
2. **Γεωργίου Ιωάννης**, Καθηγητής Ιατρικής Γενετικής και Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Μαιευτικής-Γυναικολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
3. **Σκέντου Χαρίκλεια**, Επίκουρη Καθηγήτρια Μαιευτικής-Γυναικολογίας με έμφαση στην Εμβρυομητρική Ιατρική του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
4. **Πασχόπουλος Μηνάς**, Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
5. **Ναυρόζογλου Ιορδάνης**, Επίκουρος Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας με έμφαση στη Γυναικολογική Ογκολογία και Παθολογία του Μαστού του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
6. **Βατοπούλου-Βουγιούκα Αναστασία**, Επίκουρη Καθηγήτρια στη Μαιευτική-Γυναικολογία με έμφαση στην Παιδική και Εφηβική Γυναικολογία του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
7. **Γκρόζου Φανή**, Επίκουρη Καθηγήτρια Μαιευτικής-Γυναικολογίας με έμφαση στη Γυναικολογική Ενδοσκόπηση του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 08-10-2024

Ιωάννινα 08-11-2024

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Σπυρίδων Κονιτσιώτης

Καθηγητής Νευρολογίας



Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Θεόδωρο Στέφο, Καθηγητή Μαιευτικής-Γυναικολογίας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, για την επίβλεψη της διδακτορικής διατριβής, καθώς και τους κυρίους Ιωάννη Γεωργίου, Καθηγητή Ιατρικής Γενετικής και Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Μαιευτικής-Γυναικολογίας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και Κωνσταντίνο Ζηκόπουλο, Καθηγητή Μαιευτικής-Γυναικολογίας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων με έμφαση στην Υποβοηθούμενη Αναπαραγωγή, για τις επιστημονικές τους παρατηρήσεις.

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω τον κύριο Μηνά Πασχόπουλο, Καθηγητή Μαιευτικής-Γυναικολογίας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, τον κύριο Ιορδάνη Ναυρόζογλου, Καθηγητή Μαιευτικής-Γυναικολογίας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, την κυρία Χαρίκλεια Σκέντου, Επίκουρο Καθηγήτρια Μαιευτικής-Γυναικολογίας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, την κυρία Αναστασία Βατοπούλου, Επίκουρο Καθηγήτρια Μαιευτικής-Γυναικολογίας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και την κυρία Φανή Γκρόζου, Επίκουρο Καθηγήτρια Μαιευτικής-Γυναικολογίας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για τη συμμετοχή τους στην αξιολόγηση της διδακτορικής διατριβής.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα την κυρία Ειρήνη Μάστορα, Μεταδιδακτορική Ερευνήτρια Ιατρικής, Επιστημονική Συνεργάτη της Μονάδας Ιατρικώς Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής, για τη συνεργασία μας.

*Στην αγαπημένη μου σύντροφο και συνάδελφο Γεωργία
Στα αγαπημένα μου παιδιά Ιωάννη και Μαρία Κατερίνα
για την υπομονή και αμέριστη συμπαράστασή τους*

Πίνακας Περιεχομένων

Σελίδα

1. Εισαγωγή.....	3
Ιστορική αναδρομή, Σκοπός	
1.1.Γενικό μέρος.....	5
1.2. Αμνιακό Υγρό.....	10
1.3. Mycoplasma spp και Ureaplasma spp.....	15
1.4. Mycoplasma genitalium και Mycoplasma hominis.....	17
1.5. Ureaplasma parvum και Ureaplasma urealyticum.....	22
1.6. Chlamydia trachomatis.....	25
1.7. Εργαστηριακή Διάγνωση Mycoplasma και Ureaplasma.....	29
1.8. Εργαστηριακή Διάγνωση Chlamydia.....	36
1.9. Μοριακές Δοκιμές.....	39
I) Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR.....	39
II) Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζης.....	41
III) Nested PCR.....	42
IV) Real time PCR.....	43
Σκοπός.....	47
Ειδικό Μέρος.....	48
2. Υλικά και Μέθοδος.....	49
2.1.Υλικά - Επιδημιολογικά δεδομένα – Ανάλυση.....	50–53
2.2.Μέθοδοι.....	54 – 67
3. Αποτελέσματα.....	67

4. Συζήτηση.....	75
5. Συμπεράσματα.....	81
5.1. Γενικά συμπεράσματα.....	82
5.2. Τελικό συμπέρασμα.....	83
Περίληψη.....	84
Abstract.....	85
6. Βιβλιογραφία.....	86 - 103

1. Εισαγωγή

Ιστορική αναδρομή

Από δεκαετίες απασχολεί την επιστημονική κοινότητα η πιθανότητα παρουσίας μικροβιώματος στο αμνιακό υγρό και η πιθανή του συσχέτιση με δυσμενή έκβαση της εξέλιξης της κύησης όπως η προωρότητα ή η πρόωρη ρήξη των εμβρυικών μεμβρανών. Αν εξαιρεθούν οι περιπτώσεις εμφάνισης στο ιστορικό εγκύων γυναικών λοιμωδών παραγόντων, στις ασυμπτωματικές υγιείς εγκύους γυναίκες, οι μελέτες πολύ δύσκολα και με αρκετές ασάφειες μέχρι σήμερα, κατάφεραν να αποδείξουν μια πιθανή μετανάστευση μικροοργανισμών της κολποτραχηλικής χλωρίδος και πόσο μάλλον αποικισμό, της αμνιακής μεμβράνης και κοιλότητας.

Η παρούσα μελέτη έρχεται ακριβώς να καταδείξει την μη παρουσία μικροβιώματος στο αμνιακό υγρό ασυμπτωματικών εγκύων γυναικών, δίνοντας όμως έμφαση σε μικρόβια της κολποτραχηλικής χλωρίδος, που κυρίως συχνά απασχολούν την επιστημονική κοινότητα, δεδομένης της εμπλοκής τους σε σεξουαλικά μεταδιδόμενα νοσήματα, αποτελούν όμως σε πολύ μικρό ποσοστό, κάποια εξ αυτών και τμήμα της χλωρίδος πολλών νέων γυναικών. Επίσης έχει θεωρηθεί ως πιθανή η εμπλοκή τους σε προωρότητα ή πρόωρη ρήξη εβρυικών υμένων.

Σκοπός

Για την πραγματοποίηση του **σκοπού** της συγκεκριμένης μελέτης, στηριχθήκαμε στην εφαρμογή εξειδικευμένων μοριακών τεχνικών, που αποσκοπούν στην πιθανή απομόνωση γενετικού μικροβιακού υλικού στο αμνιακό υγρό, το οποίο διερευνήθηκε εντατικά. Συγκεκριμένα η μελέτη υλοποιήθηκε σε μια ομάδα υγιών ασυμπτωματικών γυναικών, ώστε να προσδιορισθεί ο επιπολασμός της ενδοαμνιακής μικροβιακής εισβολής και να εξετασθούν τα επακόλουθα αποτελέσματα των κύσεων. Το δείγμα του αμνιακού υγρού ελήφθη, μετά από αμνιοπαρακέντηση, μεταξύ 15 και 22 εβδομάδων κύησης και αξιολογήθηκε για την παρουσία μικροοργανισμών στην αμνιακή κοιλότητα, με ειδική PCR για τα είδη *Mycoplasma genitalium*,

Mycoplasma hominis, *Ureaplasma parvum*, *Ureaplasma urealyticum*, *Chlamydia trachomatis* και για την παρουσία άλλων βακτηριακών παθογόνων, χρησιμοποιώντας πραγματικού χρόνου PCR (*realtimePCR*), που υπερέχει της κλασσικής PCR, καθώς επίσης και μεθόδους στόχευσης του ειδικού για βακτήρια γονιδίου 16SrRNA.

1.1 Γενικό μέρος

Τα σεξουαλικά μεταδιδόμενα νοσήματα, αν και ιδιαίτερα συχνά, χαρακτηρίζονται από μια σχετική υποεκτίμηση των συνεπειών τους, τόσο από το γενικό πληθυσμό, όσο και από τους επαγγελματίες υγείας. Φυσικά, το φάσμα των σεξουαλικά μεταδιδόμενων νοσημάτων μεταβάλλεται σημαντικά στο πέρασμα των χρόνων. Οι κλασικές παθήσεις της βλεννόρροιας και της σύφιλης εντοπίζονται πλέον σπάνια, καθώς η έντονη συμπτωματολογία τους οδηγεί τον ασθενή στην άμεση αναζήτηση ιατρικής βοήθειας, ενώ η αντιμικροβιακή τους αντιμετώπιση αποτελεί πλέον ρουτίνα. Αντιθέτως, οι λοιμώξεις από παθογόνα μικρόβια, όπως τα χλαμύδια, τα μυκοπλάσματα και τα ουρεοπλάσματα ανιχνεύονται με διαρκώς αυξανόμενη συχνότητα και σε ολοένα μικρότερες ηλικίες. Αν και η διάγνωσή τους καθυστερεί ή δεν πραγματοποιείται καν, λόγω της ιδιαίτερα ήπιας κλινικής τους εικόνας, η χρονιότητά τους σχετίζεται με σοβαρές επιπλοκές, όπως ολιγοασθενοσπερμία στους άνδρες, υπογονιμότητα σαλπιγγικού παράγοντα ή έκτοπη κύηση στις γυναίκες.

Τα *Chlamydia* αποτελούν μέλη της οικογένειας *Chlamydiaceae*. Είναι μικροί, μη κινητοί, Gram αρνητικοί μικροοργανισμοί. Ως υποχρεωτικά ενδοκυττάρια, αναπτύσσονται στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων-ξενιστών (Mishori, etal, 2012). Για τον άνθρωπο, δύο εξ' αυτών έχουν κλινική σημασία, το γένος *Chlamydia*, το οποίο περιλαμβάνει το είδος *Chlamydia trachomatis* και το γένος *Chlamydophila*, το οποίο περιλαμβάνει τα είδη *Chlamydophila pneumoniae*, *Chlamydophila abortus* και *Chlamydophila psittaci*. Τα συγκεκριμένα παθογόνα διαθέτουν αρκετά κοινά χαρακτηριστικά με τα βακτήρια, καθώς είναι ευαίσθητα στα αντιβιοτικά, ενώ μοιάζουν και με τους ιούς, απαιτώντας ζωντανά κύτταρα για τον πολλαπλασιασμό τους.

Η χλαμυδιακή λοίμωξη συνιστά ένα ιδιαίτερα συχνά εμφανιζόμενο αφροδίσιο νόσημα (Baud, etal, 2011). Προκαλείται από το μικρόβιο *Chlamydia trachomatis* και εντοπίζεται κυρίως σε νεαρά άτομα με ενεργό σεξουαλική ζωή και πολλαπλούς συντρόφους. Μεταδίδεται με τη σεξουαλική πράξη κάθε μορφής, με την επαφή με τα γεννητικά όργανα, καθώς και από τη μολυσμένη

μητέρα στο νεογνό κατά τη διέλευσή του από το γεννητικό σωλήνα στον κολπικό τοκετό.

Αν και υφίσταται αποτελεσματική θεραπεία αντιμετώπισης της χλαμυδιακής λοίμωξης, εντούτοις διακρίνεται συνήθως από απουσία εμφανούς συμπτωματολογίας, γεγονός το οποίο δυσχεραίνει την έγκαιρη διάγνωση και θεραπεία, προκαλώντας παράλληλα ανησυχία λόγω των σοβαρών επιπτώσεών της. Η λοίμωξη από τα χλαμύδια χαρακτηρίζεται σιωπηλή νόσος, καθώς η πλειοψηφία των ασθενών είναι ασυμπτωματικοί.

Στις γυναίκες, το 70-80% των περιστατικών δεν εμφανίζει συμπτώματα και επομένως η παρουσία της λοίμωξης ενδέχεται να διαπιστωθεί αρκετό καιρό μετά τη μόλυνση. Πρωτίστως προκαλείται τραχηλίτιδα ή σαλπινγγίτιδα, ενώ στη συνέχεια οι βλάβες επεκτείνονται και σε άλλα όργανα του αναπαραγωγικού συστήματος. Τα συμπτώματα περιλαμβάνουν συνήθως τοπική ερυθρότητα, κνησμό ή οίδημα του κόλπου, βλενοπυώδεις κολπικές εκκρίσεις, κολπική αιμόρροια, μητρορραγία, αιμορραγία μετά τη σεξουαλική επαφή, κοιλιακό άλγος, δυσπαραουρία, συχνουρία, πόνο στην ούρηση, ακόμη και πυρετό.

Στους άνδρες, το 50% των περιστατικών δεν εμφανίζει κανένα σύμπτωμα, ενώ στο υπόλοιπο 50% εντοπίζονται συμπτώματα ουρηθρίτιδας, κυρίως πόνος ή κάψιμο στην ούρηση, επιδιδυμίτιδας, ακόμη και προστατίτιδας. Παρατηρούνται επίσης εκκρίσεις από το πέος, διογκωμένοι όρχεις και πυρετός. Σπανίως, η παρουσία των χλαμυδίων ενδέχεται να προκαλέσει ακόμη και υπογονιμότητα.

Η θεραπεία των χλαμυδίων (Mestrovic, etal, 2018) πραγματοποιείται με τη λήψη βακτηριοστατικών αντιβιοτικών, όπως μακρολίδες (αζιθρομυκίνη, κλαριθρομυκίνη, ερυθρομυκίνη) ή τετρακυκλίνες (δοξυκυκλίνη, τετρακυκλίνη), ενώ στις έγκυες και τις θηλάζουσες γυναίκες συνιστάται κυρίως η ερυθρομυκίνη και εναλλακτικά η αμοξικιλίνη. Κατά κανόνα, προτείνεται η λήψη θεραπείας και από την πλευρά του/της συντρόφου, κατόπιν προγενέστερης ιατρικής ενημέρωσης. Η λοίμωξη επανεμφανίζεται συχνά λόγω μη ανιχνεύσιμης πηγής μόλυνσης του άλλου συντρόφου, ακόμη και αν ο ένας από τους δύο έχει υποβληθεί σε θεραπεία. (Lewis, etal, 2017).

Τα γένη *Mycoplasma* και *Ureaplasma* συγκαταλέγονται στην οικογένεια των *Mycoplasma taceae* και στην κλάση των *Mollicutes*. Αποτελούν τους μικρότερους κυτταρικούς μικροοργανισμούς που ζουν ελεύθεροι στη φύση. Χαρακτηρίζονται από πλειομορφικό σχήμα. Στερούνται κυτταρικού τοιχώματος και περιβάλλονται από μία απλή κυτταρική μεμβράνη τριών στρωμάτων, η οποία περιέχει στερόλες, ενώ σχηματίζουν πολύμορφα νημάτια. Είναι προαιρετικά αναερόβιοι μικροοργανισμοί και διαιρούνται με διχοτόμηση. Η γενετική πληροφορία που φέρουν είναι ελάχιστη, γι' αυτό και διαθέτουν περιορισμένες βιοσυνθετικές ικανότητες. Είναι ανθεκτικοί στα αντιβιοτικά οργανισμοί, λόγω της απουσίας κυτταρικού τοιχώματος (καθώς η πλειονότητα των αντιβιοτικών, όπως οι β-λακτάμες, δρουν εκεί). Δε βάφονται με τη χρώση Gram, ούτε αναπτύσσονται σε κοινά θρεπτικά μέσα, αλλά σε εξειδικευμένα θρεπτικά υλικά, από τα οποία απουσιάζουν κύτταρα εμπλουτισμένα με χοληστερόλη.

Τα μυκοπλάσματα ενοχοποιούνται στο σύνολό τους για ποικίλες λοιμώξεις του αναπαραγωγικού συστήματος, όπως προστατίτιδα, μη γονοκοκκική ουρηθρίτιδα, κολπίτιδα, τραχηλίτιδα, σαλπινγίτιδα και πυελική φλεγμονή, ενώ ευθύνονται και για περιστατικά ανδρικής και γυναικείας υπογονιμότητας. Συνδέονται ακόμη με προωρότητα, αυτόματες αποβολές και γεννήσεις νεογνών χαμηλού σωματικού βάρους.

Η παρουσία των μυκοπλάσμάτων δεν οδηγεί απαραίτητως σε λοίμωξη. Μπορεί να αφορά φορεία ή υποκλινική περίπτωση. Το *Mycoplasma* και το *Ureaplasma* πιθανολογείται πως δρουν ως ευκαιριακά παθογόνα. Αν και συσχετίζονται με αρκετές λοιμώξεις, ο παθογενετικός τους ρόλος αμφισβητείται, καθώς απομονώνονται συχνά και στη φυσιολογική μικροβιακή χλωρίδα. Το *Ureaplasma* αποικίζει τον κόλπο ασυμπτωματικών γυναικών σε ποσοστό 40-80%, ενώ το *Mycoplasma* σε ποσοστό 21-53% (Waites, etal, 2005). Τα ποσοστά ανεύρεσής τους στο σπέρμα ασυμπτωματικών ανδρών είναι χαμηλότερα. Ο αποικισμός εξαρτάται από το φύλο, την ηλικία, τη σεξουαλική δραστηριότητα και το ορμονικό προφίλ (Αρσένη Α., 1994), ενώ συνδέεται αναλογικά με το νεαρό της ηλικίας, το χαμηλό κοινωνικοοικονομικό επίπεδο, την πολλαπλότητα σεξουαλικών συντρόφων (Cassell, etal, 1993).

Τα χλαμύδια αποτελούν το συχνότερα διαγνωσθέν σεξουαλικά μεταδιδόμενο παθογόνο, το οποίο συνοδεύεται από σοβαρές συνέπειες και στα δύο φύλα, έκτοπη κύηση στις γυναίκες και υπογονιμότητα τόσο στις γυναίκες όσο και στους άνδρες (Price, etal, 2016). Σε παγκόσμιο επίπεδο, διενεργούνται εκτεταμένες δοκιμές αναφορικά με τα σεξουαλικά μεταδιδόμενα μικρόβια, ενώ ελέγχεται συνεχώς η αποτελεσματικότητα των προγραμμάτων (Chow, etal, 2016), άλλοτε υποδεικνύοντας περιορισμό του επιπολασμού της πνευλικής φλεγμονώδους νόσου (Gottlieb, etal, 2013, Public Health England, 2014) και άλλοτε όχι (vandenBroek, etal, 2012, Andersen, etal, 2012, Woodhall, etal, 2016).

Στην Ελλάδα, τα επιδημιολογικά στοιχεία σχετικά με τον επιπολασμό των λοιμώξεων του γεννητικού συστήματος από χλαμύδια, μυκόπλασμα και ουρεόπλασμα δυστυχώς απουσιάζουν. Ωστόσο, έχουν υλοποιηθεί κάποιες μελέτες, έστω και ελάχιστες, σχετικά με τον προσδιορισμό της συχνότητας ανίχνευσής των δεδομένων παθογόνων. Συγκεκριμένα, το *Ureaplasma* εντοπίστηκε σε ασυμπτωματικές γυναίκες σε ποσοστό 16,13% (Kotrotsiou, etal, 2013), ενώ το *Ureaplasma urealyticum* σε ποσοστό 52,9% και το *Mycoplasma hominis* σε ποσοστό 3,3% σε γυναίκες με χρόνια γυναικολογικά συμπτώματα (Baka, etal, 2009). Τα *Chlamydia trachomatis* εντοπίστηκαν σε ποσοστό 0,58% στο σπέρμα ασυμπτωματικών ανδρών, ενώ στο 11,62% εντοπίστηκε τουλάχιστον ένας από τους μικροοργανισμούς *Chlamydia Mycoplasma Ureaplasma* (Gerovassili, etal, 2017).

Ο ενισχυμένος επιπολασμός των χλαμυδίων, του μυκοπλάσματος και του ουρεοπλάσματος, η συχνότητα αποικισμού τους, καθώς και η συμμετοχή τους στην παθογένεια διαφόρων λοιμώξεων, απαιτεί την εφαρμογή κατάλληλων διαγνωστικών μεθόδων, ευαίσθητων, αξιόπιστων, άμεσων και ταχέων, περισσότερο μοριακών και λιγότερο συμβατικών τεχνικών.

Μελέτες σε ασυμπτωματικές γυναίκες έχουν διερευνήσει την παρουσία μικροοργανισμών στο αμνιακό υγρό από αμνιοπαρακέντηση, η οποία πραγματοποιήθηκε στο δεύτερο τρίμηνο για γενετικό έλεγχο. Μερικές, (Gerber, etal, 2003, Nguyen, etal, 2004, Perni, etal, 2004) αλλά όχι όλες (Rodriguez, etal, 2011) οι μελέτες έχουν προτείνει ότι το *Ureaplasma*

urealyticum ή το Mycoplasma hominis στο αμνιακό υγρό μπορεί να συσχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο για πρόωρη ρήξη εμβρυικών υμένων και πρόωρο τοκετό.

Ο ρόλος των μυκοπλάσμάτων και η κλινική τους σημασία στο αμνιακό υγρό των ασυμπτωματικών γυναικών παραμένουν ασαφείς. Απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για την κατανόηση της αιτιολογίας και της παθογένειας του πρόωρου τοκετού σε σχέση με την παρουσία ή την απουσία της ασυμπτωματικής ενδοαμνιακής μικροβιακής εισβολής.

1.2. Αμνιακό Υγρό

Από τα πρώτα στάδια της εμφύτευσης της βλαστοκύστης, αναπτύσσεται ένας χώρος μεταξύ της εμβρυοβλάστης και της τροφοβλάστης, που διατηρείται και στα επόμενα στάδια της κύησης. Μικρά κύτταρα που επενδύουν την εσωτερική επιφάνεια της τροφοβλάστης (αμνιογεννητικά κύτταρα) είναι οι πρόδρομοι του αμνιακού επιθηλίου. Με την επέκταση της σχισμής που χωρίζει αυτά τα κύτταρα από το έμβρυο, αναπτύσσεται η αμνιακή κοιλότητα που προοδευτικά έρχεται να περιβάλλει το έμβρυο (Benirschke & Kaufman 1990).

Το αμνιακό υγρό (LA) είναι ένα σύμπλεγμα απαραίτητων και σημαντικών ουσιών για την πλήρη ανάπτυξη της ενδομήτριας ζωής. Καταλαμβάνει την αμνιακή κοιλότητα από τα πρώτα στάδια της κύησης δημιουργώντας έναν φυσικό χώρο γύρω από το έμβρυο. Περιέχει θρεπτικά συστατικά και αυξητικούς παράγοντες.

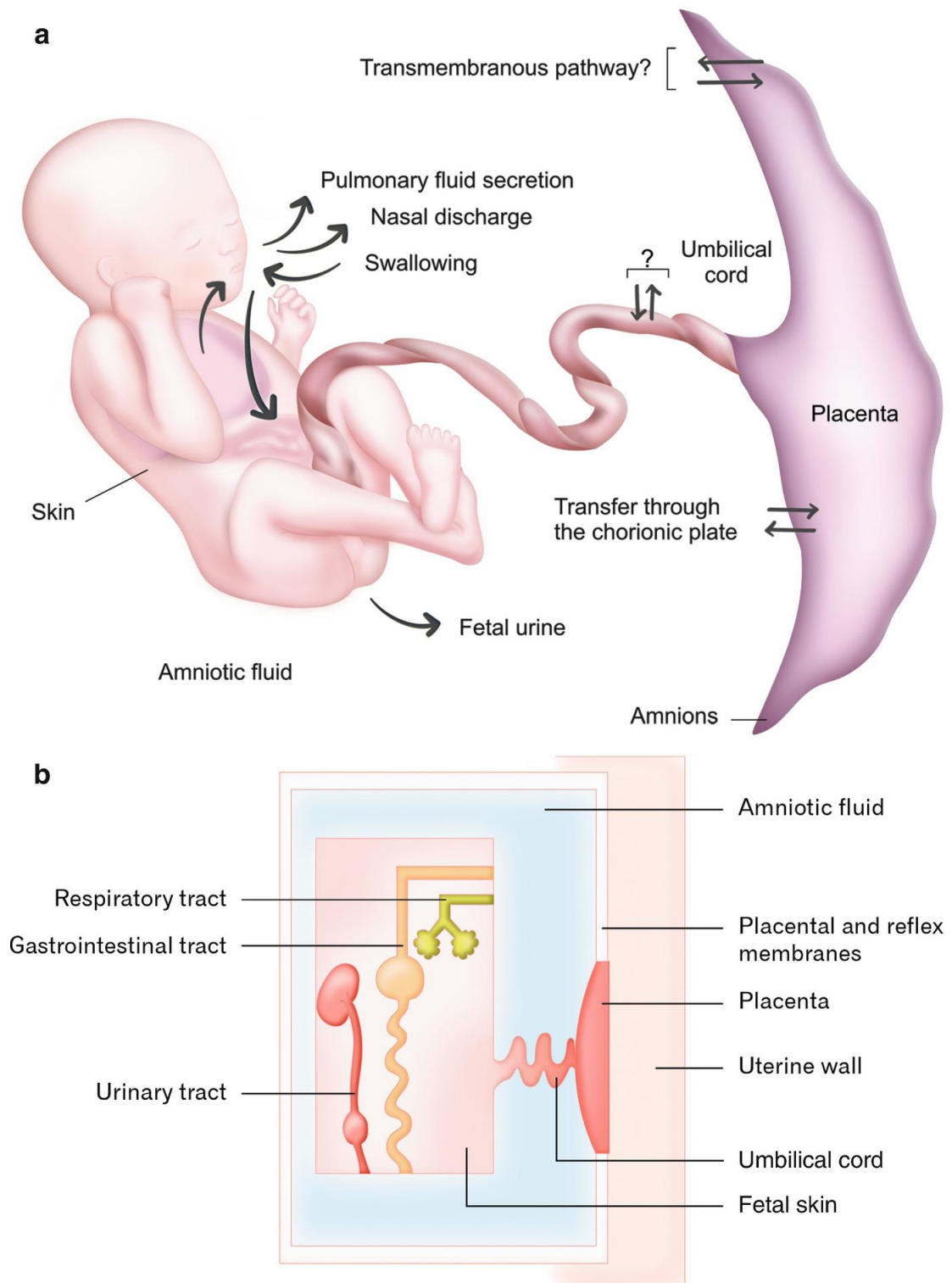
Οι διαδικασίες παραγωγής και απορρόφησης του αμνιακού υγρού οφείλονται σε πολλαπλούς παράγοντες, γεγονός που αποτελεί αιτία αυξανόμενης έρευνας τις τελευταίες δεκαετίες.

Η αμνιακή κοιλότητα εμφανίζεται την όγδοη ημέρα της κύησης. Στα αρχικά στάδια της εγκυμοσύνης, η αμνιακή κοιλότητα γεμίζει με ένα υγρό παρόμοιας σύνθεσης με αυτό του εξωκυττάριου υγρού, με κρυσταλλική εμφάνιση, που παράγεται εν μέρει από αμνιακά κύτταρα αλλά κυρίως προέρχεται από το μητρικό αίμα. (Sadler TW. Langman's medical embryology. 13th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health; 2015.)

Το αμνιακό υγρό πρωτοεμφανίζεται μετά τη σύγκλιση της αμνιακής κοιλότητας, την 4η εβδομάδα της κύησης, και υπάρχει στενή σχέση μεταξύ των μεταβολών που παρατηρούνται στο αμνιακό υγρό στη διάρκεια της κύησης και στην ανάπτυξη του εμβρύου. Συνοπτικά, το αμνιακό υγρό, στα πρώτα στάδια της κύησης, σχηματίζεται από την έκκριση και τη διήδρωση υγρού διά μέσου του αμνίου και του εμβρυϊκού δέρματος και αργότερα από

την αποβολή των ούρων του εμβρύου μέσα στην αμνιακή κοιλότητα. Όμως, στο σύνολό της, η ακριβής προέλευση του αμνιακού υγρού είναι ακόμα αδιευκρίνιστη (Bali & Mukhopadhyay 2004). Ενώ στην αρχή της κύησης, το αμνιακό υγρό είναι διαυγές, με την πρόοδο της ηλικίας της κύησης γίνεται ελφρώς θολερό (σημείο πιθανής πρόωρης ρήξης θυλακίου), λόγω της παρουσίας σμήγματος και επιδερμικών κυττάρων, ενώ παρατηρούνται διάφορες βιοχημικές μεταβολές του με την πρόοδο της ωριμότητας του εμβρύου. Από τα προηγούμενα, συμπεραίνεται ότι η μελέτη του αμνιακού υγρού, μετά από αμνιοπαρακέντηση, κυρίως μετά τη 16η εβδομάδα της κύησης, προσφέρει διαφόρων ειδών πληροφορίες για το έμβρυο, όπως για τα χρωμοσωμικά του χαρακτηριστικά και την ωριμότητά του.

Το αμνιακό υγρό αποτελείται από 98-99% νερό και 1-2% στερεά συστατικά, από τα οποία τα μισά είναι πρωτεΐνες και άλλα οργανικά στοιχεία και τα υπόλοιπα είναι ανόργανα στοιχεία. Στις πρώτες 20 εβδομάδες της κύησης, υπάρχει πολύ θετική συσχέτιση μεταξύ του βάρους του εμβρύου και του όγκου του αμνιακού υγρού. Σε αυτή την περίοδο της κύησης, το αμνιακό υγρό μοιάζει πολύ με το εξωκυττάριο υγρό του σώματος του εμβρύου διότι φαίνεται να χωρίζεται από εκείνο μόνο με το δέρμα του εμβρύου, που αρχικά είναι διαπερατό. Το προηγούμενο υποστηρίζεται από το γεγονός ότι οι πυκνότητες διαφόρων ουσιών, που υπάρχουν στο αμνιακό υγρό, π.χ. ηλεκτρολυτών (όπως του χλωρίου και του νατρίου), πλησιάζουν περισσότερο στις αντίστοιχες πυκνότητες του ορού του αίματος του εμβρύου παρά του μητρικού αίματος. Κατά το πρώτο μισό της εγκυμοσύνης, η μεταφορά νερού και άλλων μικρών μορίων γίνεται, μέσω του αμνίου (διαμεμβρανική ροή), μέσω των εμβρυϊκών αγγείων στην επιφάνεια του πλακούντα (ενδομεμβρανική ροή) και μέσω του δέρματος του εμβρύου. Η εμβρυϊκή διούρηση ξεκινά μεταξύ 11 και 12 εβδομάδων, οπότε η νεφρική λειτουργία έχει ολοκληρωθεί, αλλά τα ούρα δεν γίνονται το ουσιαστικό συστατικό του αμνιακού υγρού μέχρι το δεύτερο τρίμηνο. Αυτή η τελευταία παρατήρηση εξηγεί γιατί τα έμβρυα με θανατηφόρες νεφρικές ανωμαλίες δεν εκδηλώνουν σοβαρό oligoamnion παρά μόνο μετά τις 18 εβδομάδες. Η μεταφορά νερού μέσω του δέρματος του εμβρύου συνεχίζεται έως ότου συμβεί κερατινοποίηση μεταξύ 22 και 25 εβδομάδων. Αυτός είναι ο λόγος για τον οποίο τα εξαιρετικά πρόωρα βρέφη μπορούν να χάσουν σημαντικές ποσότητες υγρών μέσω του δέρματος (Εικ. 1).



(Εικ. 1).Σχηματισμός του αμνιακού υγρού στο δεύτερο μισό της κύησης. (a); Σχήμα της λειτουργίας του ομφαλίου λώρου. (b). Illustrated by Dr. Mario Palermo and Miss Karina Barbieri as Graphic illustrator. (Adapted from Callen and Madar) Callen P. Ultrasonography in Obstetrics and Gynecology, 4th edition. 2000 W.B.Saunders Company.Trad. Ed. Medica Panamericana.

Είναι γνωστό, επίσης, ότι τις πρώτες κυρίως εβδομάδες της κύησης, οι πνεύμονες, ο ομφάλιος λώρος και το δέρμα του εμβρύου συμβάλλουν στην παραγωγή του αμνιακού υγρού. Την 8η εβδομάδα, η συνολική ποσότητα του αμνιακού υγρού είναι περίπου 8 mL. Την 11η εβδομάδα, η συνολική ποσότητα του αμνιακού υγρού είναι 25 mL και από την 11η μέχρι την 15η εβδομάδα, ο μέσος όρος της αύξησης του όγκου του αμνιακού υγρού είναι 25 mL κάθε εβδομάδα. Στη συνέχεια, ο μέσος όρος της εβδομαδιαίας αύξησης του αμνιακού υγρού είναι >45 mL την εβδομάδα. (Madar H., Brun S., Coatleven F., Chabanier P., Gomer H., Nithart A., Coustel M.A., Merlot B., Horovitz J., Dally D. Mahieu-Caputo† D, Sentilhes L. *Fisiología y regulación del Líquido Amniótico*. EMC-Ginecología-Obstetricia. 2016;52(4):1–10.

[https://doi.org/10.1016/S1283-081X\(16\)80903-0](https://doi.org/10.1016/S1283-081X(16)80903-0).)

Καθώς προχωρά η κύηση, γίνεται κερατινοποίηση των επιφανειακών στιβάδων του εμβρυϊκού δέρματος που γίνεται αδιάβροχο, οπότε χάνεται η «συνέχεια» μεταξύ του αμνιακού υγρού και του εξωκυττάριου υγρού του σώματος του εμβρύου. Η σύνθεση του αμνιακού υγρού στο δεύτερο μισό της κύησης φαίνεται να επηρεάζεται, κυρίως, από τα αποβαλλόμενα ούρα του εμβρύου (σε προχωρημένη κύηση μπορεί να υπερβαίνουν τα 500 mL την ημέρα). Ο όγκος του αμνιακού υγρού είναι μια σημαντική παράμετρος για την εκτίμηση της κατάστασης του εμβρύου (Nabhan & Abdelmoula 2008) και, κυρίως από το μέσο της κύησης και μετά, παρέχει ενδείξεις για τη νεφρική λειτουργία του εμβρύου. Προς το τέλος της κύησης, κυρίως, ο όγκος του αμνιακού υγρού βοηθά και στην εκτίμηση της λειτουργικής κατάστασης του πλακούντα.

Πράγματι, καθώς ο πλακούντας γηράσκει και ενώ ακόμα εξασφαλίζεται απρόσκοπτα η αιμάτωση των πιο ζωτικών οργάνων (εγκέφαλος, καρδιά), η αιματική παροχή προς τον νεφρό του εμβρύου μπορεί να ελαττωθεί με συνέπεια μικρότερη ποσότητα παραγόμενων ούρων και μικρότερη ποσότητα αμνιακού υγρού. Ο όγκος του αμνιακού υγρού στο μέσο της κύησης είναι κάτω από 500 mL, στις 38 εβδομάδες φθάνει περίπου στα 1.000 mL ενώ τις τελευταίες εβδομάδες παρουσιάζει συνεχή μείωση και (μετά την 40η εβδομάδα) μπορεί να φθάσει κάτω από 500 mL. Το pH του αμνιακού υγρού κυμαίνεται από 7,0 έως 7,5. Οι συγκεντρώσεις του νατρίου, του χλωρίου και του ασβεστίου στο αμνιακό υγρό είναι υψηλότερες στο πρώτο μισό της κύησης και

μειώνονται στη συνέχεια. Οι φυσιολογικές τιμές του φωσφόρου, σε σχετικά προχωρημένη κύηση, συνηγορούν για την απουσία του συνδρόμου της αναπνευστικής δυσχέρειας και, επομένως, την καλή ωριμότητα του εμβρύου. Η γλυκόζη από 50 mg/100 mL, που είναι στο πρώτο μισό της κύησης, υποδιπλασιάζεται προς το τέλος. Αυξημένα επίπεδα γλυκόζης στο μητρικό αίμα συνεπάγονται άνοδο της γλυκόζης και στο αμνιακό υγρό, κυρίως στο δεύτερο μισό της κύησης. Η παραγωγή της κορτιζόλης συνδέεται με πνευμονική ωρίμανση του εμβρύου και αύξηση της κορτιζόλης παρατηρείται στις τελευταίες εβδομάδες της εγκυμοσύνης. Οι τιμές της κορτιζόλης αρχίζουν από 30 ng/mL στις 20 εβδομάδες και στις 40 εβδομάδες μπορεί να ξεπεράσουν τα 130 ng/mL. Οι τιμές της χολερυθρίνης μειώνονται με την πρόοδο της κύησης και καταλήγουν σε πολύ χαμηλά επίπεδα προς το τέλος της. Ο έμμεσος προσδιορισμός της χολερυθρίνης στο αμνιακό υγρό σε Rh ευαισθητοποιημένες έγκυες απετέλεσε για δεκαετίες κλασική δοκιμασία για τον έλεγχο της κατάστασης του εμβρύου. Η ουρία, η κρεατινίνη και το ουρικό οξύ βρίσκονται στο αμνιακό υγρό σε συγκεντρώσεις ανώτερες από το πλάσμα της μητέρας, που δείχνει ότι απεκκρίνονται από το έμβρυο και φυσιολογικά αυξάνονται με την πρόοδο της κύησης. (Anderer M, A E Schindler A E, H M Liebich H M. Creatinine, urea and uric acid in amniotic fluid, maternal and umbilical cord blood at delivery. ArchGynakol 1975 Dec 16;220(1):65-72. doi: 10.1007/BF00673149.)

Η πολύ μεγάλη ποσότητα του αμνιακού υγρού για την ηλικία της κύησης ονομάζεται υδράμνιο (ή πολυάμνιο) και η πολύ μικρή ποσότητα αντίστοιχα ολιγάμνιο και παρατηρούνται συνήθως σε παθολογικές καταστάσεις της κύησης, όπως διαβήτης, IUGR κλπ (Ιατράκης 2009).

1.3. *Mycoplasmaspp* και *Ureaplasmaspp* (Μυκόπλασμα και Ουρεόπλασμα)

Τόσο τα μικρόβια του γένους *Mycoplasma*, όσο και αυτά του γένους *Ureaplasma* συμπεριλαμβάνονται στην οικογένεια των *Mycoplasma taceae* και στην κλάση των *Mollicutes*. Τα μυκοπλάσματα προήλθαν από προγονικά αναερόβια βακτήρια κατόπιν μιας εξελικτικής διαδικασίας εξάλειψης γονιδίων. Εντοπίζονται σε θηλαστικά, σε πτηνά και ψάρια, σε διάφορα άλλα σπονδυλωτά, σε φυτά και φυσικά στον άνθρωπο (Tully, etal, 1981, Yoshida, etal, 2002).

Οι συγκεκριμένοι μικροοργανισμοί αποτελούν τους μικρότερους και απλούστερους προκαρυωτικούς οργανισμούς, οι οποίοι διαθέτουν την ικανότητα αυτόνομου πολλαπλασιασμού. Το κύτταρό τους διαθέτει μονάχα τα απολύτως απαραίτητα οργανίδια για την περαιτέρω ανάπτυξη τους, αλλά και για την αντιγραφή. Ειδικότερα περιέχουν, ένα μόριο δίκλωνου δεοξυριβονουκλεϊκού οξέος DNA, το οποίο παρέχει τις πληροφορίες για την έκφραση των γονιδίων, ριβοσώματα αναγκαία για τη μετέπειτα πρωτεϊνοσύνθεση και μια μεμβράνη, η οποία διαχωρίζει το κυτταρόπλασμα από το εξωτερικό περιβάλλον (Razin, etal, 1978). Το μυκόπλασμα και το ουρεόπλασμα διαθέτουν δίκλωνο κυκλικό DNA, το κλασικό γονιδίωμα των προκαρυωτών (Maniloff, etal, 1972, Morowitz, etal, 1973), αν και εντοπίζονται διαφορές στο μέγεθος, μιας και περιέχει ιδιαίτερα χαμηλό ποσοστό γουανίνης και κυτοσίνης (G, C). Αυτοί οι μικροοργανισμοί, εν αντιθέσει με τους υπόλοιπους προκαρυώτες, **στερούνται κυτταρικού τοιχώματος**, αλλά περιβάλλονται από μία ελαστική κυτταροπλασματική μεμβράνη τριών στοιβάδων (Αρσένη Α., 1994). Χαρακτηρίζονται κατά βάση από **στερούνται κυτταρικού τοιχώματος**, Η δυνατότητα διατήρησης τόσο διαφορετικών σχημάτων, παρά την απουσία ενός άκαμπτου κυτταρικού τοιχώματος, οφείλεται στην παρουσία κυτταροσκελετού (Razin, etal, 1978).

Τα δεδομένα μικρόβια δεν αναπτύσσονται σε τυπικά θρεπτικά υλικά, αλλά σε ειδικά μέσα, εμπλουτισμένα με ορό αίματος και εκχύλισμα μυκήτων (Αρσένη Α., 1994).

Τα είδη *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma parvum* και *Ureaplasma urealyticum* συνδέονται με λοιμώξεις του ουροποιογεννητικού συστήματος (Jensen, et al, 1991, Deguchi, et al, 2002, Taylor-Robinson, et al, 1980, Tully, et al, 1983), ενώ αποικίζουν τους βλεννογόνους του γεννητικού συστήματος, το αιδοίο, τον κόλπο, τον τράχηλο, την ουρήθρα, το ορθό και τις γύρω περιοχές (Munday, et al, 1981).

Μελέτες παγκόσμιας κλίμακας διαπιστώνουν μια συνεχώς ενισχυόμενη επικράτηση των λοιμώξεων από μυκοπλάσματα και ουρεοπλάσματα την τελευταία δεκαετία (Taylor-Robinson, et al, 2012, Rivera, et al, 2001). Ο επιπολασμός τους διαφοροποιείται γεωγραφικά και πληθυσμιακά και κυμαίνεται σε ποσοστά από 3,9-31%, 21,4%, 44,8% έως και 54,9%. (Rivera, et al, 2004, Ramirez, et al, 2004, Fagundo, et al, 2006, Imudia, et al, 2008, Zuo, et al, 2006, Karabay, et al, 2006). Η μόλυνση συνδέεται με το φύλο, την ηλικία, τη σεξουαλική ζωή, το ορμονικό προφίλ και τις κρατούσες κοινωνικοοικονομικές συνθήκες κάθε χώρας (Αρσένη Α., 1994).

Στη χώρα μας τα στοιχεία αναφορικά με τον επιπολασμό των μυκοπλάσμάτων και ουρεοπλάσμάτων είναι περιορισμένα, ενώ προέρχονται κυρίως από μελέτες της τελευταίας δεκαετίας. Το *Ureaplasma* εντοπίστηκε σε ποσοστό 16,13%, σε ασυμπτωματικές γυναίκες και συγκεκριμένα το 96,4% αυτών έφερε το *Ureaplasma parvum* και το 3,6% το *Ureaplasma urealyticum* (Kotrotsiou, et al, 2013). Σε 369 γυναίκες με κολπίτιδα, 137 (37,1%) έφεραν, είτε το *Mycoplasma hominis*, είτε το *Ureaplasma urealyticum*, είτε και τα δύο. Ακόμη, παρατηρήθηκε συνδυαστική συνύπαρξη και με άλλα μικρόβια του γεννητικού συστήματος. Στις θετικές γυναίκες, το 47,44% διαπιστώθηκε θετικό για το *Ureaplasma urealyticum*, το 0,72% για το *Mycoplasma hominis*, το 2,92% και για τα δύο, ενώ στο 48,90% συνυπήρχαν και άλλοι μικροοργανισμοί (Kechagia, et al, 2008). **Σε γυναίκες με χρόνια ουρηθρικό σύνδρομο, το *Ureaplasma urealyticum* ανευρέθηκε σε ποσοστό 52,9% και το *Mycoplasma hominis* σε ποσοστό 3,3% (Baka, et al, 2009), ενώ σε άλλες 150 γυναίκες το *Mycoplasma genitalium* ανευρέθηκε σε ποσοστό 18% (Karanikolas, et al, 2009).**

1.4. *Mycoplasma genitalium* και *Mycoplasma hominis*

Ο μικροοργανισμός *Mycoplasma genitalium*, αν και καλύπτει τα γενικά χαρακτηριστικά του γένους, διαφέρει από τα υπόλοιπα μυκοπλάσματα σε ορισμένα μορφολογικά και μεταβολικά στοιχεία, αλλά και στη διαδικασία της καλλιέργειας. Χαρακτηρίζεται από φιαλοειδές σχήμα και διαθέτει ένα λεπτό ραβδοειδές οργανίδιο στο ένα άκρο του. Στον κυτταροσκελετό του εντοπίζεται μια πρωτεΐνη, η οποία προσομοιάζει την τουμπουλίνη (Wasinger, etal, 1995).

Το *Mycoplasma genitalium* κατέχει τουλάχιστον επτά πρωτεΐνες, εκ των οποίων δύο, η MgPa, γνωστή ως MG191 και η P110, γνωστή ως MG192, συμμετέχουν στην προσκόλλησή του στις επιφάνειες των δοχείων καλλιέργειάς και ακόμη δύο, οι MG218 και MG317, συνεργάζονται στοχεύοντας στην πρόσδεσή του στα ανθρώπινα και ζωικά κύτταρα (Musatonova, etal, 2003, Pich, etal, 2008). Η πρωτεΐνη MG191 εκτός από προσκολλητίνη, λειτουργεί παράλληλα και ως πρωτεϊνικό αντιγόνο (Morrison-Plummer, etal, 1987, Svenstrup, etal, 2002, Svenstrup, etal, 2006). Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη αποτελεί παράγοντα παθογονικότητας, καθώς η **πρωτεΐνη** MG191 εκτός από προσκολλητίνη, λειτουργεί παράλληλα και ως πρωτεϊνικό αντιγόνο (Morrison-Plummer, etal, 1987, Svenstrup, etal, 2002, Svenstrup, etal, 2006). Το *Mycoplasma genitalium* θεωρείται μεταξύ όλων των βακτηρίων, ο μικρότερος, από άποψη γονιδιώματος, μικροοργανισμός που δύναται να αναπτυχθεί σε δοκιμαστικό σωλήνα απουσία κυττάρου ξενιστή (Fraser, etal, 1995). Το γονιδιώμά του είναι μεγέθους 580 kb (Peterson, etal, 1993), με 32% ποσοστό γουανίνης-κυτοσίνης (Taylor-Robinson, etal, 2011). Μεταβολίζει τη γλυκόζη, ενώ δε μεταβολίζει την αργινίνη και την ουρία (Tully, etal, 1981, Tully, etal, 1983, Taylor-Robinson, etal, 1981).

Ο ρυθμός ανάπτυξης του μυκοπλάσματος είναι ιδιαίτερα αργός και κυμαίνεται περίπου από 30 έως 50 ημέρες. Φυσικά, δύναται να αυξηθεί κατόπιν επαναλαμβανόμενων ανακαλλιιεργειών. Η ανάπτυξη του συγκεκριμένου στελέχους στα συνήθη θρεπτικά υλικά καλλιέργειας των μυκοπλάσμάτων είναι αδύνατη, διότι παρουσιάζει ευαισθησία στο οξικό θάλλιο και μάλιστα σε συγκεντρώσεις πλήρως ανεκτές από τα υπόλοιπα μυκοπλάσματα.

Αναπτύσσεται σε κύτταρα Vero (Jensen, et al, 1996) και σε άγαρ SP4 (Tully, et al, 1981) αναερόβια, σε συνθήκες θερμοκρασίας 37°C και CO₂ 5% και σχηματίζει μικρές σχετικά αποικίες, βαθιά ριζωμένες στο καλλιεργητικό υλικό.

Το *Mycoplasma genitalium* είναι ευαίσθητο σε αρκετά αντιβιοτικά και ειδικότερα στις τετρακυκλίνες, στις μακρολίδες και στις φθοροκινολόνες (Taylor-Robinson, et al, 2011). Οι υψηλές συγκεντρώσεις αντιβιοτικών, όπως η πενικιλίνη G και η αμφοτερικίνη B, λειτουργούν ανασταλτικά στην ανάπτυξη των στελεχών *Mycoplasma genitalium* αγρίου τύπου. Ωστόσο, τα συγκεκριμένα αντιβιοτικά (η πενικιλίνη σε συγκέντρωση 200 IU/ml και η πολυμυκίνη σε συγκέντρωση 500 µg/ml) χρησιμοποιούνται ως εκλεκτικά μέσα σε καλλιέργειες κυττάρων Vero, ώστε να αποφευχθεί τυχόν βακτηριακή υπερανάπτυξη (Hamasuna, et al, 2007).

Το *Mycoplasma genitalium* προκαλεί ποικίλες λοιμώξεις στο ουρογεννητικό σύστημα, τόσο στους άνδρες όσο και στις γυναίκες, ενώ ενοχοποιείται για υπογονιμότητα και στα δύο φύλα (Clausen, et al, 2001, Svenstrup, et al, 2003, Svenstrup, et al, 2008). Αποτελεί το ενδέκατο κατά χρονολογική σειρά είδος μυκοπλάσματος που απομονώθηκε στον άνθρωπο (Tully, et al, 1983).

Στους άνδρες, σχετίζεται με τη μη γονοκοκκική ουρηθρίτιδα (NGU). Το *Mycoplasma genitalium* απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1981 σε καλλιέργειες δειγμάτων από την ουρήθρα δύο ανδρών, οι οποίοι έπασχαν από μη γονοκοκκική ουρηθρίτιδα (**Tully, et al, 1981**). Αν και προτάθηκε ως αίτιο της ασθένειας (Tully, et al, 1986), ο ακριβής του ρόλος στην πρόκληση της νόσου δεν εδραιώθηκε, λόγω της δυσκολίας απομόνωσής του από τα κλινικά δείγματα. Ωστόσο, η εφαρμογή των μοριακών τεχνικών διευκόλυνε την ανίχνευσή του (Jensen, et al, 1991, Palmer, et al, 1991), καταδεικνύοντας τη σύνδεση του μικροοργανισμού με τη συγκεκριμένη παθογένεια (Horner, et al, 1993, Jensen, et al, 1993, Maeda, et al, 1998, Totten, et al, 2001). Πλέον, έχει αποδειχθεί πως το *Mycoplasma genitalium* αφορά κυρίως τη συμπτωματική, παρά την ασυμπτωματική μη γονοκοκκική ουρηθρίτιδα (Horner, et al, 2002, Horner, et al, 2003), αναγνωρίζεται ως ανεξάρτητος αιτιολογικός παράγοντας της οξείας και της χρόνιας μη γονοκοκκικής ουρηθρίτιδας στους άνδρες, θεωρούμενο αποκλειστικά υπεύθυνο για το 20-35% αυτών των περιπτώσεων

(Arraiz, etal, 2008, Baczynska, etal, 2007), ενώ συνδέεται συχνά και με περιστατικά επιδιδυμίτιδας (Eickhoff, etal, 1999).

Στις γυναίκες, το *Mycoplasma genitalium* σχετίζεται εκτός από τη μη γονοκοκκική ουρηθρίτιδα (Falk, etal, 2005, Anagrius, etal, 2005) **και με την τραχηλίτιδα. Το 1997** απομονώθηκε από τον τράχηλο της μήτρας πέντε γυναικών, οι οποίες έπασχαν από τραχηλίτιδα. **Εντοπίσθηκε συνεπώς σε 5 από τις 57 γυναίκες με τραχηλίτιδα (9%) και σε καμιά από τις 79 γυναίκες χωρίς τραχηλίτιδα (Uno, etal, 1997).** Πλέον, το *Mycoplasma genitalium* αποτελεί το μοναδικό εκ των μυκοπλασμάτων που συνδέεται αιτιωδώς με τη φλεγμονή του τραχήλου (Lusk, etal, 2011), ενώ **σχετίζεται και με μία ακόμη φλεγμονή, αυτή της πυέλου (PID)**, η οποία όπως η πλειονότητα των νόσων του ουρογεννητικού συστήματος, δεν οφείλεται σε ένα και μοναδικό αίτιο (Hebb, etal, 2004). Το *Mycoplasma genitalium* αναφέρθηκε ως πιθανή αιτία της φλεγμονώδους νόσου της πυέλου το 1984 (**Moller, etal, 1984**). Έκτοτε, αρκετές μελέτες παγκόσμιας κλίμακας και ποικίλης γεωγραφικής κατανομής ενισχύουν τη θετική συσχέτιση ανάμεσα στο μικροοργανισμό και στην πυελική φλεγμονή (Uno, etal, 1997, Bjartling, etal, 2010, Cohen, etal, 2002, Haggerty, etal, 2008, Simms, etal, 2003).

Το πρώτο μυκόπλασμα που απομονώθηκε από τον άνθρωπο ήταν το ***Mycoplasma hominis*, το 1937 (Dienes, etal, 1937)**. Αποτελεί ένα ετερογενές μυκόπλασμα του γεννητικού συστήματος (Christiansen, etal, 1997), το οποίο χαρακτηρίζεται κοκκοβακτηριοειδές, κοκκιοειδές και νηματοειδές, αν και το μέγεθος και η μορφή του μεταβάλλονται συχνά και αυτόματα, λόγω του συσπαστικό-χαλαρωτικού μηχανισμού του (Αρσένη Α., 1994). **Διαθέτει μικρό σχετικά γονιδίωμα, της τάξης των 696 kb έως 825 kb (Ladefoged, etal, 1992).**

Στην επιφάνειά του εντοπίζονται τρία διακριτά, πλήρως και λεπτομερώς χαρακτηρισμένα, αντιγόνα. Δύο εξ αυτών, **τα Lmp1 και Lmp3 συνιστούν πρωτεΐνες της οικογένειας Lmp (135 kDa) (Ladefoged, etal, 1995, Ladefoged, etal, 1996)**. Το τρίτο αντιγόνο αποτελεί μία λιποπρωτεΐνη, την **P120**, η οποία συμβάλει ενεργά στην προσκόλληση του

μικροοργανισμού στα κύτταρα (Nyvold, etal, 1997, Zhang, etal, 1996). Με βάση τα πρωτεϊνικά αντιγόνα προέκυψαν 7 διαφορετικοί ορότυποι.

Μεταβολικά, το *Mycoplasma hominis* διασπά την αργινίνη, αλλά δε διασπά την ουρία και τη γλυκόζη. Ακόμη, δεν ανάγει το τετραζόλιο και το κυανού του μεθυλενίου. Είναι ευαίσθητο στη ζοσαμυκίνη (Pereyre, etal, 2002), αλλά παρουσιάζει ισχυρή αντοχή στην ερυθρομυκίνη (Bebear, etal, 2000) και στις κετολίδες. Αντιβιοτικά όπως οι φλουοροκινολόνες και ειδικότερα η τροβαφλοξακίνη, δρουν έναντι του δεδομένου μυκοπλάσματος, στοχεύοντας τα γονίδια των τοποϊσομερασών του (Bébéar, etal, 2000). Οι αποικίες του προσκολλούν κύτταρα HeLa και κύτταρα κυτταροκαλλιεργειών εμβρύου όρνιθας, αναπτύσσονται σε pH 5,5 έως 8,0 και σε χρόνο από 1 έως 5 ημέρες.

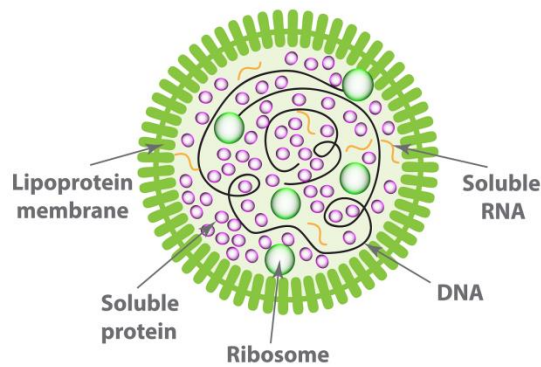
Ο επιπολασμός του κυμαίνεται από 0-45% και είναι υψηλότερος στις γυναίκες (Αρσένη Α., 1994). Το *Mycoplasma hominis* εντοπίζεται κατά βάση στο κατώτερο γεννητικό σύστημα, ενώ στο ανώτερο γεννητικό σύστημα απομονώνεται μονάχα επί συμπτωμάτων οξείας λοίμωξης, συνδυαστικά με την παρουσία συγκεκριμένης αντιγονικής απάντησης (Thomsen, etal, 1978).

Αν και η επίπτωση του μυκοπλάσματος στη γονιμότητα ως συνέπεια της σαλπινγίτιδας παραμένει αδιευκρίνιστη, εν τούτοις εξετάζεται η εμπλοκή του στην υπογονιμότητα, λόγω της **συχνότατης απομόνωσής του στις υπογόνιμες γυναίκες με πυελική φλεγμονή σε σύγκριση με τις φυσιολογικές (Miller, etal, 1985).**

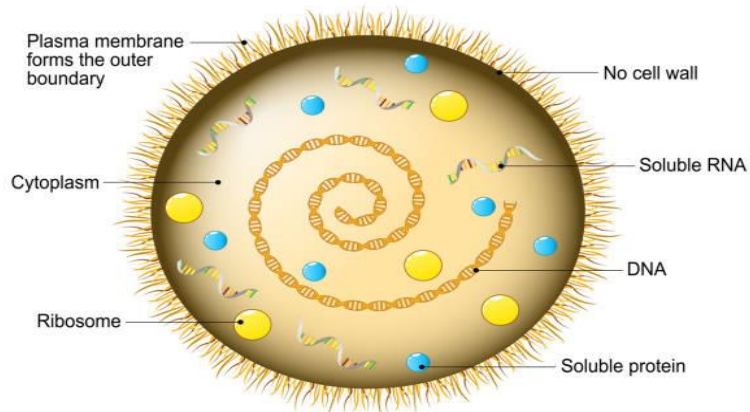
Το *Mycoplasma hominis* συναντάται στα 2/3 των γυναικών με βακτηριακή κολπίτιδα (Rosenstein, etal, 1996, Taylor-Robinson, et al, 1998), ενοχοποιούμενο για την εμφάνισή της, μιας και εντοπίζεται ιδιαίτερα συχνά στον κόλπο των γυναικών με μη φυσιολογικά κολπικά ευρήματα. Ακόμη, στις γυναίκες με κολπίτιδα ανευρίσκονται υψηλά ποσοστά IgG αντισωμάτων για το μικροοργανισμό (Rosenstein, etal, 1996). Η φλεγμονή της πυέλου, εκτός των άλλων παραγόντων, οφείλεται πιθανώς και στο *Mycoplasma hominis*, καθώς το παθογόνο **απομονώθηκε από το ενδομήτριο και τις σάλπιγγες στο 10% των γυναικών με σαλπινγίτιδα (Mardh, etal, 1970)**, εύρημα το οποίο συνοδευόταν από συγκεκριμένη αντιγονική απόκριση (Mardh, etal, 1970). Το μυκόπλασμα **ανευρίσκεται επίσης συχνά στο αίμα εμπύρετων γυναικών**

κατόπιν έκτρωσης ή φυσιολογικού τοκετού, ενώ σχετίζεται με ενδομητρίτιδα πνευμονία και αρθρίτιδα. Εντοπίζεται ακόμη στο αμνιακό υγρό, στο αίμα του ομφάλιου λώρου, αλλά και στο αίμα των νεογνών, συνδεδεμένο περιστασιακά με χοριοαμνιονίτιδα, αποβολή, ενδομήτριο θάνατο και πρόωρο τοκετό. Καθώς συνυπάρχει κατά βάση με το *Ureaplasma urealyticum*, η διάκριση μεταξύ των δύο αναφορικά με την ακριβή αιτία των προαναφερθεισών επιπλοκών είναι ιδιαίτερα απαιτητική (Φωκάς Σ, 2003).

Mycoplasma



MYCOPLASMA



Εικόνα 1: Η δομή των μυκοπλάσμάτων

1.5. *Ureaplasma parvum* και *Ureaplasma urealyticum*

Τα μικρόβια *Ureaplasma parvum* και *Ureaplasma urealyticum* συγκαταλέγονται στο γένος *Ureaplasma*, το οποίο περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1954 (Shepard, et al, 1954) και ταξινομήθηκε επισήμως στα μυκοπλάσματα το 1974 (Shepard, et al, 1974). Πρωτίστως, θεωρήθηκε πως οι δύο μικροοργανισμοί αποτελούσαν διαφορετικούς υπότυπους του *Ureaplasma urealyticum*. Ωστόσο, κατόπιν φυλογενετικής ανάλυσης προτάθηκε η ίδρυση ενός νέου είδους του *Ureaplasma parvum* (Kong, et al, 1999).

Τα δύο μικρόβια διαθέτουν τους γενικούς μορφολογικούς και καλλιεργητικούς χαρακτήρες των μυκοπλασμάτων. Χαρακτηρίζονται όμως από ένα ιδιαίτερο μεταβολικό δείκτη: το σύνολο των στελεχών τους υδρολύουν την ουρία (Shepard, et al, 1974), ενώ δε μεταβολίζουν την αργινίνη και τα σάκχαρα, παράγουν φωσφατάση και δεν ανάγουν το τετραζόλιο (Αρσένη Α, 1994). Στερούνται κυτταρικού τοιχώματος, όπως ακριβώς τα μυκοπλάσματα. Εντούτοις, περιβάλλονται από μία μεμβράνη γεμάτη ινιδοειδείς προσεκβολές. Αναπτύσσονται σε pH 6-6,5 σε 1 έως 4 ημέρες στα θρεπτικά υλικά των μυκοπλασμάτων, σχηματίζοντας μικρές αποικίες της τάξης των 15-25μm χωρίς απλωτή περιφέρεια (Αρσένη Α, Shepard, et al, 1974). Προσκολλώνται σε διάφορα κύτταρα, όπως στα ερυθροκύτταρα, στα επιθηλιακά κύτταρα της ουρήθρας και στα σπερματοζωάρια (Χiao, et al, 2010), με τη διαμεσολάβηση των πρωτεϊνών που εκφράζονται στην επιφάνεια του κυττάρου τους (Saada, et al, 1991, Smith, et al, 1994). Οι MBA (Multiple Banded Antigen) συνιστούν μια σημαντική οικογένεια πρωτεϊνών της επιφάνειας δρώντας, τόσο ως πρωτεϊνικά αντιγόνα, όσο και ως μέσα ανάπτυξης διαγνωστικών αντιδραστηρίων (Kong, et al, 2000, Teng, et al, 1994, Χiao, et al, 2010, Zheng, et al, 1995). Συμμετέχουν ακόμη στο διαχωρισμό των οροτύπων, οδηγώντας σε 4 ορότυπους για το *Ureaplasma parvum* (UPA1, UPA3, UPA6, UPA14) (Kong, et al, 1999, Kong, et al, 2000) και σε 10 ορότυπους για το *Ureaplasma urealyticum* (UUR2, UUR4, UUR5, UUR7-13) (Harasawa, et al, 1999, Kong, et al, 1999, Robertson, et al, 1982).

Ως προς τα αντιβιοτικά, τα ουρεοπλάσματα είναι ευαίσθητα στις κινολόνες (Kenny, etal, 2001) και στις μακρολίδες (Hannan, etal, 1998, Kenny, etal, 1993) και ανθεκτικά στις τετρακυκλίνες (Roberts, etal, 1986), στις κεφαλοσπορίνες και στην πενικιλίνη, μιας και δε διαθέτουν κυτταρικό τοίχωμα (Kenny, etal, 2001). Ειδικότερα, το *Ureaplasma urealyticum* είναι ευαίσθητο στην εβερνιμυκίνη, στην κουινοπριστίνη, στη δαλφοπριστίνη και στην τελιθρομυκίνη (Kenny, etal, 2001), ενώ το *Ureaplasma parvum* παρουσιάζει ανθεκτικότητα στις κινολόνες, στην αζυθρομυκίνη και στην ερυθρομυκίνη, λόγω μεταλλάξεων σε συγκεκριμένα γονίδια (Govender, etal, 2012).

Οι μικροοργανισμοί *Ureaplasma parvum* και *Ureaplasma urealyticum* απομονώνονται είτε μαζί, είτε ξεχωριστά από τα κλινικά δείγματα. Σχηματίζουν συμβιωτικές αποικίες στο ουρογεννητικό σύστημα υγιών ατόμων, εμπλέκονται όμως και σε λοιμώξεις.

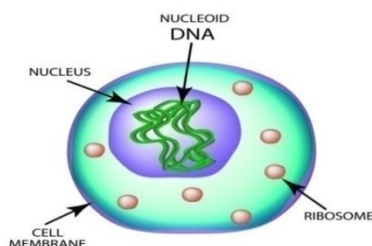
Στις γυναίκες, το *Ureaplasma urealyticum* προκαλεί κολπίτιδα, τραχηλίτιδα, ενδομητρίτιδα, σαλπινγγίτιδα, πνευλική φλεγμονώδη νόσο (PID), καθώς και περιγεννητικές επιπλοκές. Σε κάποιες περιπτώσεις συνυπάρχει με χλαμυδιακή λοίμωξη, ενώ σχετίζεται με το ουρηθρικό σύνδρομο, την πνευμονοφρίτιδα (Pickering 1990) και τη λιθίαση του ουροποιητικού (Grenabo, etal, 1988, Waites, etal, 2003). Στη χώρα μας, το *Ureaplasma urealyticum* ανιχνεύθηκε στο 47,44% των γυναικών με κολπίτιδα (Kechagia, etal, 2008) και στο 52,9% όσων διεγνώσθησαν με χρόνια ουρηθρικό σύνδρομο (Baka, etal, 2009).

Στους άνδρες, το *Ureaplasma urealyticum* συνδέεται με την προστατίτιδα, την επιδιδυμίτιδα αλλά και τη μη γονοκοκκική ουρηθρίτιδα (NGU) (McCormack and Rein, 2000). Συγκεκριμένα, ανευρίσκεται συχνότερα στους ασθενείς με μη γονοκοκκική ουρηθρίτιδα, απ' ότι σε όσους δεν πάσχουν από τη νόσο, γεγονός που υποδηλώνει τον ενδεχόμενο ρόλο του στην αιτιολογία της ασθένειας (Palmer, etal, 1991). Στους άνδρες, η φορεία του *Ureaplasma urealyticum* στην ουρήθρα κυμαίνεται μεταξύ 7,8-13,5% (Deguchi, etal, 2004), γεγονός που καθυστέρησε την παγίωση της άποψης περί συσχέτισής του με τη μη γονοκοκκική ουρηθρίτιδα

(Waites, et al, 2005). Το παθογόνο *Ureaplasma parvum* ανευρίσκεται στα ούρα ασυμπτωματικών ανδρών σε ποσοστό 23%, ενώ το *Ureaplasma urealyticum* σε ποσοστό 12%, αναλογικά και με τη σεξουαλική δραστηριότητα (Takahashi, et al, 2006), ενώ **ανιχνεύεται στο 28,2% των δειγμάτων σπέρματος σε αρκετά χαμηλές συγκεντρώσεις (Andrade-Rocha, et al, 2003).**

Ο λόγος για τον οποίο τα ουρεοπλάσματα άλλοτε λειτουργούν ως συμβιωτικοί μικροοργανισμοί και άλλοτε προκαλούν λοιμώξεις παραμένει άγνωστος. Ενδέχεται να σχετίζεται με τη λοιμογόνο δράση των μικροοργανισμών, με παράγοντες του γεννητικού συστήματος ή με το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή (Abele-Horn, et al, 1997, Breugelmans, et al, 2010, Foulon, et al, 1986, Lamont, et al, 1987, Naessens, et al, 1987, Yoon, et al, 1998). Αξίζει να εφαρμοσθούν εξειδικευμένες μεθοδολογίες προσδιορισμού κάθε στελέχους ξεχωριστά, ώστε να διευκρινισθεί τυχόν συσχέτιση συγκεκριμένων ειδών ή ορότυπων ουρεοπλασμάτων με συγκεκριμένες λοιμώξεις.

Αναφορικά με το ρόλο που διαδραματίζει το *Ureaplasma spp* στην υπογονιμότητα, δεν έχουν προκύψει έως τώρα σαφή και οριστικά συμπεράσματα, ενώ τα αποτελέσματα είναι ορισμένες φορές αντιφατικά. Εντούτοις, **στις υπογόνιμες γυναίκες το ουρεόπλσμα εντοπίζεται πιο συχνά, επηρεάζοντας αρνητικά την έκβαση των τεχνικών εξωσωματικής γονιμοποίησης (Fenkci, et al, 2002).** Στους υπογόνιμους άνδρες η φορεία του μικροοργανισμού στο γεννητικό σύστημα δε σχετίζεται ξεκάθαρα με διαταραχή της γονιμότητας, ενώ στη χώρα μας **οι ασυμπτωματικοί άνδρες δεν παρουσιάζουν παθολογικά ευρήματα στο σπέρμα, ακόμη και όντες θετικοί στο βακτήριο (Gregoriou, et al, 1989).**



Εικόνα 2: Η δομή των ουρεοπλασμάτων

1.6. Chlamydia trachomatis (Χλαμύδια)

Τα χλαμύδια του τραχώματος (*Chlamydia trachomatis*) είναι παθογόνοι μικροοργανισμοί, οι οποίοι προσβάλλουν αποκλειστικά τους ανθρώπους. Φυλογενετικά, ενδέχεται τα χλαμύδια να μοιράζονται ένα κοινό πρόγονο με τα κυανοβακτήρια, μια ομάδα η οποία περιέχει τον πρόγονο ενδοπαρασίτου στους χλωροπλάστες των φυτών. Έτσι, τα χλαμύδια **διαθέτουν χαρακτηριστικά κοινά με των φυτών από άποψη φυσιολογίας και γενετικής** (Bayramova, etal, 2018). Ειδικότερα, **το ένζυμο L,L-διαμινοπιμεταλική αμινοτρανσφεράση συνδέεται με την παραγωγή της λυσίνης στα φυτά, ενώ σχετίζεται παράλληλα και με την κατασκευή του κυτταρικού τοιχώματος στα χλαμύδια** (Liechti, etal, 2014). Στα χλαμύδια, στα κυανοβακτήρια και στα φυτά, η γενετική κωδικοποίηση των ενζύμων είναι εντυπωσιακά παρόμοια, υποδεικνύοντας μια στενά κοινή καταγωγή, ανακάλυψη η οποία μπορεί να συμβάλει στην ανάπτυξη αποτελεσματικών αντιβιοτικών και νέων οδών θεραπείας γενικότερα (Bayramova, etal, 2018).

Ο κύκλος ζωής των χλαμυδίων διακρίνεται σε δυο ξεχωριστές φάσεις: μια εξωκυτταρική φάση, κατά την οποία δεν πολλαπλασιάζονται και είναι μολυσματικά και μια υποχρεωτικά ενδοκυτταρική φάση, κατά την οποία πολλαπλασιάζονται και είναι μη μολυσματικά (Elwell, etal, 2016). Η μολυσματική μορφή προσκολλάται στην κυτταρική μεμβράνη και εισάγεται στο κύτταρο μέσω ενός φαγοσώματος (Todd, etal, 1985). Το στοιχειώδες σωματίο εισέρχεται στα κύτταρα και κατόπιν αναδιοργανώνεται σε δικτυωτά σωματίδια σχηματίζοντας έγκλειστα. Στη συνέχεια, τα δικτυωτά σωματίδια συμπυκνώνονται και σχηματίζουν τα νέα στοιχειώδη σωματίδια (Saikku, etal, 2003), τα οποία απελευθερώνονται, ξεκινώντας ένα νέο μολυσματικό κύκλο.

Τα χλαμύδια του τραχώματος υποδιαιρούνται σε 2 βιότυπους, το τράχωμα και το λεμφοκοκκίωμα και διαιρούνται σε 19 οροτύπους, ανάλογα με την ειδικότητα των επιτόπων της κύριας πρωτεΐνης της εξωτερικής μεμβράνης (MOMP). Θεωρούνται υπεύθυνα για ευρύ φάσμα ασθενειών. Συγκεκριμένα, οι ορότυποι A, B, Ba και C προκαλούν το

τράχωμα, την κύρια αιτία τύφλωσης λοιμώδους αιτιολογίας. Οι ορότυποι D, Da, E, F, G, Ga, H, I, Ia, J και K προσβάλλουν τα γεννητικά και ορθικά κυλινδρικά επιθηλιακά κύτταρα, προκαλώντας λοιμώξεις του ουρογεννητικού συστήματος. Μολύνουν ακόμη τα αναπνευστικά επιθηλιακά κύτταρα, οδηγώντας σε νεογνική πνευμονία.

Τα χλαμύδια συνιστούν την πλέον κοινή σεξουαλικά μεταδιδόμενη περίπτωση μικροβιακής αιτιολογίας (Carey, etal, 2010) Μεταδίδονται κατόπιν επαφής με τους βλενογόννους της ουρογεννητικής ή πρωκτικής οδού, μέσω του στοματοφάρυγγα, κατά τη σεξουαλική επαφή ή και κάθετα από τη μολυσμένη μητέρα στο νεογνό. Το 75% των γυναικών και το 50% των ανδρών είναι ασυμπτωματικοί (Nye, etal, 2019), ενώ επί συμπτωματολογίας, τα συμπτώματα εμφανίζονται μία έως τρεις εβδομάδες μετά την επαφή με το μικρόβιο.

Στις γυναίκες, τα χλαμύδια προσβάλλουν πρωτίστως τον τράχηλο της μήτρας (Haggerty, etal, 2010). Σε αυτό το στάδιο, πιθανόν να παρατηρηθούν ιδιαίτερες κολπικές εκκρίσεις ή αίσθημα ήπιου άλγους. Σε περίπτωση μεικτής λοίμωξης, στο τραχηλικό έκκριμα ενδέχεται να εντοπισθούν εκτός των χλαμυδίων, μύκητες, τριχομονάδες ή ο ιός του έρπητα. **Εάν η ασθενής δε λάβει θεραπεία,** τα χλαμύδια μολύνουν σταδιακά τη μήτρα και τις σάλπιγγες, προκαλώντας τελικά **φλεγμονώδη νόσο στην πύελο** (Manavi, etal, 2006). Η πυελική φλεγμονώδης νόσος δύναται να είναι ασυμπτωματική, αλλά και να συνοδεύεται από **κοιλιακό ή πυελικό πόνο, πυρετό, παθολογικές εκκρίσεις, πόνο στην ούρηση ή κατά τη σεξουαλική επαφή** (Sung, etal, 2017), ενώ ενδέχεται να οδηγήσει ακόμη και σε μόνιμη βλάβη της μήτρας, των σαλπίγγων και των ωοθηκών (Gottlieb, etal, 2013). **Θεραπευτικά, αντιμετωπίζεται με αντιβιοτικά,** αλλά σε σοβαρά περιστατικά απαιτείται έως και χειρουργική επέμβαση (Haggerty, etal, 2014).

Επιπτώσεις της παρουσίας των χλαμυδίων αποτελούν η έκτοπη κύηση (Bébéar, etal, 2009) και η αποβολή (Rahimkhani, etal, 2018), η φλεγμονή στα γεννητικά όργανα, η πρωκτίτιδα και η επιπεφυκίτιδα (Workowski, etal, 2006). **Ακόμη, αποτελούν κίνδυνο για την πρόκληση μη**

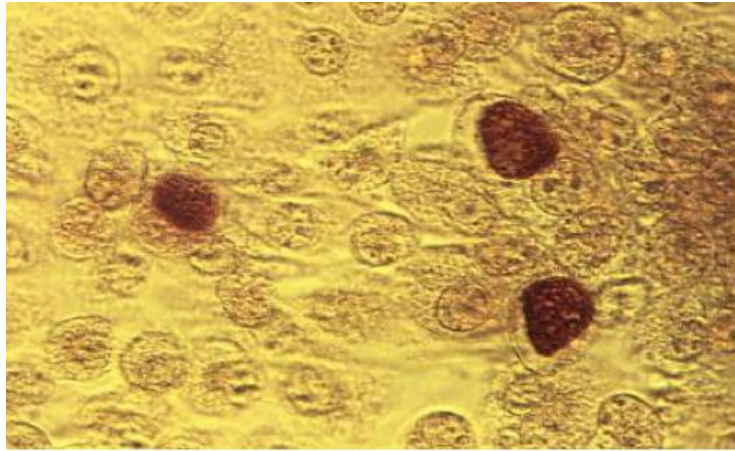
αναστρέψιμης υπογονιμότητας στις γυναίκες (Soper, etal, 2010) και πνευμονίας στο νεογέννητο (Mylonas, etal, 2012).

Επιπλέον, τα χλαμύδια ευθύνονται και στα δύο φύλα για το 30-50% των περιπτώσεων μη γονοκοκκικής ουρηθρίτιδας, ενός σεξουαλικά μεταδιδόμενου νοσήματος, το οποίο **συνυπάρχει συνήθως με παθογόνα όπως ο γονόκοκκος, οι τριχομονάδες, τα μυκοπλάσματα και οι ερπητοϊοί. Ο μικροοργανισμός αναπτύσσεται στα επιθηλιακά κύτταρα της ουρήθρας των ανδρών και μέσω αυτών προσβάλλει τα επιθηλιακά κύτταρα του τράχηλου της μήτρας των γυναικών (World Health Organ. 2012).**

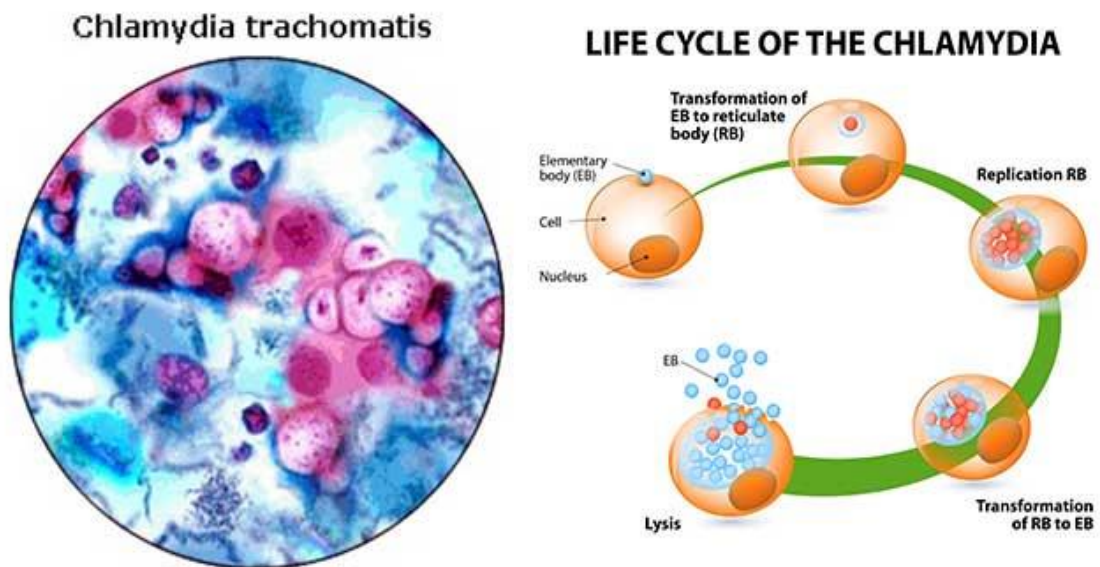
Στους άνδρες, τα ποσοστά ασυμπτωματικής λοίμωξης ποικίλλουν και κυμαίνονται από 40% έως 96%. Τα συμπτώματα των χλαμυδίων αφορούν εκκρίσεις από το πέος, αίσθημα καύσου κατά την ούρηση, δυσουρία, πόνο ή οίδημα στους όρχεις. Τα χλαμύδια τραχώματος συνιστούν για τους σεξουαλικά ενεργούς άνδρες, μία εκ των συχνότερων αιτιών επιδιδυμίτιδας, μαζί με το γονόκοκκο (Manavi, etal, 2006), ενώ αποτελούν επιπροσθέτως αίτιο της χρόνιας προστατίτιδας, αλλά και της γονόρροιας (Manavi, etal, 2006). Ακόμη, διερευνάται η επίπτωσή τους στην ποσότητα και την ποιότητα του σπέρματος, αλλά και γενικότερα στην ανδρική υπογονιμότητα και στην έκβαση των προσπαθειών υποβοηθούμενης αναπαραγωγής (Paavonen, etal, 2012).

Τα χλαμύδια τραχώματος αποτελούν το συχνότερα εμφανιζόμενο μικροβιακό σεξουαλικά μεταδιδόμενο νόσημα σε παγκόσμιο επίπεδο με εκατομμύρια νέα περιστατικά γεννητικών χλαμυδιακών λοιμώξεων κάθε χρόνο. Η συχνότητα της λοίμωξης στους νέους τοποθετείται στο 3%, ενώ ο κίνδυνος μόλυνσης των γυναικών είναι διπλάσιος από των ανδρών (Sexually Transmitted Diseases Surveillance, 2012). Καταγράφονται συνεχώς νέες περιπτώσεις, αν και οι αριθμοί ακόμη θεωρούνται υποεκτιμημένοι, με τον επιπολασμό στις ασυμπτωματικές γυναίκες να αγγίζει το 17% και στους άνδρες το 96%, εξαρτώμενος από την πληθυσμιακή και γεωγραφική κατανομή (Mylonas, etal, 2012). Στην Ελλάδα, από το 1998 έως το 2004 ένα ποσοστό 3,9% συμπτωματικών ασθενών νόσησε από Chlamydia

trachomatis, με επικράτηση στους άνδρες (11,2%) έναντι των γυναικών (3,5%) (Levidiotou, etal, 2005).



Εικόνα 3: Απεικόνιση των χλαμυδίων του τραχώματος.



Εικόνα 4: Η μορφολογία και ο κύκλος ζωής των χλαμυδίων του τραχώματος.

1.7. Εργαστηριακή Διάγνωση *Mycoplasma* και *Ureaplasma*

I) Καλλιέργεια

Η καλλιέργεια του κλινικού δείγματος συνιστά την κυριότερη εργαστηριακή πράξη για την ανίχνευση του αιτιολογικού παράγοντα της λοίμωξης και την εφαρμογή της κατάλληλης αντιμικροβιακής θεραπείας. Η καλλιέργεια στοχεύει στην απομόνωση και στην ταυτοποίηση του παθογόνου και η έκβασή της εξαρτάται από ένα σύνολο διαδικασιών, όπως ο τρόπος λήψης και μεταφοράς του δείγματος στο εργαστήριο, η καταλληλότητά του, η επιλογή των καλλιεργητικών θρεπτικών υλικών κοινής και ειδικής χρήσης, η εφαρμογή των απαραίτητων ποιοτικών ελέγχων και η τήρηση των βασικών κανόνων καλλιέργειας (Αρσένη Α., 1994).

Κατά την καλλιέργεια, πραγματοποιείται εμβολιασμός του κλινικού δείγματος στην επιφάνεια του θρεπτικού υλικού στο τρυβλίο για την απομόνωση των μικροοργανισμών. Η επώαση διενεργείται σε κλίβανο θερμοκρασίας 35-37C για 18-24 ώρες, ενώ σε περιπτώσεις μικροοργανισμών με βραδεία πορεία ανάπτυξης (π.χ. μυκοβακτηρίδια) η επώαση διαρκεί ημέρες ή εβδομάδες.

Η αλληλουχία των τεχνικών μεθόδων, οι οποίες οδηγούν στην ταυτοποίηση του αναπτυσσόμενου στα θρεπτικά υλικά πρωτοκαλλιέργειας παθογόνου μικροοργανισμού αφορά: τη μακροσκοπική εξέταση της μορφολογίας των αποικιών και των μεταβολών στο θρεπτικό υλικό για τον εντοπισμό της αποικίας του παθογόνου μικροοργανισμού, τη μικροσκοπική εξέταση της μορφολογίας του μικροοργανισμού και της συμπεριφοράς του στη χρώση Gram και την ανακαλλιέργεια της ύποπτης αποικίας στην επιφάνεια ενός μη εκλεκτικού και ενός εκλεκτικού θρεπτικού υλικού με αραίωση στο άγαρ, για τη λήψη μεμονωμένων αποικιών, οι οποίες θα χρησιμοποιηθούν στις ταυτοποιητικές δοκιμές, αλλά και για το διαχωρισμό των ζητούμενων αποικιών από τυχόν συνυπάρχοντες μικροοργανισμούς.

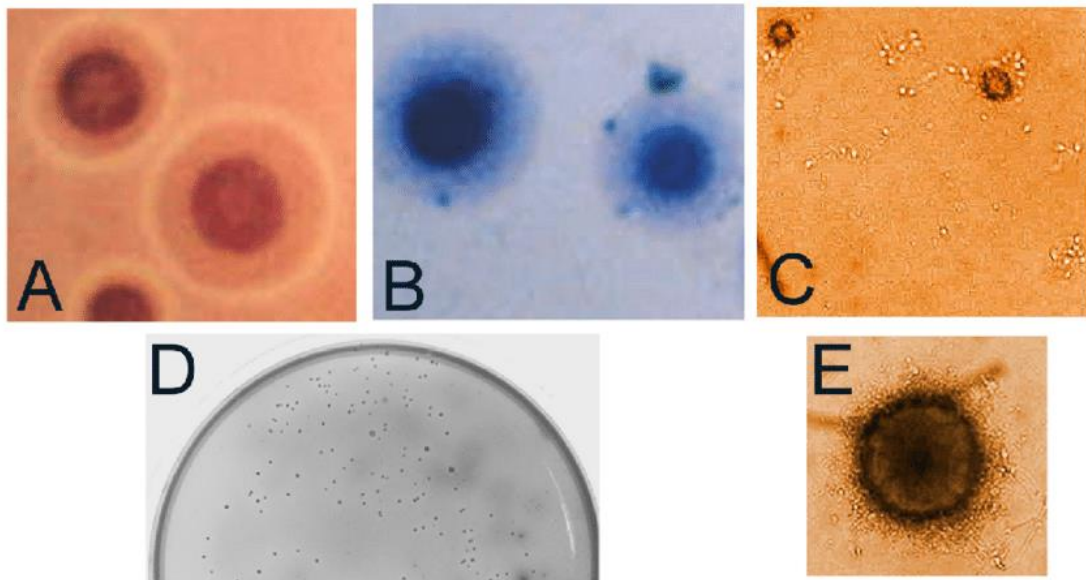
Δυστυχώς, εντοπίζονται παράγοντες που περιορίζουν την καθολική εφαρμογή της καλλιέργειας ή δυσχεραίνουν τη διάγνωση. Ειδικότερα, υφίστανται

μικροοργανισμοί οι οποίοι αναπτύσσονται αργά, ενώ απαιτείται άμεση διάγνωση καθώς εμπλέκονται σε σοβαρές ασθένειες, όπως το *Mycobacterium tuberculosis* που προκαλεί τη φυματίωση (Huard, etal, 2003) ή μικροοργανισμοί οι οποίοι δεν αναπτύσσονται στα κοινά υλικά και χαρακτηρίζονται από ιδιαίτερες θρεπτικές απαιτήσεις, όπως η *Kingella kingae* (Brachiow, etal, 2004). Ακόμη, η χορήγηση αντιμικροβιακής θεραπείας οδηγεί συχνά σε αδυναμία απομόνωσης του παθογόνου με καλλιέργεια, ενώ η διάγνωση ιογενών λοιμώξεων είναι αδύνατη.

Τα μικρόβια *Mycoplasma* και *Ureaplasma* αναπτύσσονται σε τεχνητά θρεπτικά υλικά, υγρά ή στερεά, έχοντας ιδιαίτερες διατροφικές απαιτήσεις, κυρίως σε λιπίδια, ώστε να συνθέσουν την κυτταροπλασματική τους μεμβράνη. Το άγαρ A7 συνιστά το κατεξοχήν στερεό θρεπτικό υλικό. Εμπεριέχει ζυμό σόγιας και τρυπτικάσης, ορό ίππου, υδροχλωρική L-κυστεΐνη, αστέρα θειικού μαγγανίου, εκχύλισμα μαγιάς, πενικιλίνη και ουρία σε pH 6 (Shepard, etal, 1976). Το δείγμα ενοφθαλμίζεται στο θρεπτικό υλικό και επωάζεται για 48 ώρες σε κλίβανο 36°C και 10% CO₂. Σε 2-4 ημέρες το καλλιέργημα ελέγχεται για αποικίες με οπτικό μικροσκόπιο. Οι αποικίες του μυκοπλάσματος είναι μικρές και άχρωμες, ενώ του ουρεοπλάσματος ποικίλων μεγεθών, στρογγυλές, κοκκώδεις και σκούρες, λόγω του διοξειδίου του μαγγανίου, το οποίο προκύπτει από την αντίδραση της αμμωνίας με τον εστέρα του θειικού μαγγανίου (Shepard, etal, 1974, Kotrotsiou, etal, 2010).



Εικόνα 5: Το άγαρ A7.



Εικόνα 6: Καλλιέργειες των μυκοπλασμάτων.

II) Ορολογικές δοκιμές

Οι ορολογικές δοκιμές στηρίζονται στις αντιδράσεις ανάμεσα στα αντιγόνα και στα αντισώματα. Εφαρμόζονται για την εκτίμηση του βαθμού ανοσίας του πληθυσμού κατόπιν λοίμωξης ή εμβολιασμού, αλλά και για διαγνωστικούς σκοπούς, ενώ εκτελούνται και σε περιπτώσεις αναζήτησης μικροβιακών αντιγόνων εφόσον είναι παρόντα τα αντισώματα. Βασική αρχή των ορολογικών τεχνικών αποτελεί η ένωση του αντιγόνου με το αντίσωμα και η οπτικοποίησή της, ενισχύοντας παράλληλα την ευαισθησία και την ειδικότητα της μεθόδου. Ως αντιγόνο μπορεί να λειτουργήσει ολόκληρο το κύτταρο, ουσίες του κυτταρικού τοιχώματος ή ουσίες που παράγονται και εκκρίνονται από το μικρόβιο, όπως τοξίνες και ένζυμα. Ως αντίσωμα λειτουργεί πάντοτε μια ανοσοσφαιρίνη (Αρσένη Α., 1994).

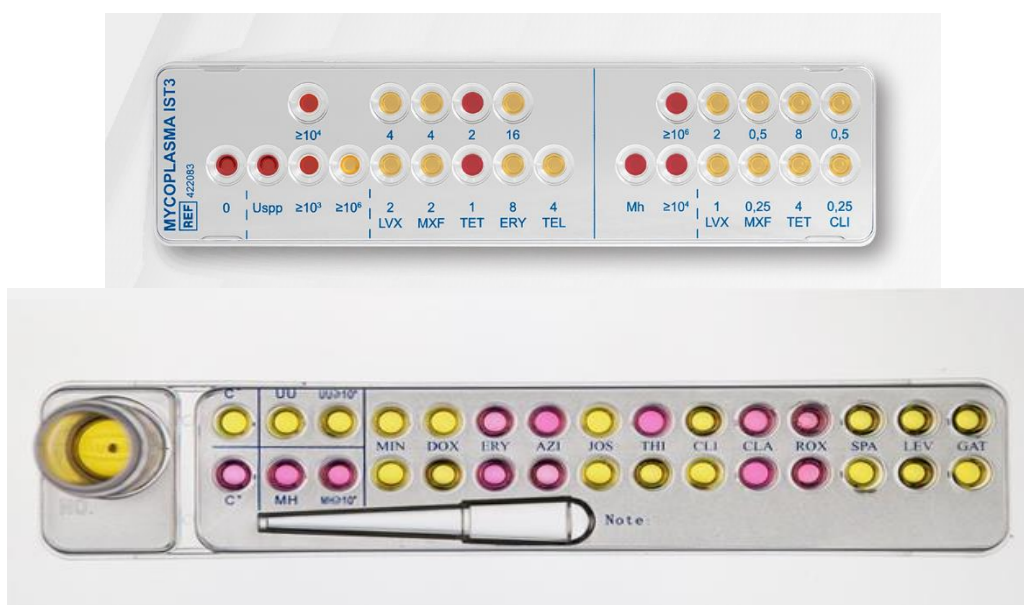
Στην περίπτωση του μυκοπλάσματος και του ουρεοπλάσματος ωστόσο, ο ορολογικός έλεγχος δε χαρακτηρίζεται από ιδιαίτερη διαγνωστική αξία, καθώς τα αντισώματα εντοπίζονται και σε μη νοσούντες φορείς (Αρσένη Α., 1994).

III) Εμπορικές δοκιμές

Στο εμπόριο κυκλοφορούν τυποποιημένες τεχνικές ανίχνευσης του μυκοπλάσματος και του ουρεοπλάσματος, επαναλήψιμες, απλές και πρακτικές. Διαθέτουν κυπέλια, τα οποία περιέχουν εκλεκτικό καλλιεργητικό ζωμό όπου αναπτύσσονται οι μικροοργανισμοί όταν βρίσκονται σε υψηλή συγκέντρωση. Τα αντιμικροβιακά φάρμακα χαρακτηρίζουν το υπό μελέτη στέλεχος ως ευαίσθητο, μετρίως ευαίσθητο ή ανθεκτικό. Συναντώνται σε λυοφιλοποιημένη μορφή, καθένα εξ' αυτών σε δύο συγκεντρώσεις, διαθέτοντας όρια ευαισθησίας αντίστοιχα με των κοινών μικροοργανισμών. Τα αποτελέσματα των συγκεκριμένων τεχνικών είναι συγκρίσιμα με αυτά των πρότυπων μεθόδων προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης του αντιβιοτικού. Οι εμπορικές συσκευασίες πλεονεκτούν, μιας και παρέχουν τη δυνατότητα ελέγχου μεμονωμένων στελεχών, εφαρμοζόμενες στην καθημερινή κλινική πράξη. Ακόμη, οι αναλογίες των υποστρωμάτων των κυπελίων και οι συγκεντρώσεις των φαρμάκων είναι

προκαθορισμένες και έτοιμες για χρήση. Έτσι, η ικανότητα του χειριστή παρεμβάλλεται ελάχιστα στο αποτέλεσμα, σε σύγκριση με τις μεθόδους αναφοράς, οι οποίες απαιτούν ιδιαίτερα καταρτισμένο εργαστηριακό προσωπικό.

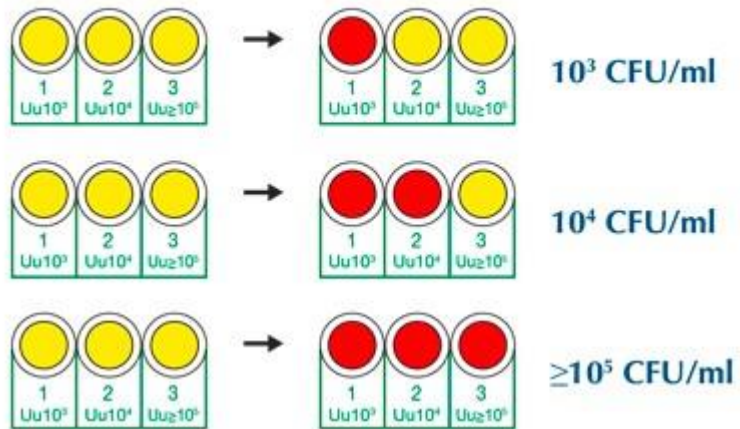
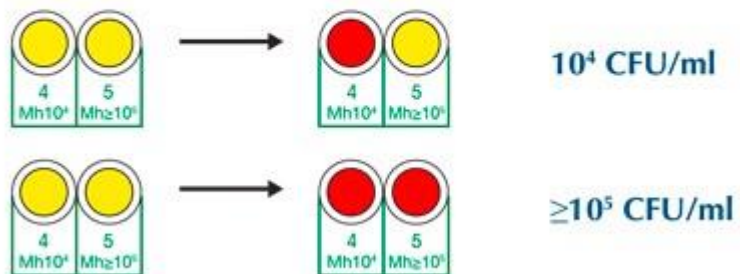
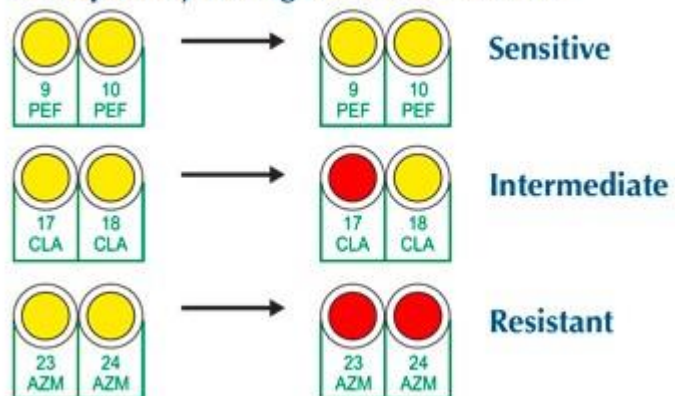
Για την ανίχνευση του Mycoplasma και του Ureaplasma διατίθενται ποικίλες εμπορικές δοκιμές (Mycoplasma GU Screen (Bioplus), Mycoplasma IES (AutobioDiagnostics), (Mycoplasma IST 2 (Biomerieux), μέσω των οποίων επιτυγχάνεται, τόσο η ταυτοποίηση και η ποσοτικοποίηση των μικροοργανισμών, όσο και η εξέταση της ευαισθησίας τους στα αντιβιοτικά.



Εικόνα 7α: Εμπορικές δοκιμές των μυκοπλασμάτων



Εικόνα 7β: Εμπορικές δοκιμασίες εντοπισμού μυκοπλάσματος και ουρεοπλάσματος.

Ureaplasma spp.***Mycoplasma hominis*****Susceptibility Testing (double concentration)**

Εικόνα 8: Εργαστηριακή διερεύνηση των μικροβίων *Ureaplasmaspp* και *Mycoplasma hominis*.

1.8. Εργαστηριακή Διάγνωση Chlamydia

Για τη διάγνωση των χλαμυδίων χρησιμοποιήθηκε αρχικά η χρώση Giemsa, η οποία πέτυχε την πρώτη περιγραφή των τυπικών χλαμυδιακών εγκλείστων (Halberstaedter, etal, 1907), χαρακτηριζόμενη ωστόσο από ιδιαίτερα χαμηλή ευαισθησία (Land J.A., etal, 2010). Τα έγκλειστα σωμάτια οπτικοποιούνταν περίπου 48-72 ώρες μετά την επώαση και τη χρώση με ειδικά μονοκλωνικά αντισώματα έναντι της MOMP, σημασμένα με φλουοροσκεΐνη. Η ευαισθησία της μεθόδου εξαρτάται από την ποιότητα των κλινικών δειγμάτων, αλλά και από τη διατήρηση του μικροοργανισμού σε ζωντανή μορφή κατά τη μεταφορά τους στο εργαστήριο. Η εφαρμογή της μεθόδου στην κλινική πράξη ήταν περιορισμένη εξαιτίας του κόστους του απαιτούμενου εξοπλισμού, μα και λόγω της καθυστερημένης λήψης των αποτελεσμάτων (3-7 ημέρες) (Black, etal, 1997). Η δεδομένη τεχνική χαρακτηρίστηκε χρονοβόρα, ακριβή και μειωμένης ευαισθησίας (70-85%), συγκρινόμενη με τις μοριακές μεθόδους πολλαπλασιασμού του DNA (Black, etal, 1997).

Αργότερα, τα χλαμύδια απομονώνονταν μέσω της καλλιέργειάς τους σε έμβρυα όρνιθας πρωτίστως (Tang, etal, 1957) και σε κυτταροκαλλιέργειες κυτταρικών σειρών McCoy, HeLa, BGMK, και HEp-2 στη συνέχεια. Η κυτταροκαλλιέργεια αποτέλεσε τη μέθοδο αναφοράς για την ανίχνευση των χλαμυδίων, κατέστησε δυνατή την καλλιέργειά τους σε ευρεία κλίμακα και προώθησε τη μελέτη της βιολογίας τους. Η χρήση της στην κλινική πράξη περιορίστηκε λόγω της μειωμένης ευαισθησίας (Lefebvre, etal, 1998), της κοπιώδους και εντατικής εργαστηριακής εργασίας, της χρονοβόρου διαδικασίας έκδοσης των αποτελεσμάτων (2-3 ημέρες), αλλά και της εισαγωγής των μοριακών μεθόδων πολλαπλασιασμού των νουκλεϊνικών οξέων (Land, etal, 2010).

Η ανάπτυξη των μονοκλωνικών αντισωμάτων κατέστησε δυνατή την ανίχνευση των χλαμυδίων άμεσα και γρήγορα στα κλινικά δείγματα. Ο ανοσοφθορισμός βασίζεται στην κύρια πρωτεΐνη της εξωτερικής μεμβράνης,

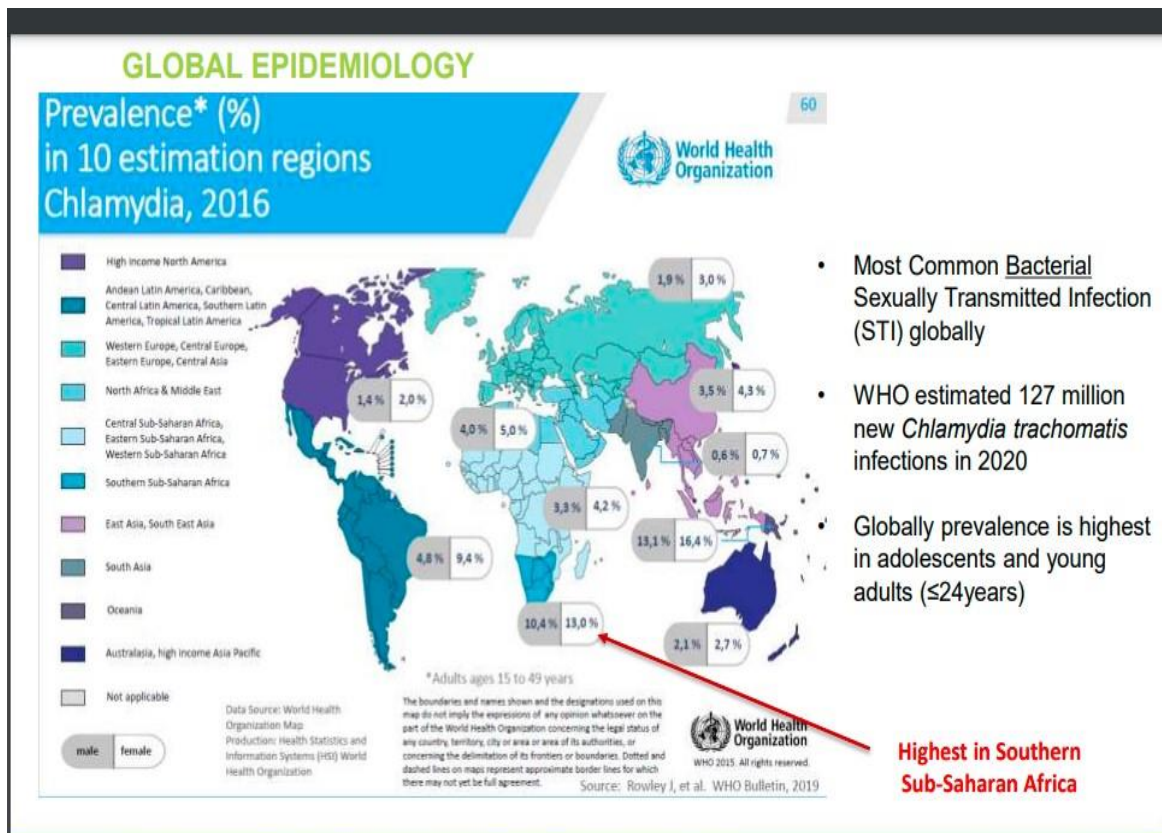
ειδικής για τα χλαμύδια, επιτυγχάνοντας την ανίχνευση μονάχα των χλαμυδίων του τραχώματος, μέσω της ομοιόμορφης κατανομής στο χλαμυδιακό σωματίο. Διαθέτει ευαισθησία 80-85% και ειδικότητα 98-99%, ενώ δεν εφαρμόζεται σε περιπτώσεις πολλαπλών δειγμάτων (Chernesky, etal, 1986).

Η τεχνική του ανοσοφθορισμού επιτρέπει τη χρήση ανιχνευτών DNA, ενζύμων, άμεσων φθορίζοντων αντισωμάτων και αντιγόνων, με στόχο την άμεση ανίχνευση των χλαμυδίων σε κάθε κλινικό δείγμα. Παρόλα αυτά, η ευαισθησία και η ειδικότητα των δεδομένων αναλύσεων θεωρούνται υποδεέστερες εκείνων της καλλιέργειας (Barnes, etal, 1989, Gratton, etal, 1990).

Στην ανοσοενζυμική μέθοδο επιλέγεται το αντιγόνο του λιποπολυσακχαρίτη των χλαμυδίων. Θεωρείται ποσοτικά επαρκέστερο και πιο υδατοδιαλυτό σε σύγκριση με τη MOMP, αν και συχνά προκαλεί διασταυρούμενες αντιδράσεις με το λιποπολυσακχαρίτη άλλων Gram αρνητικών βακτηρίων (Black, etal, 1997). Η δεδομένη τεχνική υπολείπεται επίσης των μοριακών μεθόδων πολλαπλασιασμού των νουκλεϊκών οξέων, τόσο σε ευαισθησία, όσο και σε ειδικότητα (Land, etal, 2010).

Οι ορολογικές μέθοδοι αποτελούν χρήσιμο εργαλείο, ιδίως σε περιπτώσεις επιδημιολογικών μελετών. Μειονεκτούν ωστόσο σε σχέση με άλλες εξαιτίας των προκαλούμενων διασταυρούμενων αντιδράσεων, αλλά και λόγω της παραμονής των αντισωμάτων, γεγονός το οποίο καθιστά δυσχερή τη διάκριση ανάμεσα στην πρόσφατη και στην παρελθούσα λοίμωξη (Bébéar, etal, 2009).

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) αποτελεί μεθοδολογία ειδικής ενίσχυσης ποσοτήτων DNA, οδηγώντας τες σε ανιχνεύσιμα επίπεδα. Τα μίγματα αντίδρασης περιέχουν μια θερμοσταθερή DNA πολυμεράση και ολιγονουκλεοτίδια, τα οποία λειτουργούν ως εκκινήτες, πλαισιώνοντας την αλληλουχία στόχο. Υποβάλλονται σε επαναλαμβανόμενους θερμοκρασιακούς κύκλους και έτσι η ποσότητα της αλληλουχίας του DNA στόχου διπλασιάζεται μετά από κάθε κύκλο.



Εικόνα 9: Ο επιπολασμός των χλαμυδίων του τραχώματος στον κόσμο.
WorldHealthOrganization 2016

1.9. Μοριακές Δοκιμές

I) Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης αποτελεί την ευρύτερα διαδεδομένη δοκιμή ενίσχυσης νουκλεϊκών οξέων Περιγράφηκε από τον Kary Banks Mullis το 1983 (Mullis, etal, 1987, Saiki, etal, 1985). Χρησιμοποιεί τους εκκινητές, δύο σχεδιασμένες ολιγονουκλεοτιδικές αλληλουχίες, συμπληρωματικές με περιοχές DNA του οργανισμού στόχου. Εφαρμόζονται υψηλές θερμοκρασίες, μέσω των οποίων αποδιατάσσεται η διπλή έλικα του DNA στις συγκεκριμένες περιοχές, καθιστώντας τες προσβάσιμες στους εκκινητές, οι οποίοι προσδένονται στα άκρα της αλληλουχίας-στόχου, οριοθετώντας το τμήμα του DNA που πρόκειται να πολλαπλασιασθεί. Τελικά, η θερμοσταθερή DNA πολυμεράση Taq αντιγράφει τους δύο κλώνους. Τα τρία προαναφερθέντα βήματα αποτελούν έναν κύκλο PCR, στο τέλος του οποίου ο αριθμός των μορίων DNA που φέρουν την αλληλουχία-στόχο έχει διπλασιασθεί. Κατόπιν, η διαδικασία επαναλαμβάνεται και ο αριθμός των μορίων DNA πολλαπλασιάζεται. Η σύνθεση του νέου DNA εκτελείται με κατεύθυνση 5'- 3', ενώ το μέγεθος του προϊόντος ποικίλλει. Στο τέλος του πρώτου κύκλου ολοκληρώνεται η σύνθεση τεσσάρων αλυσίδων του DNA, οι οποίες θα αποτελέσουν τα πρότυπα για τη σύνθεση των νέων αλυσίδων στον δεύτερο κύκλο. Συνήθως η διαδικασία πραγματοποιείται για αρκετούς κύκλους, παράγοντας εκατομμύρια αντίγραφα της αλληλουχίας-στόχου (Black, etal, 1997).

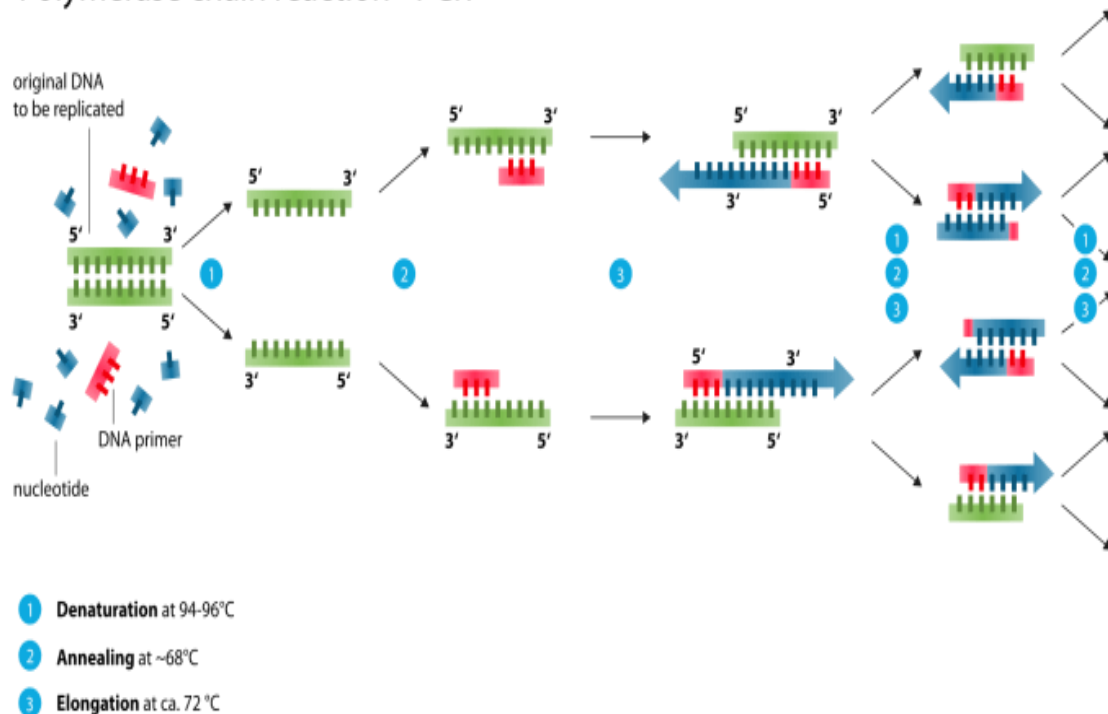
Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης συνιστά την πλέον εφαρμοζόμενη μοριακή διαδικασία ανίχνευσης των λοιμώξεων από τα παθογόνα Mycoplasma, Ureaplasma και Chlamydia. Χρησιμοποιείται σε ευρεία κλίμακα, τόσο στη μοριακή επιδημιολογία όσο και για διαγνωστικούς σκοπούς. Η in vitro τεχνική επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό συγκεκριμένων τμημάτων DNA με τη χρήση δύο συνθετικών ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών, μικρών

μονόκλωνων μορίων DNA, συμπληρωματικών ως προς τις πλευρικές αλληλουχίες του DNA-στόχου.

Η αντίδραση αποτελείται από πολλαπλές κυκλικές επαναλήψεις και περιλαμβάνει συνοπτικά τρία στάδια, την αποδιάταξη και το διαχωρισμό της διπλής αλυσίδας του DNA σε υψηλή θερμοκρασία, τη σύνδεση των ολιγονουκλεοτιδίων με τις συμπληρωματικές περιοχές του DNA-στόχου σε χαμηλότερη θερμοκρασία, την επιμήκυνση των 3' άκρων των ολιγονουκλεοτιδίων από τη θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση Taq και τη σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας (72°C).

Η τεχνική της PCR πλεονεκτεί έναντι των κλασικών μεθόδων, καθώς δεν είναι απαραίτητο οι μικροοργανισμοί να είναι ζωντανοί για να ανιχνευθούν. Ακόμη, διακρίνεται από ιδιαίτερη ευαισθησία, ενώ είναι γρήγορη με τα αποτελέσματά της άμεσα διαθέσιμα (Waites, etal, 2005).

Polymerase chain reaction - PCR

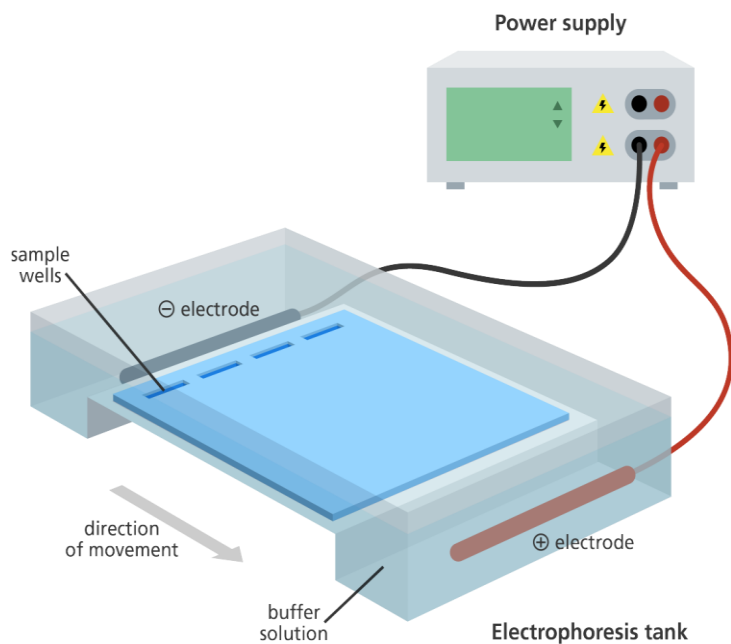


Εικόνα 10: Τα στάδια της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης.

II) Ηλεκτροφόρηση σε πήκτη αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης συνιστά τη χρησιμοποιούμενη μέθοδο αναγνώρισης των θραυσμάτων του DNA. Η συγκεκριμένη απλή και γρήγορη τεχνική καθιστά εφικτό τον αποτελεσματικό διαχωρισμό των μιγμάτων και θραυσμάτων DNA, τα οποία δε δύνανται να διαχωρισθούν με άλλες τεχνικές.

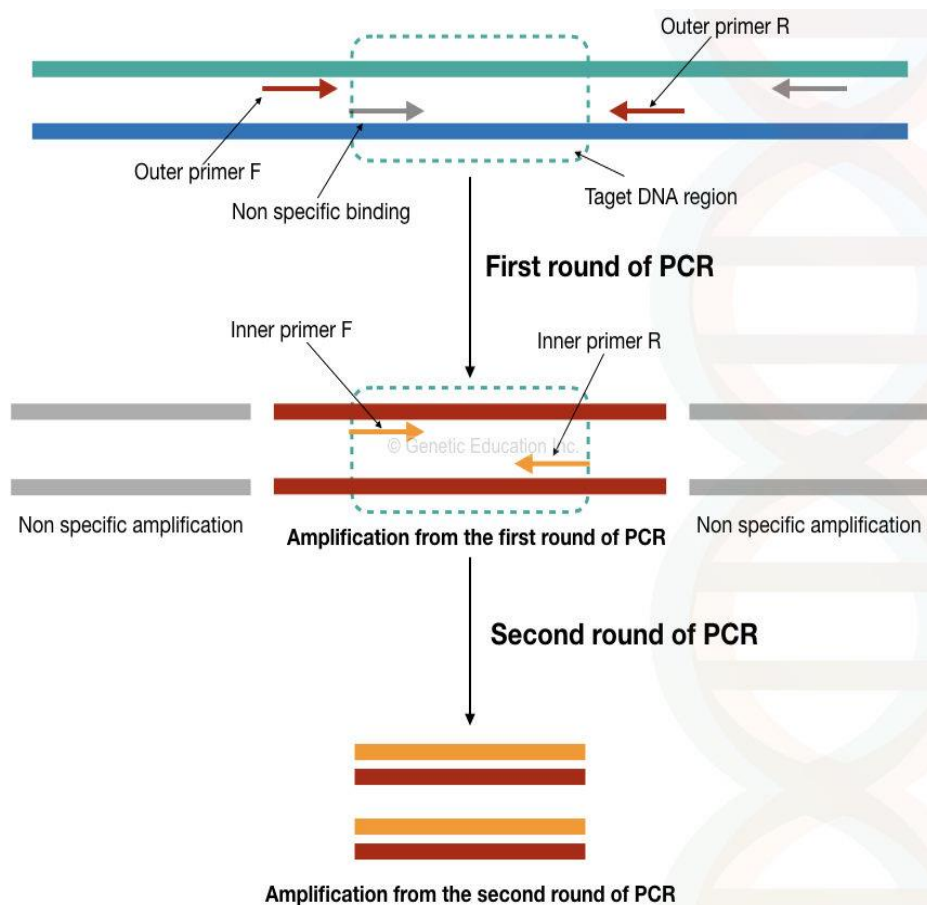
Κατά την ηλεκτροφόρηση, τα θραύσματα του DNA αναγκάζονται να κινηθούν υπό την επίδραση του ηλεκτρικού πεδίου μέσω των σχηματιζόμενων πόρων στο πήκτωμα αγαρόζης. Η ηλεκτροφορητική ικανότητα του DNA στο πήκτωμα εξαρτάται κυρίως από τη συγκέντρωση της αγαρόζης, την ένταση του ηλεκτρικού ρεύματος, το μέγεθος και τη στερεοδιάταξη του DNA. Η θέση του DNA στο πήκτωμα προσδιορίζεται μέσω υπεριώδους φωτός και χρησιμοποιώντας μία ποσότητα βρωμιούχου αιθιδίου, της φθορίζουσας χρωστικής, η οποία παρεμβάλλεται ανάμεσα στις αζωτούχες βάσεις του DNA.



Εικόνα 11: Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτη αγαρόζης.

III) Nested PCR

Η ιδιαίτερα υψηλή ευαισθησία αποτελεί το κύριο χαρακτηριστικό της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης. Ωστόσο, είναι εφικτό να αυξηθεί περαιτέρω μέσω της **nested PCR**. Το πρωτόκολλο της δεδομένης παραλλαγής της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης περιλαμβάνει δύο ζεύγη εκκινητών, με το πρώτο ζεύγος ενισχύεται η αλληλουχία-στόχος, ενώ το δεύτερο ζεύγος στοχεύει σε μία εσωτερική αλληλουχία του στόχου, λειτουργώντας μονάχα στα ενισχυμένα τμήματα όπου η αλληλουχία είναι απολύτως ακριβής. Έτσι, η ακρίβεια της αρχικής PCR ενισχύεται. Πλεονεκτήματα της nested PCR αποτελούν η ευαισθησία και η ειδικότητα, ενώ μειονέκτημα ο κίνδυνος επιμόλυνσης λόγω των πρόσθετων εργαστηριακών χειρισμών.



Εικόνα 12: Η διαδικασία της nested PCR.

IV) Real Time PCR

Η PCR πραγματικού χρόνου συνιστά μία ποσοτική PCR, καθιστώντας δυνατό τον υπολογισμό του αριθμού των αντιγράφων που παράγονται κατά την αντίδραση. Βασίζεται στην ανίχνευση και στην ποσοτικοποίηση του εκπεμπόμενου από ειδικά φθοριοχρώματα φθορισμού, απαιτεί επομένως εκτός του ζεύγους των εκκινητών και ένα φθορίζοντα δείκτη, ένα ολιγονουκλεοτίδιο, το οποίο συμβάλλει στην οπτικοποίηση του αριθμού των PCR προϊόντων.

Τυπικά, η αντίδραση διακρίνεται σε τέσσερις χαρακτηριστικές φάσεις: η δεύτερη περιλαμβάνει την εκθετική και η τρίτη τη γραμμική ενίσχυση του φθορισμού, ενώ η τέταρτη χαρακτηρίζεται από την εξασθένηση του ρυθμού της εκθετικής συσσώρευσης προϊόντος (Kainz, etal, 2000). Μονάχα κατά τη διάρκεια της εκθετικής φάσης ενίσχυσης, η ποσότητα του παραγόμενου προϊόντος είναι ανάλογη με την αρχική ποσότητα του στόχου στην αντίδραση (Pfaffl, etal, 2002).

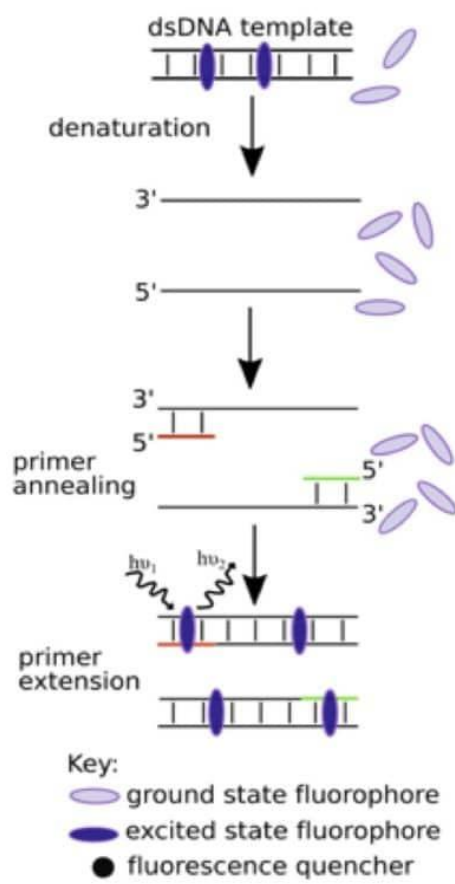
Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου πλεονεκτεί έναντι της απλής ή και άλλων μοριακών τεχνικών λόγω α) της ιδιαίτερα υψηλής ευαισθησίας, στην οποία οφείλεται η ανίχνευση αντιγράφων νουκλεϊκών αλληλουχιών λιγότερων από πέντε, β) του σύντομου απαιτούμενου για την αντίδραση χρόνου, γ) της ταυτόχρονης ανάλυσης του αποτελέσματος, δ) της δυνατότητας ποσοτικοποίησης, ε) της υψηλής ακρίβειας, στ) της επαναληψιμότητας, εξαιτίας του αυτοματισμού της αντίδρασης, ζ) της ελαχιστοποίησης ή και αποφυγής επιμολύνσεων, λόγω της εκτέλεσης της αντίδρασης σε κλειστό σύστημα υψηλής τεχνολογίας με περιορισμένους απαιτούμενους χειρισμούς για την ανάλυση του προϊόντος. Χρησιμοποιείται επομένως κατά κόρον στην ανίχνευση και στην τυποποίηση πλήθους παθογόνων μικροβίων (Espy, etal, 2006).

Η ποσοτική PCR συνιστά σημαντικό ερευνητικό εργαλείο, συνδυάζοντας τον πολλαπλασιασμό των τμημάτων νουκλεϊνικών οξέων, με την παράλληλη παρακολούθηση της αντίδρασης σε πραγματικό χρόνο και την ποσοτικοποίηση των παραγόμενων προϊόντων κατά απόλυτες και σχετικές

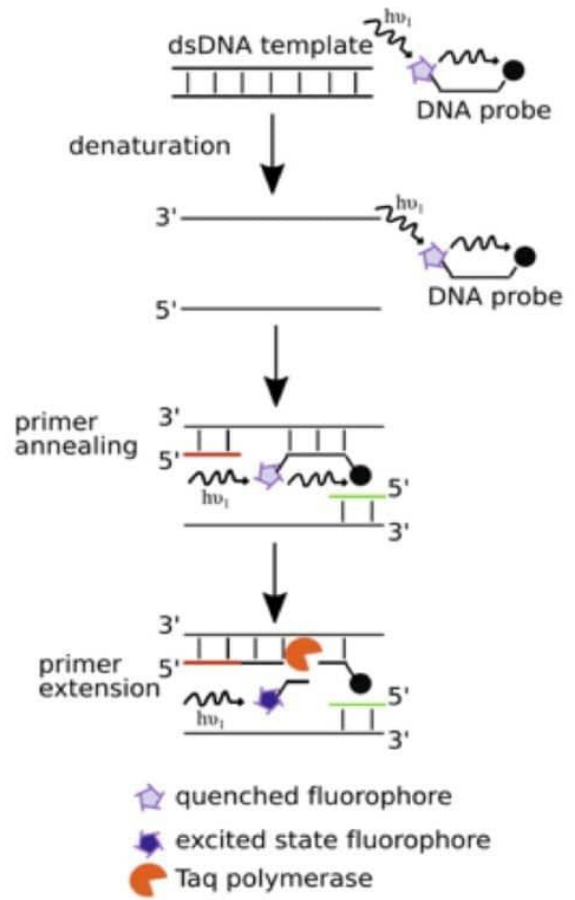
τιμές (Pfaffl, et al, 2004). Η ταχύτητα απόδοσης του αποτελέσματος είναι αξιοσημείωτη, καθώς αποφεύγονται τυχόν τεχνικές που απαιτούνται για την ανίχνευσή των προϊόντων, όπως η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, η υβριδοποίηση και ο ανοσοεντοπισμός (Mackay, et al, 2004), ενώ συγχρόνως περιορίζεται ο κίνδυνος επιμολύνσεων και ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων από τους χειρισμούς των τεχνικών αυτών.

Στη Real Time PCR η ανίχνευση και η παρακολούθηση των προϊόντων επιτυγχάνεται με τη χρήση σημασμένων μορίων εκκινήτων (ειδική σήμανση) ή φθορίζόντων μορίων που δεσμεύονται στην επιθυμητή αλληλουχία (μη ειδική σήμανση). Τα μόρια-σημαντές παράγουν φθορίζον σήμα, η ποσότητα του οποίου είναι ανάλογη με την ποσότητα του προϊόντος που ενισχύεται με την αντίδραση. Υπάρχουν αρκετές μέθοδοι για τη σήμανση και την ανίχνευση των προϊόντων της Real Time PCR, οι σημαντικότερες από τις οποίες είναι οι ειδικοί σημασμένοι ανιχνευτές (Taq Man), τα ειδικά δίκλινα μόρια DNA που βασίζονται στη μεταφορά ενέργειας με απορρόφηση ενέργειας (FRET) και οι μη ειδικές παρεμβαλλόμενες φθορίζουσες χρωστικές (SYBR Green) (Pfaffl, et al, 2004).

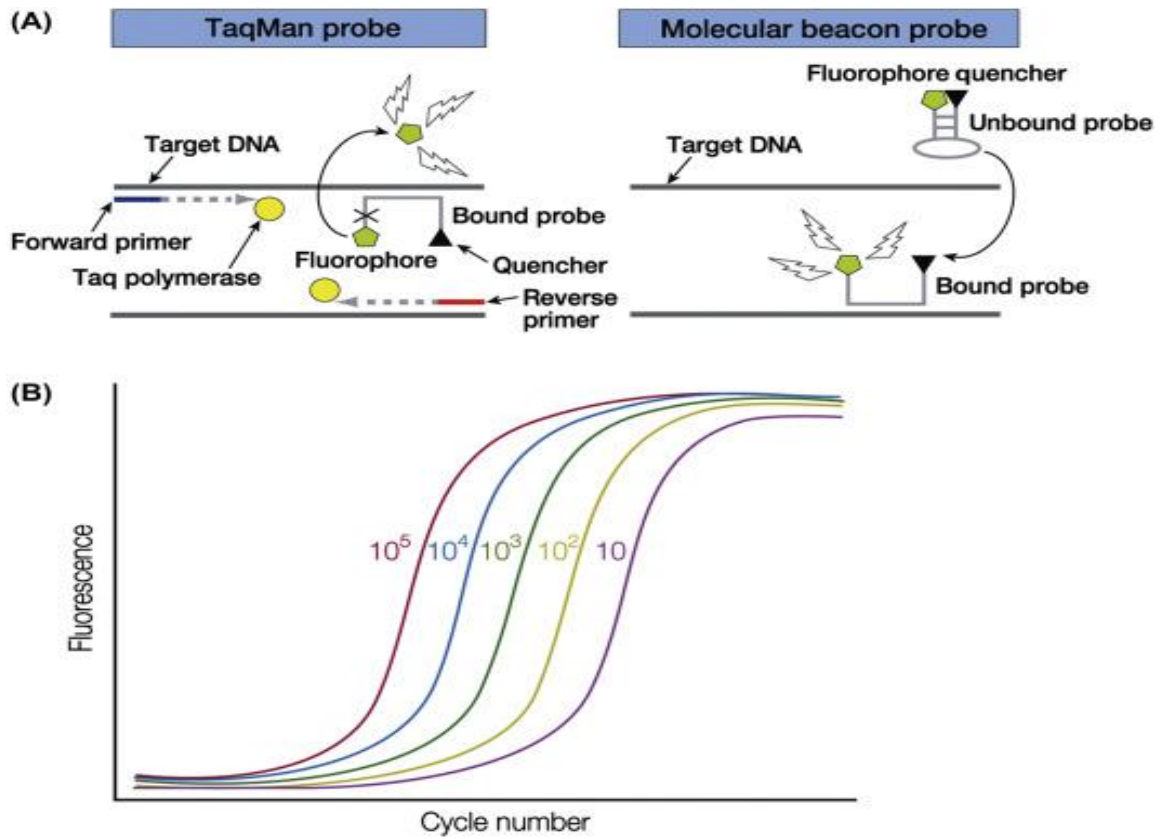
Fluorescent dye-based real-time PCR



DNA probe-based real-time PCR



Εικόνα 13: Η σήμανση των προϊόντων της real time PCR.



Εικόνα 14: Οι ανιχνευτές και η απεικόνιση του φθορισμού και του αριθμού των κύκλων στη *real time PCR*.

Σκοπός

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση της σύστασης του αμνιακού υγρού σε μικροοργανισμούς, κυρίως Ureoplasma, Mycoplasma και Chlamydia, κατόπιν αμνιοπαρακέντησης, στην 15^η έως 22^η εβδομάδα της κύησης. Παράλληλα, παρουσιάστηκαν τα ιδιαίτερα βιολογικά χαρακτηριστικά των δεδομένων παθογόνων, με την χρήση και αξιολόγηση κλασικών κι εξειδικευμένων μοριακών τεχνικών διάγνωσής τους, όπως η εξαγωγή και προσδιορισμός προιόντων γενετικού υλικού με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου. Τα ευρήματα συσχετίστηκαν με την εξέλιξη της κύησης, σε έγκυες με αρνητικό ιστορικό λοίμωξης στον κόλπο και στον τράχηλο.

Ειδικό μέρος

2. Υλικά και Μέθοδος

Οι έγκυες που περιλήφθηκαν στην μελέτη παρακολουθούνταν στη Μαιευτική και Γυναικολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων κατά τη χρονική περίοδο 2017 - 2021. Τα κριτήρια ένταξης στη μελέτη αφορούσαν γυναίκες που υποβλήθηκαν σε αμνιοπαρακέντηση για προγεννητική διάγνωση μεταξύ 15-22 εβδομάδων κύησης. Οι γυναίκες αποκλείονταν εάν διαπιστωνόταν εμβρυϊκή ανωμαλία στον υπέρηχο ή εάν υπήρχαν τρέχουσες κλινικές ενδείξεις λοίμωξης, για την οποία είχαν λάβει αντιβιοτική αγωγή τις δύο προηγούμενες εβδομάδες. Η ηλικία κύησης καθορίστηκε με υπερηχογράφημα μεταξύ 8-14 εβδομάδων. Η πλειοψηφία των γυναικών συμφώνησε να συμμετάσχει στη μελέτη, ενώ όλες παρέιχαν γραπτή συγκατάθεση. Ελήφθη ακόμη έγκριση από την Επιτροπή Έρευνας και Δεοντολογίας του Νοσοκομείου. Συνολικά συμμετείχαν 135 έγκυες γυναίκες με μέση ηλικία 37,1 έτη και μέση ηλικία κύησης στην αμνιοπαρακέντηση 16,9 εβδομάδες.

Το αμνιακό υγρό που συλλεγόταν τη στιγμή της αμνιοπαρακέντησης αποθηκεύονταν στους -80°C ώσπου να συλλεχθούν όλα τα δείγματα και κατόπιν υποβάλλονταν σε επεξεργασία. Η επεξεργασία περιελάμβανε δύο διαφορετικές μεθόδους προετοιμασίας πριν από την απομόνωση του DNA: 1) συγκέντρωση αμνιακού υγρού όπου ένα ml φυγοκεντρούνταν σε 14.000 x g για 15 λεπτά ώστε να διασφαλισθεί ότι συνελήφθησαν όλα τα βιολογικά σωματίδια, με το προκύπτον ίζημα να επαναιωρείται σε 200 μl φωσφορικού άλατος και 2) 200 μl καθαρού (μη αραιωμένου, μη φυγοκεντρημένου) αμνιακού υγρού. Το αυτοματοποιημένο σύστημα εξαγωγής Quick-DNA MiniPrepKit (Zymo Research) χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση DNA από τα παρασκευάσματα αμνιακού υγρού. Για να βελτιωθεί η αποτελεσματικότητα της εκχύλισης, προστέθηκαν στο ρυθμιστικό διάλυμα λύσης 33,3 μg/ml φορέα πολυ(A) RNA, λόγω της πιθανότητας χαμηλών συγκεντρώσεων βακτηριακού DNA στα δείγματα. Το νουκλεϊκό οξύ εκλούσθηκε σε τελικό όγκο 100 μl. Πραγματοποιήθηκε ακόμη qPCR, η οποία στόχευε μια περιοχή 260 bp του γονιδίου της ανθρώπινης β-σφαιρίνης, τόσο

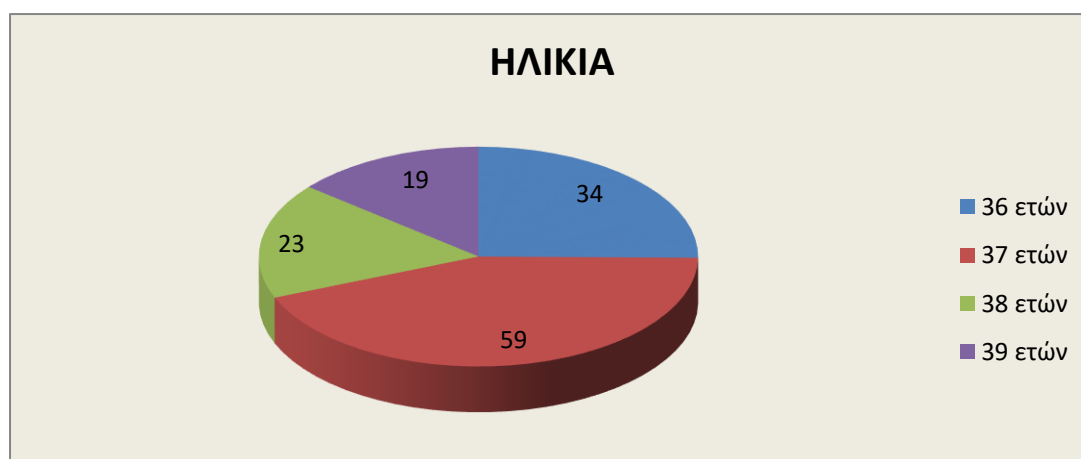
για να καθορισθεί η επάρκεια κυττάρων, όσο και ως εσωτερικός έλεγχος για τις διαδικασίες εκχύλισης και ενίσχυσης.

Η μικροβιακή εισβολή στην αμνιακή κοιλότητα ορίσθηκε ως η ανίχνευση οποιουδήποτε βακτηριακού μικροοργανισμού στο αμνιακό υγρό χρησιμοποιώντας τις εξειδικευμένες για το είδος και τις ευρείας κλίμακας δοκιμές 16S. Αξιολογώντας τις εκβάσεις των κήσεων, ο πρόωρος τοκετός ορίσθηκε ως ο τοκετός πριν από τις 37εβδομάδες κύησης, οι πρόωρες συστολές ορίσθηκαν ως οι τακτικές συστολές της μήτρας και η μεταβολή του τραχήλου της μήτρας στις <37 εβδομάδες κύησης, όπου ενδείκνυνται παρεμβάσεις όπως η τοκόλυση, η περίδεση του τραχήλου και η χορήγηση προφυλακτικών στεροειδών για την ωρίμανση του πνεύμονα του εμβρύου και η PPRM ορίσθηκε ως η αυθόρμητη ρήξη των υμένων πριν από την έναρξη των συστολών μήτρας και πριν από τις 37 εβδομάδες κύησης. Για το ιστορικό, τα επιδημιολογικά στοιχεία και τον προσδιορισμό των εκβάσεων του τοκετού των γυναικών, χρησιμοποιήθηκαν οι ιατρικοί φάκελοι των ασθενών.

2.1 Υλικά - Επιδημιολογικά δεδομένα – Ανάλυση

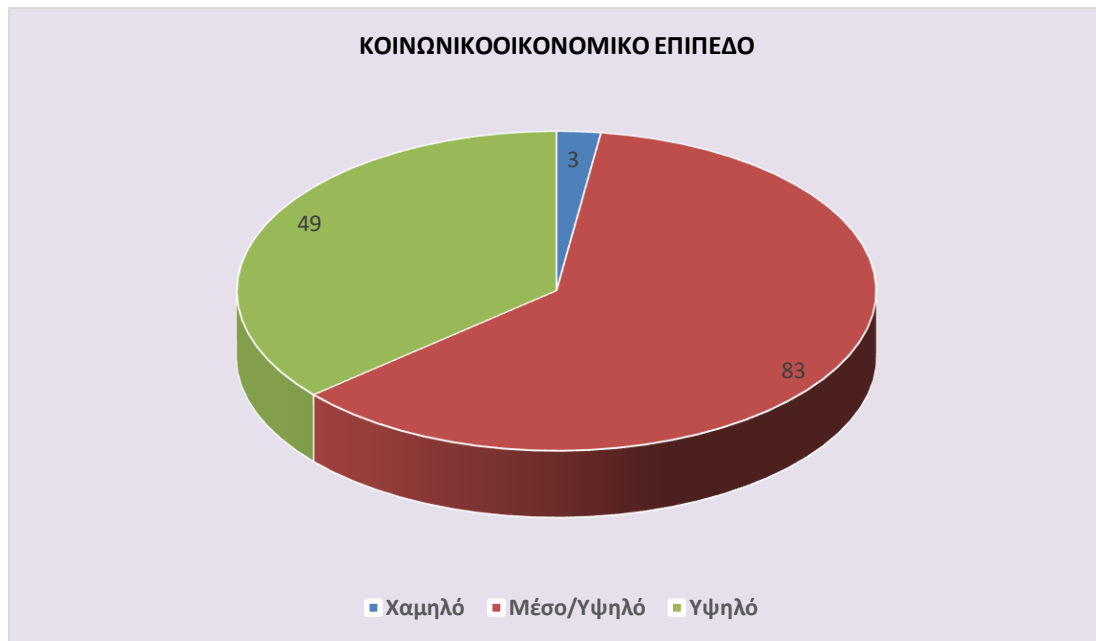
A.

ΗΛΙΚΙΑ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΓΥΝΑΙΚΩΝ
36 ετών	34
37 ετών	59
38 ετών	23
39 ετών	19
	135



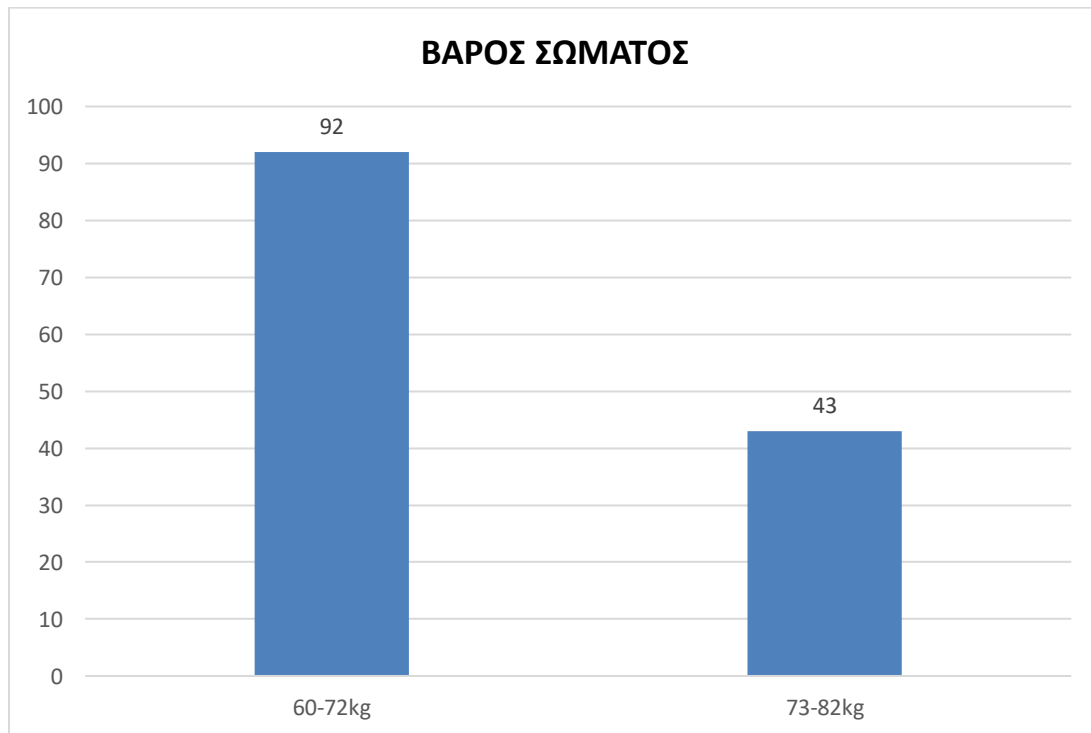
B.

ΚΟΙΝΩΝΙΚΟΟΙΚΟΝΟΜΙΚΟ ΕΠΙΠΕΔΟ	Στήλη1	ΑΡΙΘΜΟΣ ΓΥΝΑΙΚΩΝ
Χαμηλό		3
Μέσο/Υψηλό		83
Υψηλό		49
		135



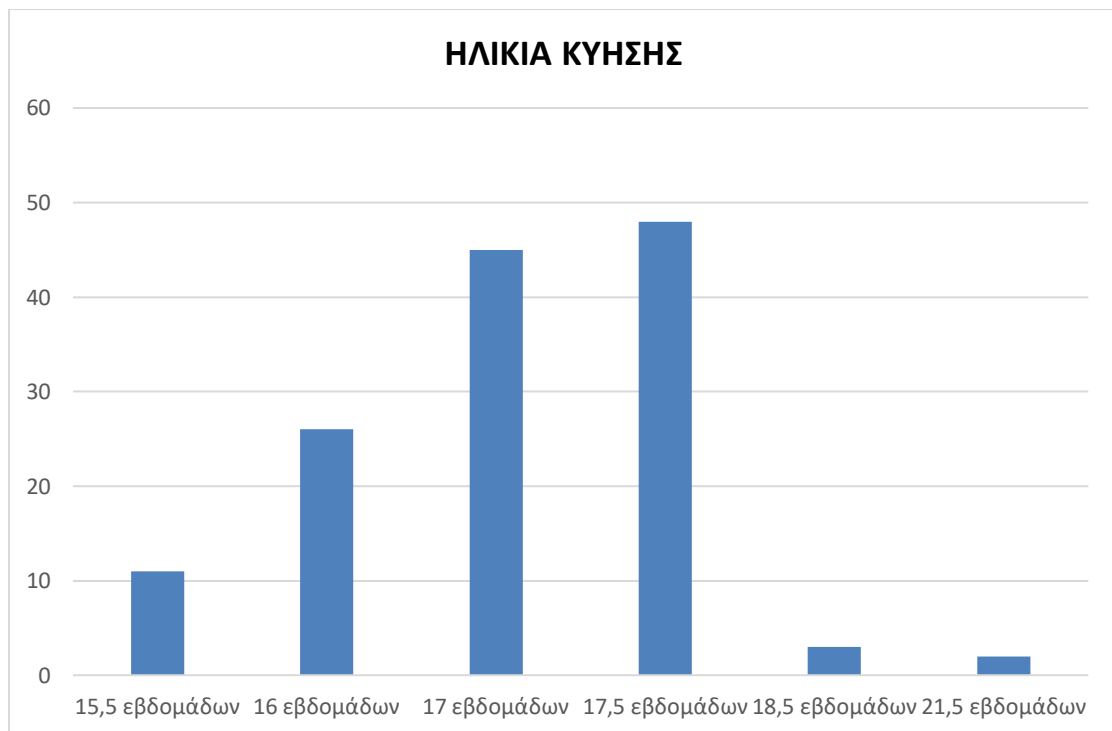
Γ.

ΒΑΡΟΣ ΣΩΜΑΤΟΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΓΥΝΑΙΚΩΝ
60-72kg	92
73-82kg	43
	135



Δ.

ΗΛΙΚΙΑ ΚΥΗΣΗΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΓΥΝΑΙΚΩΝ
15,5 εβδομάδων	11
16 εβδομάδων	26
17 εβδομάδων	45
17,5 εβδομάδων	48
18,5 εβδομάδων	3
21,5 εβδομάδων	2
	135



2.2 Μέθοδοι

1) Εξαγωγή γενετικού υλικού

Στη διαδικασία της εξαγωγής του γενετικού υλικού από τα δείγματα χρησιμοποιήθηκε το kit Quick-DNA MiniPrep Kit (Zymo Research).

Περιεχόμενα Προϊόντος

GenomicLysisBuffer 50 ml

DNA Pre-Wash Buffer 15 ml

g-DNA Wash Buffer 50 ml

DNA Elution Buffer 10 ml

Zymo-Spin IIC Columns 50

CollectionTubes 100

Το DNA Pre-WashBuffer επαναιωρήθηκε πλήρως, επώασθηκε στους 30-37°C για 30 λεπτά και αναμείχθηκε μέσω αναστροφής.

Περιγραφή Προϊόντος

Το Quick-DNA MiniPrepKit ήταν μία απλή διαδικασία για την ταχεία απομόνωση του DNA από τα δείγματα. Αυτό το προϊόν είχε βελτιστοποιηθεί για τη μέγιστη ανάκτηση εξαιρετικά καθαρού DNA χωρίς επιμόλυνση με RNA και ήταν συμβατό με τα υγρά βιολογικά δείγματα.

Δε χρειάστηκαν οργανικοί μετουσιωτές ή πέψη Πρωτεΐνάσης K λόγω του συστήματος του ρυθμιστικού διαλύματος λύσης. Παρήχθη υψηλής ποιότητας καθαρισμένο DNA σε λίγα λεπτά. Οι αναστολείς της PCR απομακρύνθηκαν αποτελεσματικά κατά τη διάρκεια της διαδικασίας καθαρισμού.

II) Προετοιμασία Ρυθμιστικού Διαλύματος

Στο Genomic Lysis Buffer προστέθηκε βήτα-μερκαπτοαιθανόλη σε τελική αραίωση 0,5% (v/v), δηλαδή 250 μ l ανά 50 ml.

III) Πρωτόκολλο Εργαστηριακής Διερεύνησης Δειγμάτων

Το ακόλουθο πρωτόκολλο ήταν σχεδιασμένο για έως 200 μ l υγρού βιολογικού δείγματος.

1. Σε κάθε όγκο υγρού δείγματος προστέθηκαν 4 όγκοι Genomic Lysis Buffer (4:1). Αναμείχθηκαν σύντομα μέσω στροβιλισμού και έπειτα αφήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 5-10 λεπτά.
2. Το μείγμα μεταφέρθηκε σε μία Zymo-Spin IIC Column σε ένα Collection Tube. Φυγοκεντρήθηκε σε 10,000 x g για ένα λεπτό. Το Collection Tube απορρίφθηκε.
3. Η Zymo-Spin IIC Column μεταφέρθηκε σε ένα νέο Collection Tube. Στη στήλη προστέθηκαν 200 μ l DNA Pre-Wash Buffer. Φυγοκεντρήθηκε σε 10,000 x g για ένα λεπτό.
4. Στη στήλη προστέθηκαν 500 μ l g-DNA WashBuffer. Φυγοκεντρήθηκε σε 10,000 x g για ένα λεπτό.
5. Η στήλη μεταφέρθηκε σε ένα καθαρό σωληνάριο μικροφυγοκέντρου. Στη στήλη προστέθηκαν \geq 50 μ l DNA Elution Buffer ή νερού. Επώασθηκε 2-5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα φυγοκεντρήθηκε σε μέγιστη ταχύτητα για 30 δευτερόλεπτα ώστε να εκλουθεί το DNA.

Το εκλούμενο DNA χρησιμοποιήθηκε αμέσως ή αποθηκεύθηκε στους \leq -80 $^{\circ}$ C για μελλοντική χρήση.

IV) Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

5x Buffer D (Kapa Biosystems)

10x Buffer (Invitrogen)

MgCl₂ (25mM) (Kapa Biosystems)

MgCl₂ (50mM) (Invitrogen)

Νουκλεοτίδια (2mM dNTPs)

Taq DNA πολυμεράση (Kapa Biosystems)

H₂O αποστειρωμένο (ddH₂O)

Εκκινητές (primers)

Είδος	Αλληλουχίες εκκινητών	Γονίδιο-στόχος
Mycoplasma hominis Ureaplasma urealyticum	Forward: 5'-TGGAGTTAAGTCGTAACAAG- 3' Reverse: 5'- CTGAGATGTTTCACTTCACC- 3'	16S rRNA
Mycoplasma hominis (a)	Forward: 5'- GGAAGATATGTAACAAAAGAAGGTGCTG- 3' Reverse: 5'- TTTATCTTCTGGCGTAATGATATCTTCG- 3'	16S rRNA
Mycoplasma hominis (b)	Forward: 5'- GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT-3' Reverse: 5'- TGTACCATCTGTCACTCTGTTAACCTC-3'	glyceraldehyde- 3-phosphate dehydrogenase (gap γονίδιο) GAPDH ένζυμο
Chlamydia trachomatis	Forward: 5'- TCTTTTAAACCTCCGGAACCCACTT-3' Reverse: 5'-GGATGGCATCGCATAGCA- TTCTTTG-3'	φωσφολιπάση D (ενδονουκλεάση)

Πίνακας 1: Εκκινητές της αντίδρασης PCR.

Οι εκκινητές της αντίδρασης PCR, η οποία ανιχνεύει το *Mycoplasma hominis* και το *Ureaplasma urealyticum* ενισχύουν τμήμα 630 και 559 bp αντίστοιχα του γονιδίου 16S rRNA (Atefeh et al., 2014). Οι εκκινητές της αντίδρασης PCR, η οποία ανιχνεύει το *Mycoplasma hominis* (a) ενισχύουν τμήμα 280 bp του γονιδίου 16S rRNA (Netto et al., 2015). Οι εκκινητές της αντίδρασης PCR, η οποία ανιχνεύει το *Mycoplasma hominis* (b) ενισχύουν τμήμα 144 bp του γονιδίου της γλυκεραλδεϋδο-3-φωσφορικής δεϋδρογονάσης (Baczynska et al.,

2004) και οι εκκινητές της αντίδρασης PCR, η οποία ανιχνεύει το *Chlamydia trachomatis* ενισχύουν τμήμα 368 bp του γονιδίου της φωσφολιπάσης D (Poonametal., 2009).

Αντιδραστήρια	Όγκος
Buffer (5x)	5 μ L
dNTPs (2mM)	2,5 μ L
MgCl ₂ (25mM)	1 μ L
Forwardprimer (100pmol/ μ L)	2 μ L
Reverseprimer (100pmol/ μ L)	2 μ L
ΠολυμεράσηTaq (1U/ μ L)	0,25 μ L
DNA (25ng/ μ L)	1 μ L
ddH ₂ O	11,25 μ L
Συνολικός όγκος	25 μ L

Πίνακας 2: Αντίδραση PCR για *Mycoplasma hominis* και *Ureaplasma urealyticum*.

Αρχική αποδιάταξη	95 οC για 5 min	
Αποδιάταξη	94 οC για 30 sec	30 κύκλους
Υβριδοποίηση	58 οC για 30 sec	
Επιμήκυνση	72 οC για 1 min	
Τελική επιμήκυνση	72 οC για 5 min	

Πίνακας 3: Συνθήκες πραγματοποίησης της αντίδρασης PCR για *Mycoplasma hominis* και *Ureaplasma urealyticum*.

Αντιδραστήρια	Όγκος
Buffer (10x)	2,5 μ L
dNTPs (2mM)	2,5 μ L
MgCl ₂ (50mM)	3,5 μ L
Forwardprimer (100pmol/ μ L)	2 μ L
Reverseprimer (100pmol/ μ L)	2 μ L
ΠολυμεράσηTaq (1U/ μ L)	0,25 μ L
DNA (25ng/ μ L)	2 μ L
ddH ₂ O	10,25 μ L
Συνολικός όγκος	25 μ L

Πίνακας 4: Αντίδραση PCR για *Mycoplasma hominis* (a).

Αρχική αποδιάταξη	94 οC για 2 min	
Αποδιάταξη	94 οC για 30 sec	40 κύκλους
Υβριδοποίηση	62 οC για 30 sec	
Επιμήκυνση	72 οC για 30 sec	
Τελική επιμήκυνση	72 οC για 10 min	

Πίνακας 5: Συνθήκες πραγματοποίησης της αντίδρασης PCR για *Mycoplasma hominis* (a).

Αντιδραστήρια	Όγκος
Buffer (5x)	5 μ L
dNTPs (2mM)	2,5 μ L
MgCl ₂ (25mM)	1,5 μ L
Forwardprimer (100 μ mol/ μ L)	0,5 μ L
Reverseprimer (100 μ mol/ μ L)	0,5 μ L
Πολυμεράση Taq (1U/ μ L)	0,2 μ L
DNA (25ng/ μ L)	2 μ L
ddH ₂ O	12,8 μ L
Συνολικός όγκος	25 μ L

Πίνακας 6: Αντίδραση PCR για *Mycoplasma hominis* (b).

Αρχική αποδιάταξη	95 οC για 5 min	
Αποδιάταξη	94 οC για 30 sec	35 κύκλους
Υβριδοποίηση	58 οC για 30 sec	
Επιμήκυνση	72 οC για 1 min	
Τελική επιμήκυνση	72 οC για 5 min	

Πίνακας 7: Συνθήκες πραγματοποίησης της αντίδρασης PCR για *Mycoplasma hominis* (b).

Αντιδραστήρια	Όγκος
Buffer (5x)	5 μ L
dNTPs (2mM)	2,5 μ L
MgCl ₂ (25mM)	2,5 μ L
Forwardprimer (100 μ mol/ μ L)	1 μ L
Reverseprimer (100 μ mol/ μ L)	1 μ L
ΠολυμεράσηTaq (1U/ μ L)	0,25 μ L
DNA (25ng/ μ L)	4 μ L
ddH ₂ O-	8,75 μ L
Συνολικός όγκος	25 μ L

Πίνακας 8: Αντίδραση PCR για Chlamydia trachomatis.

Αρχική αποδιάταξη	95 οC για 5 min	
Αποδιάταξη	95 οC για 30 sec	30 κύκλους
Υβριδοποίηση	65 οC για 30 sec	
Επιμήκυνση	72 οC για 1 min	
Τελική επιμήκυνση	72 οC για 10 min	

Πίνακας 9: Συνθήκες πραγματοποίησης της αντίδρασης PCR για Chlamydia trachomatis.

V) Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό και την αναγνώριση των τμημάτων DNA. Η τεχνική είναι απλή, γρήγορη και ικανή να διαχωρίζει μίγματα, τα οποία δε μπορούν να διαχωρισθούν με άλλες τεχνικές.

Τα τμήματα του DNA αναγκάζονται να κινηθούν μέσω των πόρων όπου σχηματίζονται στο πήκτωμα αγαρόζης, υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Η ηλεκτροφορητική ικανότητα του DNA στο πήκτωμα αγαρόζης εξαρτάται κυρίως από τέσσερις παραμέτρους: το μέγεθος του DNA, τη συγκέντρωση της αγαρόζης, τη στερεοδιάταξη του DNA και την ένταση του ηλεκτρικού ρεύματος. Η θέση του DNA στο πήκτωμα προσδιορίζεται με υπεριώδες φως και με τη χρήση μικρής ποσότητας βρωμιούχου αιθιδίου, μιας φθορίζουσας χρωστικής, η οποία παρεμβάλλεται μεταξύ των αζωτούχων βάσεων του DNA. Στη μελέτη μας, χρησιμοποιήθηκε πήκτωμα αγαρόζης 2% και εφαρμόστηκε ηλεκτροφόρηση τόσο στα δείγματα DNA, τα οποία εκχυλίσθηκαν από τα κλινικά δείγματα, όσο και στα προϊόντα των PCR για τον έλεγχο της παρουσίας του επιθυμητού σε μέγεθος προϊόντος.

VI) Υλικά για την Παρασκευή του πηκτώματος αγαρόζης

δισ-απιονισμένο H₂O

TBE Buffer (1.0M Tris-0,9M Boric Acid-0,01M EDTA), UltraPure 10x (Invitrogen)

Agarose (Invitrogen)

Ethidium Bromide Solution (EtBr₂) 10mg/ml (Invitrogen)

10x BlueJuice Gel Loading Buffer (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific)

100bp DNA Ladder 1,0 µg/µL (Invitrogen)

Προηγήθηκε αραίωση του TBE Buffer 10x σε συγκέντρωση 1x, με ανάμιξη 100ml TBE 10x και 900ml νερού.

Σε κωνική φιάλη των 250 ml αναμείχθηκαν 150 ml TBE Buffer 1x και 3g αγαρόζης, ώστε να προκύψει διάλυμα αγαρόζης 2% w/v. Το διάλυμα ομογενοποιήθηκε με κυκλική ανακίνηση της κωνικής φιάλης. Κατόπιν, θερμάνθηκε σε φούρνο μικροκυμάτων έως ότου διαλυθεί η αγαρόζη και, αφέθηκε ώσπου η θερμοκρασία να φθάσει περίπου 50°C. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 7,5 ml βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr₂). Το βρωμιούχο αιθίδιο παρεμβάλλεται μεταξύ των ζευγών βάσεων του δίκλωνου DNA, φθορίζοντας σε μήκος κύματος 290nm. Τα χτενάκια τοποθετήθηκαν στο εκμαγείο για τη δημιουργία βυθισμάτων υποδοχής του DNA και το διάλυμα της αγαρόζης αποχύθηκε προσεκτικά. Μόλις η αγαρόζη στερεοποιήθηκε πλήρως, τα χτενάκια αφαιρέθηκαν. Το πήκτωμα, έτοιμο πλέον για ηλεκτροφόρηση του DNA, εμβαπτίσθηκε σε διάλυμα TBE Buffer 1x στη συσκευή ηλεκτροφόρηση. Για τον προσδιορισμό του μήκους των προϊόντων της PCR είναι απαραίτητη η προσθήκη στο πήκτωμα ενός μάρτυρα μοριακού βάρους, 100 bp DNA Ladder. Επομένως, 10 μL από κάθε δείγμα DNA αναμείχθηκαν με 1 μL χρωστικής GelLoadingBuffer και ακολούθησε η προσθήκη των δειγμάτων DNA στα βυθίσματα του πηκτώματος. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε σταθερή τάση 120 Volts και ένταση 50 mA για 50 λεπτά. Το ηλεκτροφορηθέν πήκτωμα αγαρόζης τοποθετήθηκε σε συσκευή υπεριώδους φωτός και φωτογραφήθηκε με Kodak Digital Camera ενσωματωμένη στη συσκευή.

VII) Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου

Η Real Time PCR πραγματοποιήθηκε στη συσκευή RotorGene 6000 (Corbett Research). Η συσκευή διαθέτει κεφαλή 72 θέσεων για σωληνάκια PCR προπυλενίου των 0,1 ml και περιστρέφεται με ταχύτητα 500 rpm. Σύμφωνα με τον κατασκευαστή, η συγκεκριμένη ταχύτητα περιστροφής εξασφαλίζει διαφορές θερμοκρασίας μεταξύ των δειγμάτων μικρότερες του 0,01 K (Wilhelm et al., 2003).

Τα πρωτόκολλα, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στην ανίχνευση των *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma* και *Ureaplasma* **είναι τα**: *Mycoplasma genitalium* Real TM (Sacace Biotechnologies), *Mycoplasma hominis* Real TM (Sacace Biotechnologies) και *Ureaplasma parvum urealyticum* Real TM (Sacace Biotechnologies). Συνεπώς, σε αντίθεση με την κλασική PCR, με τη Real Time PCR ανιχνεύθηκε και ταυτοποιήθηκε το είδος των μυκοπλασμάτων σε κάθε δείγμα. Τα πρωτόκολλα εφαρμόστηκαν σε όλα τα δείγματα, ενώ τα αντιδραστήρια και οι συνθήκες του θερμοκυκλοποιητή παρουσιάζονται στους πίνακες για κάθε μικροοργανισμό σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Αντιδραστήρια	Όγκος
PCR-mix-1-FRT	(N x)10 μl
PCR-Buffer-FRT	(N x)5 μl
TaqF DNA polymerase	(N x)0.5 μl
Συνολικός όγκος ReactionMix	(N x) 15μl

Πίνακας 10:Αντίδραση **Real Time PCR** για ***Mycoplasma hominis***.

όπου N ο συνολικός αριθμός των δειγμάτων

Σε κάθε σωληνάκι προπυλενίου προστέθηκαν 15μl Reaction Mix και 10 μl DNA. Το kit παρέχει θετικό μάρτυρα (Positive Control C+).

Hold	95 οCγια 15min	
Cycling	95οC για 20 sec	10 κύκλοι
	65οC για 20 sec	
	72 οC για 20 sec	
Cycling 2	92 οC για 20 sec	35 κύκλοι
	60οC για 30 sec	
	72 οC για 15 sec	

Πίνακας 11: Συνθήκες πραγματοποίησης της Real Time PCR.

Αντιδραστήρια	Όγκος
PCR-mix-1-FRT	(N x) 10 μl
PCR-Buffer-FRT	(N x) 5 μl
TaqF DNA polymerase	(N x) 0.5 μl
Συνολικός όγκος ReactionMix	(N x) 15μl

Πίνακας 12: Αντίδραση Real Time PCR για **Mycoplasma genitalium**.

όπου N ο συνολικός αριθμός των δειγμάτων

Σε κάθε σωληνάκι προτυλενίου προστέθηκαν 15μl Reaction Mix και 10 μl DNA. Το kit παρείχε θετικό μάρτυρα (PositiveControl C+).

Hold	95 οCγια 15min	
Cycling	95οC για 20 sec	10 κύκλοι
	65οC για 20 sec	
	72 οC για 20 sec	
Cycling 2	92 οC για 20 sec	35 κύκλοι
	60οC για 30 sec	
	72 οC για 15 sec	

Πίνακας 13: Συνθήκες πραγματοποίησης της Real Time PCR.

Αντιδραστήρια	Όγκος
PCR-mix-1-FRT	(N x) 10 μl
PCR-Buffer-FRT	(N x) 5 μl
TaqF DNA polymerase	(N x) 0.5 μl
Συνολικός όγκος ReactionMix	(N x) 15μl

Πίνακας 14: Αντίδραση Real Time PCR για **Ureaplasma parvum** και **Ureaplasma urealyticum**.

όπου N ο συνολικός αριθμός των δειγμάτων

Σε κάθε σωληνάκι προτυλενίου προστέθηκαν 15 μl Reaction Mix και 10 μl DNA. Το kit παρέιχε θετικό μάρτυρα (PositiveControl C+).

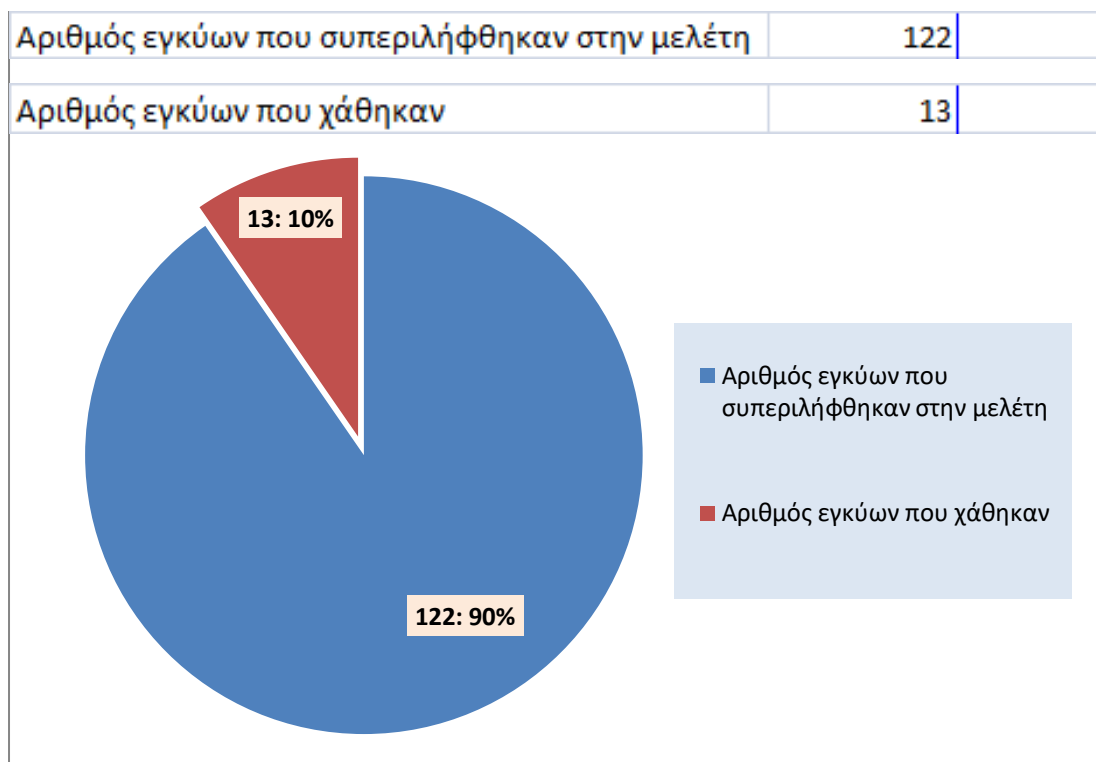
Hold	95 οCγια 15min	
Cycling	95οC για 20 sec	10 κύκλοι
	65οC για 20 sec	
	72 οC για 20 sec	
Cycling 2	95οC για 20 sec	35 κύκλοι
	60οC για 30 sec	
	72 οC για 15 sec	

Πίνακας 15: Συνθήκες πραγματοποίησης της Real Time PCR.

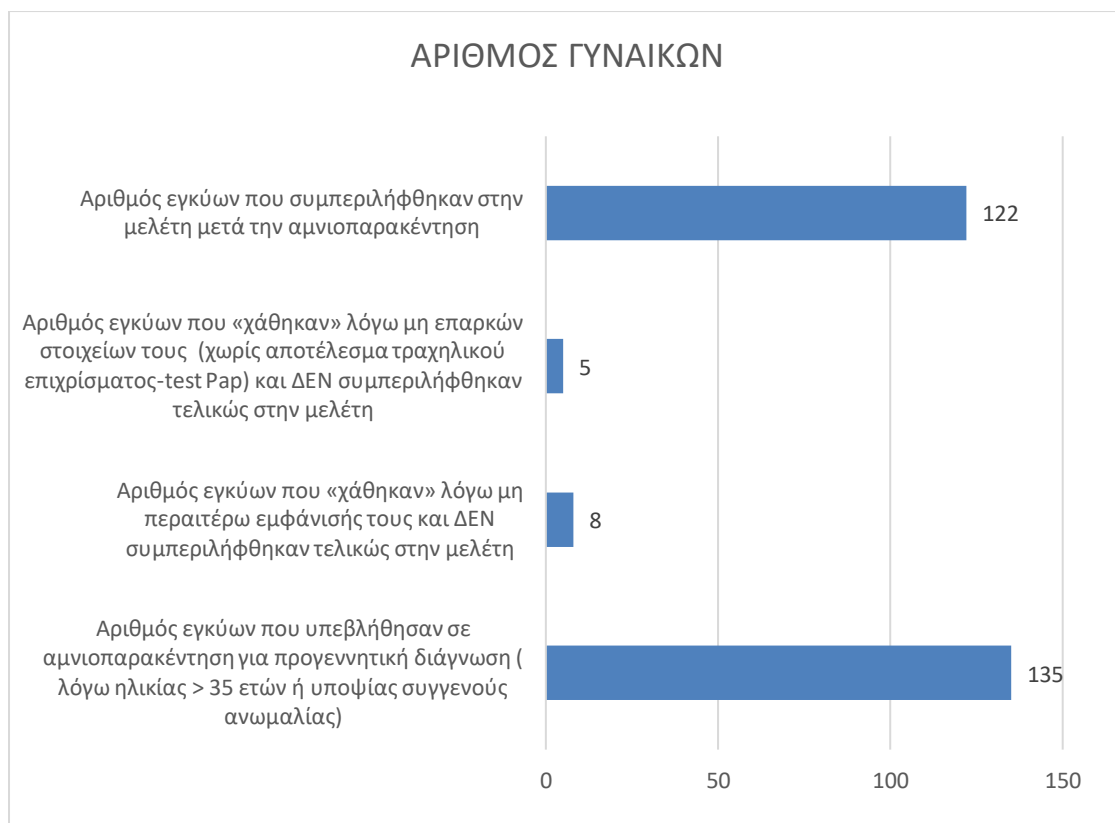
3. Αποτελέσματα

Στους πίνακες και τα γραφήματα που ακολουθούν, αναφέρονται τα αποτελέσματα υλικών και ατόμων που συμπεριλήφθηκαν στην πορεία της μελέτης μας.

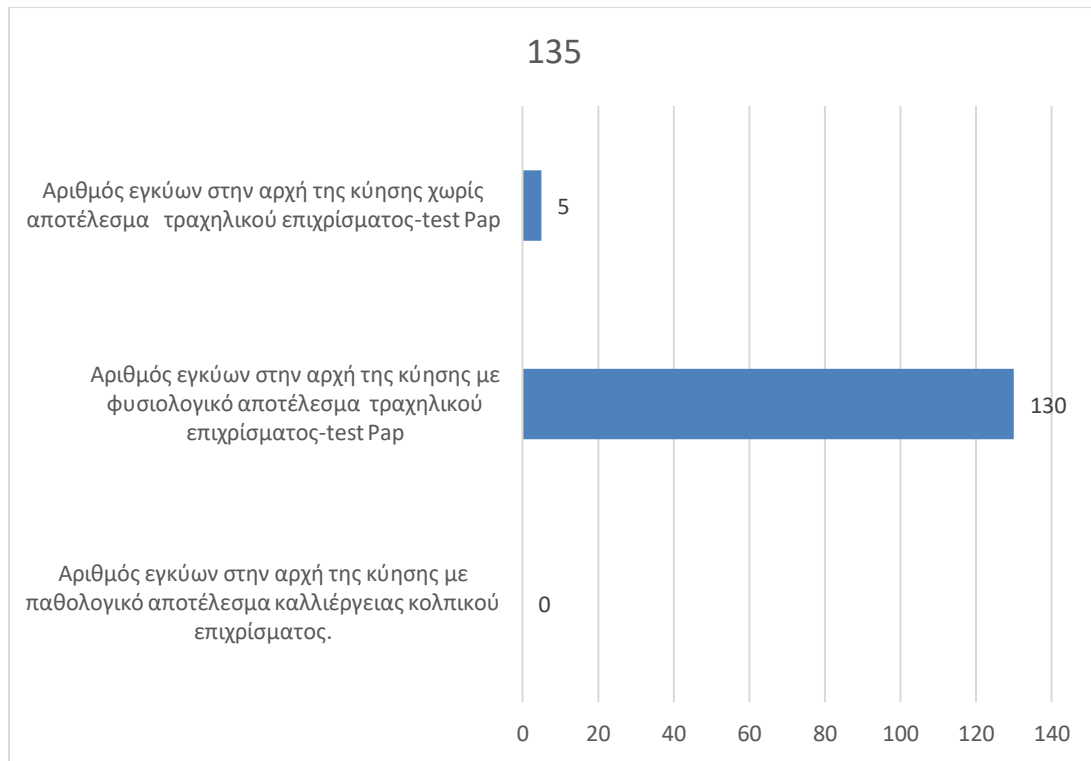
Στήλη1	Στήλη2
Αριθμός εγκύων που συμπεριλήφθηκαν στην μελέτη	122
Αριθμός εγκύων που «χάθηκαν» λόγω μη περαιτέρω εμφάνισής ή μη επαρκών στοιχείων τους και ΔΕΝ συμπεριλήφθηκαν τελικώς στην μελέτη	13
	135



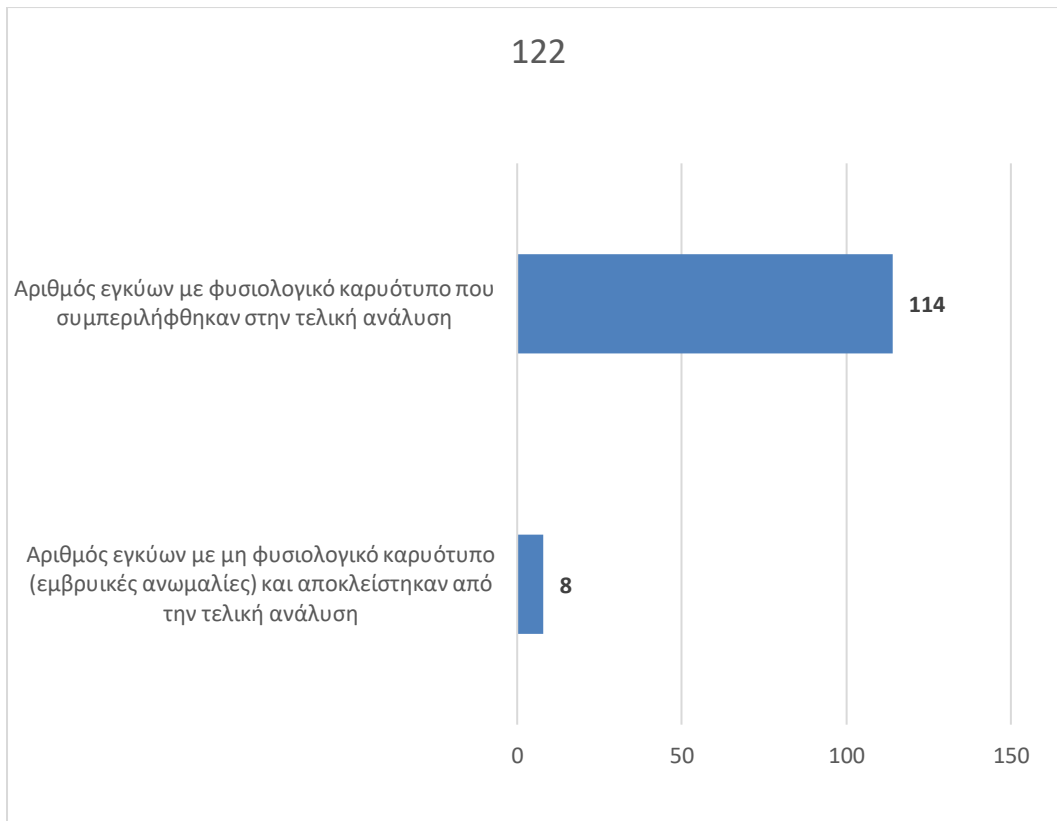
Στήλη1	ΑΡΙΘΜΟΣ ΓΥΝΑΙΚΩΝ
Αριθμός εγκύων που υπεβλήθησαν σε αμνιοπαρακέντηση για προγεννητική διάγνωση (λόγω ηλικίας > 35 ετών ή υποψίας συγγενούς ανωμαλίας)	135
Αριθμός εγκύων που «χάθηκαν» λόγω μη περαιτέρω εμφάνισής τους και ΔΕΝ συμπεριλήφθηκαν τελικώς στην μελέτη	8
Αριθμός εγκύων που «χάθηκαν» λόγω μη επαρκών στοιχείων τους (χωρίς αποτέλεσμα τραχηλικού επιχρίσματος-testPap) και ΔΕΝ συμπεριλήφθηκαν τελικώς στην μελέτη	5
Αριθμός εγκύων που συμπεριλήφθηκαν στην μελέτη μετά την αμνιοπαρακέντηση	122



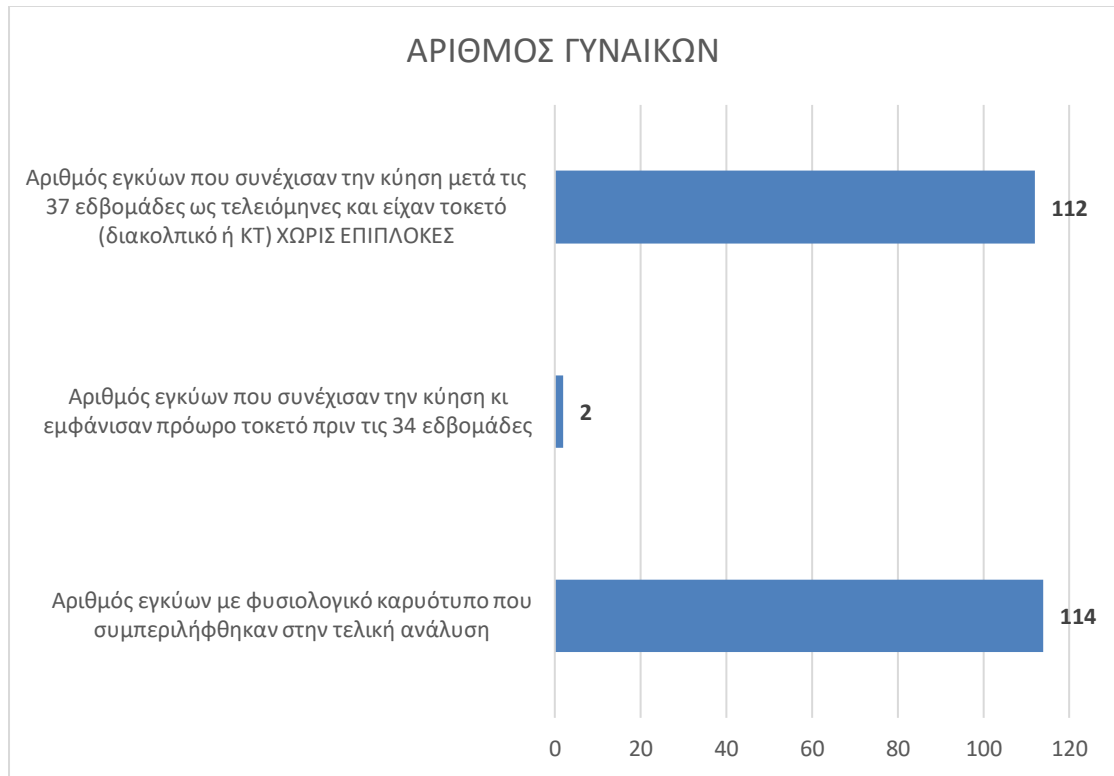
Στήλη1	ΑΡΙΘΜΟΣ ΓΥΝΑΙΚΩΝ
Αριθμός εγκύων στην αρχή της κύησης με φυσιολογικό αποτέλεσμα καλλιέργειας κολπικού επιχρίσματος.	135
Αριθμός εγκύων στην αρχή της κύησης με παθολογικό αποτέλεσμα καλλιέργειας κολπικού επιχρίσματος.	0
Αριθμός εγκύων στην αρχή της κύησης με φυσιολογικό αποτέλεσμα τραχηλικού επιχρίσματος-testPap	130
Αριθμός εγκύων στην αρχή της κύησης χωρίς αποτέλεσμα τραχηλικού επιχρίσματος-testPap	5



Στήλη1	ΑΡΙΘΜΟΣ ΓΥΝΑΙΚΩΝ
Αριθμός εγκύων που συμπεριλήφθηκαν στην μελέτη μετά την αμνιοπαρακέντηση	122
Αριθμός εγκύων με μη φυσιολογικό καρυότυπο (εμβρυικές ανωμαλίες) και αποκλείστηκαν από την τελική ανάλυση	8
Αριθμός εγκύων με φυσιολογικό καρυότυπου που συμπεριλήφθηκαν στην τελική ανάλυση	114



Στήλη1	ΑΡΙΘΜΟΣ ΓΥΝΑΙΚΩΝ
Αριθμός εγκύων με φυσιολογικό καρυότυπο που συμπεριλήφθηκαν στην τελική ανάλυση	114
Αριθμός εγκύων που συνέχισαν την κύηση κι εμφάνισαν πρόωρο τοκετό πριν τις 34 εβδομάδες	2
Αριθμός εγκύων που συνέχισαν την κύηση μετά τις 37 εβδομάδες ως τελειόμηνες και είχαν τοκετό (διακολπικό ή ΚΤ) ΧΩΡΙΣ ΕΠΙΠΛΟΚΕΣ	112



Αριθμός εγκύων που ξεκίνησαν την μελέτη	Αριθμός εγκύων που «χάθηκαν»	Αριθμός εγκύων που τελικά συμπεριλήφθηκαν στην μελέτη μετά την αμνιοπαρακέντηση
135 γυναίκες	8+5= 13	135-13= 122

Αριθμός εγκύων με μη φυσιολογικό καρυότυπο (που γι αυτό αποκλείστηκαν)	Αριθμός εγκύων με φυσιολογικό καρυότυπο που τελικά συμπεριλήφθηκαν
8	122 – 8 = 114

Αριθμός εγκύων με πρόωρο τοκετό πριν τις 34 εβδ	Αριθμός εγκύων τελειόμηνων μετά τις 34 εβδ ΚΑΙ ΧΩΡΙΣ ΑΛΛΗ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ ΩΣ ΤΟ ΤΕΛΟΣ ΤΗΣ ΚΥΗΣΗΣ	Αριθμός εγκύων με αρνητικό αποτέλεσμα σε PCR και realtime PCR
2	114-2 = 112	114

Ειδικότερα,

τα πλήρη δεδομένα σχετικά με τις εκβάσεις των κυήσεων ήταν διαθέσιμα για 122 γυναίκες, καθώς κάποιες χάθηκαν κατά την παρακολούθηση. Οκτώ γυναίκες υποβλήθηκαν σε διακοπή της κύησης λόγω μη φυσιολογικού καρυοτύπου και έτσι αποκλείστηκαν από την τελική ανάλυση. Από τις 114 γυναίκες στις οποίες συνεχίστηκε η εγκυμοσύνη, σε 2/114 (1,75%) συνέβη **πρόωρος** τοκετός, πριν από τις 34 εβδομάδες. Μία εκ των γυναικών γέννησε στις 33 εβδομάδες κύησης λόγω σοβαρής **προεκλαμψίας** και ακόμη μία

γέννησε στις 31 εβδομάδες κύησης. Στη γυναίκα 31 εβδομάδων, τα κολπικά και πλακουντιακά επιχρίσματα στάλθηκαν για καλλιέργεια. Αν και κατά τον τοκετό το κολπικό επίχρισμα ήταν θετικό στην καλλιέργεια για ουρεάπλάσμα, δεν απομονώθηκε από τα επιχρίσματα του πλακούντα, της αμνιακής ή της χοριακής μεμβράνης. Στην άλλη γυναίκα τα κολπικά και πλακουντιακά επιχρίσματα ήταν αρνητικά. Σε ένα περιστατικό παρουσιάστηκε παροδική διαρροή αμνιακού υγρού 2 ημέρες μετά την αμνιοπαρακέντηση, ωστόσο η εγκυμοσύνη συνεχίστηκε χωρίς προβλήματα.

Απομονώθηκε DNA από τα κλινικά δείγματα, τα οποία ήταν θετικά για το γονίδιο της ανθρώπινης β-σφαιρίνης. Αν και τα 114 συνολικά δείγματα ελέγχθηκαν με τις εξειδικευμένες για κάθε είδος μοριακές δοκιμασίες, δεν ανιχνεύθηκε *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma parvum* και *Ureaplasma urealyticum*. Επιπλέον, σε κανένα από τα κλινικά δείγματα δεν ανιχνεύθηκε το γονίδιο 16S rRNA, μεθοδολογία που εφαρμόστηκε για πρώτη φορά από ό,τι διαπιστώσαμε στην βιβλιογραφία.

4. Συζήτηση

Καθώς η εγκυμοσύνη εξελίσσεται, η μήτρα μεταβάλλεται ως προς το εσωτερικό της περιβάλλον. Ξεκινά από μια πρώιμη προφλεγμονώδη κατάσταση, μεταπίπτει σε μια μη φλεγμονώδη κατάσταση κατά τη διάρκεια του δευτέρου τριμήνου και τελικά επιστρέφει σε μια, λίγο πριν την εκδήλωση φλεγμονής κατάσταση, στην χρονική περίοδο πριν από την έναρξη του τοκετού. Το μικροβιακό προφίλ ενδοαμνιακά θα μπορούσε να αλλάξει καθώς ο τράχηλος εξαλείφεται βραχύνοντας σταδιακά το μήκος του και στη συνέχεια διαστέλλεται. Ωστόσο, οι περισσότερες μελέτες αναφέρονται σε δείγματα που συνέλεξαν τη στιγμή του διακοπτικού τοκετού ή της καισαρικής τομής.

Με τη χρήση πολλαπλών μεθόδων έρευνας που περιελάμβαναν PCR για το γονίδιο της ανθρώπινης β-σφαιρίνης, ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο και ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο για το γονίδιο 16S rRNA (16S rRNA qPCR), πραγματοποιήσαμε μια προοπτική μελέτη κοόρτης για τη διερεύνηση της παρουσίας μικροοργανισμών στο αμνιακό υγρό κατά τη διάρκεια του μέσου του δευτέρου τριμήνου των 114 γυναικών.

Η μελέτη μας προσπάθησε να προσδιορίσει τη συχνότητα της ασυμπτωματικής φορέας μικροοργανισμών **στο αμνιακό υγρό κατά το δεύτερο τρίμηνο**. Το αμνιακό υγρό διερευνήθηκε εντατικά για την παρουσία των δεδομένων μικροοργανισμών, με ιδιαίτερη έμφαση στα μυκοπλάσματα, ουρεοπλάσματα και χλαμύδια των γεννητικών οργάνων, τα οποία ενδεχομένως σχετίζονται με πρόωρο τοκετό (Nguyen, et al, 2004, Rodriguez, et al, 2011, Larsen, et al, 2010, Romero, et, al, 2001, Taylor-Robinson, et, al, 2010, Yoon, et al, 2003). Η αξιολόγηση περιελάμβανε, τόσο εξειδικευμένες ως προς τα είδη, όσο και ευρείας κλίμακας βακτηριακές αναλύσεις PCR. Το κύριο εύρημα είναι ότι το αμνιακό υγρό στο δεύτερο τρίμηνο της κύησης βρέθηκε στείρο μικροβίων στον πληθυσμό μας.

Επιπλέον, τα ευρήματά για μη ανίχνευση μικροοργανισμών στην αμνιακή κοιλότητα είναι σύμφωνα με τις παρατηρήσεις άλλων μεγάλων προοπτικών

μελετών κοόρτης. Μελέτες έχουν αναφέρει ευρέως ποικίλα ποσοστά θετικότητας στο αμνιακό υγρό, από λιγότερο από 1% έως περισσότερο από 80% (Gerber, et al, 2003, Nguyen, et al, 2004, Perni, et al, 2004, Chu, et al, 2017, Gray, et al, 1992), τα οποία εξηγούνται εν μέρει από τις διαφορετικές τεχνικές (καλλιέργεια έως PCR), καθώς και από τη μεταβλητότητα των εξετασθέντων κλινικών μελετών κοόρτης. Με την προσθήκη εξελιγμένων μοριακών τεχνικών ανάλυσης, καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι ο αποικισμός του αμνιακού υγρού με μικροοργανισμούς στο δεύτερο τρίμηνο είναι σπάνιος.

Στη μελέτη μας, το παρατηρούμενο ποσοστό **αυτόματου πρόωρου τοκετού** πριν τις 34 εβδομάδες ήταν χαμηλό, αλλά σύμφωνο με παρόμοιους πληθυσμούς χαμηλού κινδύνου. Συγκεκριμένα, οι κύσεις που κατέληξαν σε αυτόματο πρόωρο τοκετό ήταν όλες αρνητικές για μικροοργανισμούς στο αμνιακό υγρό κατά το δεύτερο τρίμηνο, σε έγκυες με αρνητικό ιστορικό λοίμωξης γεννητικών οργάνων, εύρημα που αναφέρθηκε και από άλλους (Rodriguez, et al, 2011). Ενώ η υποκλινική λοίμωξη θεωρούνταν ευρέως ως ένας σημαντικός αιτιολογικός παράγοντας στην παθογένεια του φλεγμονώδους πρόωρου τοκετού, η πηγή της λοίμωξης και η ηλικία κύησης στην οποία αποκτάται, παραμένουν ασαφή. Έχει υποστηριχθεί ότι ο αποικισμός με μικροοργανισμούς χαμηλής λοιμογόνου δράσης, οι οποίοι ανέρχονται από την κατώτερη γεννητική οδό, αποτελεί πρόδρομο της ενδοαμνιακής υποκλινικής λοίμωξης, η οποία με τη σειρά της οδηγεί σε ρήξη των μεμβρανών και/ή πρόωρο τοκετό. Μια μελέτη, δημοσιευμένη από τους Chu et al. 2017 προτείνει ότι υφίσταται μικροβίωμα αμνιακού υγρού: χρησιμοποιώντας μια προσέγγιση γονιδιακής αλληλούχισης 16s rRNA MiSeq σε 95 δείγματα αμνιακού υγρού συλλεχθέντα για γενετικό έλεγχο, αναφέρουν την εύρεση πληθυσμών που υποδηλώνουν οργανισμούς παρόμοιους με αυτούς των μεμβρανών του πλακούντα, της στοματικής και της ρινικής κοιλότητας (Chu, et al, 2017). Ωστόσο, απαιτούνται επαναληπτικές μελέτες για επιβεβαίωση. Σε αυτές τις μελέτες, επιχειρείται απάντηση από την παρούσα μελέτη. Οι μικροοργανισμοί που απομονώνονται συνήθως από το γεννητικό σύστημα, ιδιαίτερα τα μυκοπλάσματα των γεννητικών οργάνων, έχουν εμπλακεί σε αυτή τη διαδικασία, αν και ο προτεινόμενος μηχανισμός με τον οποίο παραβιάζεται η αμνιακή κοιλότητα είναι ασαφής (Goldenberg, et al,

2000). Δεν είναι βέβαιο εάν οι μικροοργανισμοί είναι οι ίδιοι παθογόνοι: μπορεί είτε να συνιστούν δείκτες ευπάθειας, είτε να έχουν συμπληρωματικό ρόλο στη διαδικασία του φλεγμονώδους πρόωρου τοκετού. Πράγματι, αρκετές μελέτες υποδεικνύουν ότι η στείρα φλεγμονή είναι συχνότερη και σχετίζεται πιο στενά με τον πρόωρο τοκετό απ' ό,τι η μικροβιακά προκαλούμενη φλεγμονή. Οι Gervasi et al. 2012 ανέφεραν αύξηση στους δείκτες φλεγμονής του αμνιακού υγρού δευτέρου τριμήνου μεταξύ των γυναικών που προοριζόταν να γεννήσουν πρόωρα και επεσήμαναν ότι η παρουσία φλεγμονής δεν αντανακλά πάντα μικροβιακή λοίμωξη, καθώς μόνο το 0,2% των δειγμάτων αμνιακού υγρού ήταν θετικά σε καλλιέργεια (Gervasi, et al, 2012). Μελέτες, οι οποίες χρησιμοποιούν και καλλιέργεια αμνιακού υγρού και PCR ευρέος φάσματος με φασματομετρία μάζας, έχουν εντοπίσει ότι η στείρα ενδοαμνιακή φλεγμονή είναι τουλάχιστον εξίσου συχνή, ίσως και συχνότερη, από τη μικροβιακή ενδοαμνιακή φλεγμονή στις γυναίκες με πρόωρο τοκετό (Romero, et al, 2014, 2015). Μέχρι σήμερα η παρουσία φλεγμονής θεωρούνταν αντιπροσωπευτική της μικροβιακής παρουσίας, αλλά μπορεί να είναι ακριβώς το αντίθετο: η φλεγμονώδης απόκριση του ξενιστή ίσως να επηρεάζει ή να μετριάζει το μικροβιακό αποικισμό και τη μόλυνση. Δεδομένου του βασικού ρόλου της ανοσοαπόκρισης του ξενιστή στην ανάπτυξη και τον ορισμό της λοίμωξης, το προφίλ της απόκρισης του ξενιστή προσφέρει τη δυνατότητα να βοηθήσει στην αποκάλυψη του γρίφου της διάκρισης του αποικισμού και της στείρας φλεγμονής από την αληθινή μόλυνση. (Jeffrey, et al 2023). Κάτι τέτοιο θα μπορούσε να οφείλεται εν μέρει στο εύρος των κλινικών αποτελεσμάτων καθώς και στις αναφερόμενες διαφορές σε διαφορετικούς πληθυσμούς.

Ως προς τις κλινικές επιπτώσεις, ενώ προηγουμένως θεωρούνταν πως οποιαδήποτε μικροβιακή εισβολή στην αμνιακή κοιλότητα μπορεί να συνιστά σημαντικό πρόδρομο του αυτόματου πρόωρου τοκετού, η διαδικασία με την οποία συμβαίνει αυτό παραμένει άγνωστη. Η μελέτη μας υποδηλώνει ότι η μικροβιακή εισβολή στην αμνιακή κοιλότητα είναι στην πραγματικότητα ασυνήθιστη, γεγονός σύμφωνο με τα ευρήματα άλλων μεγάλων μελετών κοόρτης. Αυτό είναι αξιοσημείωτο, δεδομένης της εκτίμησης της πιθανής σχέσης, είτε του αμνιακού υγρού, είτε του μικροβιώματος του πλακούντα

(Chu, et al, 2017, Aagaard, et al, 2014), με τις εκβάσεις της κύησης (Antony, et al, 2015, Prince, et al, 2015). Η εργασία (Aagaard, et al, 2014) συγκεκριμένα επισημαίνει πως γενικά, τα μικροβιώματα του πλακούντα ομοιάζαν περισσότερο (ανομοιότητα Bray-Curtis < 0,3) με το μικροβίωμα του ανθρώπινου στόματος. Οι αναλύσεις λειτουργικής ταξινομικής μονάδας που βασίζονται στο 16SrRNA αποκάλυψαν συσχετίσεις του μικροβιώματος του πλακούντα μόνον σε περιπτώσεις ιστορικού λοίμωξης του ουροποιητικού συστήματος στο πρώτο τρίμηνο, καθώς και με πρόωρο τοκετό < 37 εβδομάδες ($P = 0,001$). Η δική μας μελέτη επιβεβαιώνει ακόμη πως τα ευρήματα δε θα πρέπει να προεκταθούν, υποδηλώνοντας ότι η αμνιακή κοιλότητα φυσιολογικά περιέχει μικροοργανισμούς, κάτι που δεν ισχύει, ειδικά για τις ασυμπτωματικές γυναίκες χωρίς ιστορικό λοίμωξης, οι οποίες συμπεριλήφθηκαν στην τελική ανάλυση. Ακόμη και στις δύο που παρουσίασαν πρόωρο τοκετό, οι καλλιέργειες της πλακουντιακής και αμνιακής μεμβράνης απέβησαν αρνητικές για μικροβίωμα. Το εύρημα για κανένα ανιχνεύσιμο βακτηριακό DNA στην αμνιακή κοιλότητα των ασυμπτωματικών γυναικών χαμηλού κινδύνου στο δεύτερο τρίμηνο, παρά τη χρήση μιας ολοκληρωμένης μοριακής προσέγγισης, δεν υποστηρίζει την παρουσία ενός πλακουντιακού μικροβιώματος.

Το ότι δεν καταφέραμε να εντοπίσουμε περιπτώσεις όπου το αμνιακό υγρό ήταν θετικό, δεν προκαλεί έκπληξη, δεδομένου του μικρού αριθμού πρόωρων γεννήσεων, αν και η σε βάθος ανάλυση, η οποία εφαρμόστηκε στη μελέτη μας υποδηλώνει ότι εάν υπάρχει μικροβιακή μόλυνση της αμνιακής κοιλότητας σε αυτά τα δείγματα, βρίσκεται κάτω από τα κατώτατα όρια ανίχνευσης των μοριακών αναλύσεων. Το σύνολο των κυήσεων που ολοκληρώθηκαν με αυτόματο πρόωρο τοκετό δεν εμφάνισαν στοιχεία μικροβιακής μόλυνσης του αμνιακού υγρού στο δεύτερο τρίμηνο. Ενώ η ενδοαμνιακή λοίμωξη παραμένει σημαντικός παράγοντας αυτόματου πρόωρου τοκετού, η μελέτη επισημαίνει ότι η απάντηση δε βρίσκεται μονάχα στην αναζήτηση και την εκρίζωση μικροοργανισμών, αλλά και στην καλύτερη κατανόηση της ενεργοποίησης των φλεγμονωδών οδών του πρόωρου τοκετού.

Οι προηγούμενες μελέτες είχαν απλώς χρησιμοποιήσει την PCR για την ανίχνευση μικροβίων στο αμνιακό υγρό ασυμπτωματικών γυναικών στο δεύτερο τρίμηνο, ελέγχοντας έναν ή περισσότερους ταυτοποιημένους μικροοργανισμούς (Gerber, etal, 2003, Nguyen, etal, 2004, Romero, etal, 2014). Τα πρωτοποριακά σημεία αυτής της μελέτης περιλαμβάνει τον προοπτικό σχεδιασμό της και την ισχυρή μεθοδολογία που χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση της παρουσίας μικροοργανισμών στο αμνιακό υγρό. Για να αποκλεισθεί η πιθανότητα απώλειας μολυσματικών παραγόντων, απομονώθηκε DNA και από καθαρό αμνιακό υγρό. Οι δοκιμές qPCR *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma parvum*, *Ureaplasma urealyticum* που χρησιμοποιήθηκαν είναι ιδιαίτερα ευαίσθητες. Η απουσία των συγκεκριμένων βακτηρίων υποστηρίχθηκε περαιτέρω από τα αρνητικά αποτελέσματα της δοκιμασίας 16S. Η ευαισθησία της 16SqPCR ήταν χαμηλότερη (10 φορές χαμηλότερη από τις εξειδικευμένες αναλύσεις για το είδος), επομένως βακτήρια σε πολύ χαμηλή αφθονία ίσως να μην έχουν εντοπισθεί.

Εντούτοις, το αρνητικό αποτέλεσμα των εξειδικευμένων για το είδος δοκιμών PCR υποδεικνύει ότι αυτοί οι μικροοργανισμοί, είτε δεν υπάρχουν στο αμνιακό υγρό των γυναικών από τις οποίες ελήφθη δείγμα κατά το δεύτερο τρίμηνο, είτε υπάρχουν σε πολύ χαμηλούς αριθμούς αντιγράφων, κάτω από τα όρια ανίχνευσης των δοκιμών και είναι απίθανο να είναι κλινικά ουσιώδεις. Είναι σημαντικό ότι τα ποσοτικά αποτελέσματα β-σφαιρίνης ήταν θετικά σε όλα τα δείγματα, υποδεικνύοντας ότι η αποτυχία ανίχνευσης μικροοργανισμών δεν οφειλόταν σε αναστολές της PCR ή περιορισμούς στην επάρκεια κυττάρων.

Ενώ τα μοριακά μικροβιολογικά εργαστηριακά δεδομένα της μελέτης μας είναι πλήρη, αποτελεί περιορισμό της το ότι δε διενεργήθηκε καλλιέργεια. Λόγω της εκτεταμένης φάσης συλλογής των δειγμάτων της μελέτης, και ειδικότερα της μεγαλύτερης ευαισθησίας των μοριακών μικροβιολογικών δοκιμών σε σύγκριση με την καλλιέργεια, πραγματοποιήθηκε αναδρομική μοριακή ανάλυση μόνο των αποθηκευμένων κατεψυγμένων δειγμάτων.

Γενικώς, δείγματα όπου φέρουν τους μικροοργανισμούς σε ιδιαίτερα χαμηλή συγκέντρωση ενδέχεται να μην εντοπίζονται θετικά με τις εμπορικές

δοκιμασίες και την κλασική PCR, γεγονός που δικαιολογείται λόγω της εξαιρετικά υψηλής ευαισθησίας της ποσοτικής PCR έναντι της απλής PCR και δη έναντι των εμπορικών δοκιμασιών. Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου διαθέτει δυνατότητα ανίχνευσης λιγότερων από πέντε αντιγράφων νουκλεϊκών αλληλουχιών (Espy, etal, 2006). Πέραν της ευαισθησίας της, η ποσοτική PCR χαρακτηρίζεται από ταχύτητα, επαναληψιμότητα, ακρίβεια, καθώς και περιορισμό των κινδύνων επιμόλυνσης, καθιστώντας τη πολύτιμο εργαλείο στη διαγνωστική προσέγγιση του μυκοπλάσματος, του ουρεοπλάσματος και των χλαμυδίων. Συγκρίνοντας τη με τις υπάρχουσες διαθέσιμες τεχνικές εργαστηριακής διάγνωσης σεξουαλικά μεταδιδόμενων λοιμώξεων, διαπιστώθηκε η απόλυτη ευαισθησία και η υψηλή ειδικότητά της έναντι των υπόλοιπων, τοποθετώντας τη στην πρώτη θέση των διαγνωστικών μεθοδολογιών ταυτόχρονης διάγνωσης πολλαπλών σεξουαλικά μεταδιδόμενων λοιμώξεων, παρά το υψηλότερο κόστος της (Choe, etal, 2013).

Συγκεκριμένα, η ποσοτική PCR δύναται να διαχωρίσει το *Ureaplasma* spp. στα δύο είδη του, αντικαθιστώντας την απλή PCR στη διάγνωση και αποτελώντας μία κατάλληλη εναλλακτική της καλλιέργειας (Xiao, etal, 2010). Δύναται βεβαίως να διαχωρίσει και το *Mycoplasma* spp, διαθέτοντας σημαντική ευαισθησία, παραμένοντας σταθερή και ανεπηρέαστη από εσωτερικές και εξωτερικές μεταβλητές (Pascual, etal, 2010).

Εν τέλει, η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου αποτελεί μοριακή δοκιμή ιδιαίτερα ευαίσθητη. Η εφαρμογή της στο κλινικό διαγνωστικό εργαστήριο καθίσταται αναγκαία, χωρίς ωστόσο την παράκαμψη των συμβατικών τεχνικών, μιας και ο συνδυασμός τους εγγυάται το βέλτιστο διαγνωστικό αποτέλεσμα.

5. Συμπεράσματα

5.1 Γενικά συμπεράσματα

Με τη χρήση πολλαπλών μεθόδων έρευνας που περιελάμβαναν PCR για το γονίδιο της ανθρώπινης β-σφαιρίνης, ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο και ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο για το γονίδιο 16S rRNA (16S rRNA qPCR), πραγματοποιήσαμε μια προοπτική μελέτη κοόρτης. Μελέτη με σκοπό τη διερεύνηση της παρουσίας μικροοργανισμών στο αμνιακό υγρό κατά τη διάρκεια του μέσου του δευτέρου τριμήνου των 114 εγκύων γυναικών, μετά από αμνιοπαρακέντηση, γυναικών με φυσιολογικό καρυότυπο και αρνητικό ιστορικό λοίμωξης του κόλπου και του τραχήλου.

Ειδικά η PCR για το γονίδιο της ανθρώπινης β-σφαιρίνης, λειτούργησε ως ιδανικός μάρτυρας για την μη ύπαρξη αναστολέων της PCR και την μη ύπαρξη περιορισμών στην επάρκεια των κυττάρων. Αναμφισβήτητη η υπεροχή της realtime PCR έναντι της απλής.

Η μελέτη με τις εξειδικευμένες μοριακές τεχνικές πραγματοποιήθηκε παράλληλα με τα αρνητικά δείγματα ελέγχου κολποτραχηλικού επιχρίσματος που προηγήθηκαν της αμνιοπαρακέντησης ενώ κατεγράφη η παρακολούθηση της εξέλιξης της κύησης. Στη μελέτη μας οι κυήσεις που κατέληξαν σε αυτόματο πρόωρο τοκετό ήταν δύο (2) από τις συνολικές 114 (μια με αυτόματο πρόωρο τοκετό και μία με πρόωρο τοκετό και προεκλαμψία) **όλες αρνητικές για μικροοργανισμούς στο αμνιακό υγρό κατά το δεύτερο τρίμηνο**. Επίσης αρνητικές για μικροοργανισμούς οι καλλιέργειες της πλακουντιακής και αμνιακής μεμβράνης.

5.2. Τελικό συμπέρασμα

Στην μελέτη μας, με ευαίσθητες μοριακές δοκιμασίες, **το αμνιακό υγρό** εγκύων γυναικών δευτέρου τριμήνου, σε ηλικία κύησης 15-22 εβδομάδων (οπότε κι έγινε αμνιοπαρακέντηση), βρέθηκε **στείρο** μικροοργανισμών κλινικής σημασίας, μετά από ανάλυση με ειδικές και ειδικότερα πρωτοποριακές μεθόδους εξαγωγής και απομόνωσης γονιδιώματος.

Περίληψη

Στόχος της μελέτης ήταν ο προσδιορισμός της συχνότητας της μικροβιακής εισβολής στην αμνιακή κοιλότητα σε ασθενείς που υποβλήθηκαν σε αμνιοπαρακέντηση λόγω κλινικών νδείξεων στο δεύτερο τρίμηνο της κύησης. Πραγματοποιήθηκε προοπτική διερεύνηση του αμνιακού υγρού 114 ασυμπτωματικών γυναικών για την παρουσία μικροβιακού DNA. Τα αμνιακά δείγματα ελήφθησαν κατά την αμνιοπαρακέντηση γενετικού ελέγχου από γυναίκες μεταξύ 15-22 εβδομάδων κύησης και ελέγχθηκαν ειδικά για την παρουσία *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma parvum*, *Ureaplasma urealyticum*, καθώς και για άλλα βακτήρια χρησιμοποιώντας PCR ευρείας κλίμακας. Οι εκβάσεις των κυήσεων μελετήθηκαν ανεξάρτητα από τα αποτελέσματα των μοριακών δοκιμών. Χρησιμοποιώντας κλασική και πραγματικού χρόνου PCR, ο επιπολασμός της μικροβιακής εισβολής στην αμνιακή κοιλότητα σε γυναίκες μεταξύ 15 και 22 εβδομάδων κύησης **ήταν 0%**. Πρόωρος τοκετός συνέβη μόνο σε δύο γυναίκες. Στη μία με πρόκληση και στη μία αυτόματα. Δε συσχετίστηκε με *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma parvum*, *Ureaplasma urealyticum*. Επιπλέον, η PCR δεν αποκάλυψε την παρουσία άλλων βακτηριακών μικροβίων. Εν τέλει, δεν ανιχνεύθηκε με μοριακές μεθόδους μικροβιακή εισβολή στην αμνιακή κοιλότητα εγκύων γυναικών χαμηλού κινδύνου κατά το δεύτερο τρίμηνο της κύησης.

Abstract

The study aims to determine the frequency of microbial invasion of the amniotic cavity in the midtrimester of pregnancy in patients undergoing amniocentesis for clinical indications. Prospective investigation of the amniotic fluid of 114 asymptomatic women recruited for the presence of microbial DNA was performed. Amniotic samples obtained at the time of amniocentesis for genetic testing on women between 15-22 weeks gestation were tested specifically for the presence of *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma parvum*, *Ureaplasma urealyticum*, as well as for other bacteria using broadrange PCR only. Pregnancy outcomes were reviewed independent of all molecular test results. Using real time PCR, the prevalence of microbial invasion of the amniotic cavity in women between 15 and 22 weeks of gestation was 0%. Early preterm delivery occurred in only two women; one delivered electively and one spontaneously. None were associated with *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma parvum*, *Ureaplasma urealyticum*. In addition, PCR did not reveal the presence of other bacterial microbes. Microbial invasion of the amniotic cavity in midtrimester gestations of low-risk pregnant women was not detected using molecular methods.

6. Βιβλιογραφία

1. Aagaard K, Ma J, Antony KM, Ganu R, Petrosino J, Versalovic J. The placenta harbors a unique microbiome. *Sci Transl Med.* 2014;6(237):237ra265.
2. Abele-Horn, M., Peters, J., Genzel-Boroviczeny, O., Wolff, C., Zimmermann, A., Gottschling, W.: Vaginal *Ureaplasma urealyticum* colonization: influence on pregnancy outcome and neonatal morbidity. *Infection* 1997, 25:286-291.
3. Andersen B, Olesen F., Screening for *Chlamydia trachomatis*, *BMJ*, 2012: 345: 4231.
4. Anderer M, A E Schindler A E, H M Liebich H M. Creatinine, urea and uric acid in amniotic fluid, maternal and umbilical cord blood at delivery. *ArchGynakol* 1975 Dec 16;220(1):65-72. doi: 10.1007/BF00673149.
5. Andrade_Rocha, F. T. *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* in men attending for routine semen analysis. Prevalence, incidence by age and clinical settings, influence on sperm characteristics, relationship with the leukocyte count and clinical value. *Urol. Int.* 2003, 71(4): 377-381.
6. Antony KM, Ma J, Mitchell KB, Racusin DA, Versalovic J, Aagaard K. The preterm placental microbiome varies in association with excess maternal gestational weight gain. *Am J Obstet Gynecol.* 2015;212(5):653 e651-616.
7. Atefeh Mousavi, Fariba Farhadifar, Reza Mirnejad, Rashid Ramazanzadeh, Detection of genital *Mycoplasmal* infections among infertile females by multiplex PCR, *Iran J Microbiol.*, 2014 Dec, 6(6): 398–403.
8. Baczynska A, Svenstrup HF, Fedder J, Birkelund S, Christiansen G. Development of real-time PCR for detection of *Mycoplasma hominis*. *BMC Microbiol.* 2004;4:35.

9. Baczynska Agata, Helle F Svenstrup, Jens Fedder, Svend Birkelund and Gunna Christiansen, Development of real-time PCR for detection of *Mycoplasma hominis*, *BMC Microbiol.*, 2004, 4: 35.
10. Baczynska, A., et al. Morphology of human Fallopian tubes after infection with *Mycoplasma genitalium* and *Mycoplasma hominis*—in vitro organ culture study, *Hum. Reprod.*, 2007, 22: 968–979.
11. Baka, S., Kouskouni, E., Antonopoulou, S., Sioutis, D., Papakonstantinou, M., Hassiakos, D., Logothetis, E., Liapis, A., Prevalence of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* in women with chronic urinary symptoms, 2009, *Urology*, 74(1): 62-66.
12. Baka, S., Tsirmpa, I., Tsouma, I., Logothetis, E., Kouskouni, E., Increased quinolone-resistant *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* isolated in reproductive-age women with vulvovaginitis, 22nd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID 2012), internet: http://registration.akm.ch/einsicht.php?XNABSTRACT_ID=142204&XNSPRACHE_ID=2&XNKONGRESS_ID=161&XNMASKEN_ID=900
13. Barnes R. C., Laboratory diagnosis of human Chlamydial infections, *Clin. Microbiol. Rev.*, 1989, 2:119-136.
14. Baud D., G. Greub, Intracellular bacteria and adverse pregnancy outcomes, *Clin Microbiol Infect*, 2011, 17: 1312-1322.
15. Bayramova F., Jacquier N., Greub G., Insight in the biology of Chlamydia-related bacteria., *Microbes Infect.*, 2018 Aug – Sep, 20 (7-8): 432-440.
16. Bébéar C. and Barbeyrac B., Genital Chlamydia trachomatis infections, *Clinic Microbiol Infect.*, 2009, 15(1): 4-10.
17. Bébéar, C. M., and I. Kempf. 2005. Antimicrobial therapy and antimicrobial resistance, p.535-568. A. Blanchard and G. F. Browning (ed.), *Mycoplasmas: pathogenesis, molecular biology, and emerging strategies for control*. Horizon Bioscience, Wymondham, United Kingdom.
18. Bébéar, C.M., Grau, O., Charron, A., Renaudin, H., Gruson, D., and Bébéar, C., Cloning and nucleotide sequence of the DNA gyrase (*gyrA*) gene from *Mycoplasma hominis* and characterization of quinolone-

- resistant mutants selected in vitro with trovafloxacin, *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000 Oct. 44(10): 2719-2727.
19. Bébéar, C.M., Renaudin, H., Bryskier, A., and Bébéar, C., Comparative Activities of Telithromycin (HMR 3647), Levofloxacin, and other antimicrobial agents against human Mycoplasmas, *Antimicrob. Ag. And Chemoth.*, July 2000, 1980-1982.
 20. Bissessor M, Tabrizi SN, Fairley CK, et al. Differing *Neisseria gonorrhoeae* bacterial loads in the pharynx and rectum in men who have sex with men: implications for gonococcal detection, transmission, and control. *J Clin Microbiol.* 2011;49(12):4304-4306.
 21. Black C.M., Current methods of laboratory diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections, *Clin Microbiol Rev.*, 1997, Jan,10(1):160-84.
 22. Blanchard A, Hentschel J, Duffy L, Baldus K, Cassell GH. Detection of *Ureaplasma urealyticum* by polymerase chain reaction in the urogenital tract of adults, in amniotic fluid, and in the respiratory tract of newborns. *Clin Infect Dis.* 1993;17 Suppl 1:S148-153.
 23. Breugelmans, M., Vancutsem, E., Naessens, A., Laubach, M., Foulon, W.: Association of abnormal vaginal flora and *Ureaplasma* species as risk factors for preterm birth: a cohort study. *Acta Obstet. Gynecol. Scand* 2010, 89:256-260.
 24. Carey AJ, Beagley KW., *Chlamydia trachomatis*, a hidden epidemic: effects on female reproduction and options for treatment, *Am J Reprod Immunol.*, 2010, 63(6): 576-86.
 25. Cassell, G. H., Waites, K. B., Watson, H. L., Crouse, D. T., Harasawa, R. *Ureaplasma urealyticum* Intrauterine Infection: Role in Prematurity and Disease in Newborns. 1993, *Clin. Micr. Rev.* 6(1): 69-87.
 26. Catherine L Haggerty & Roberta B Ness, Epidemiology, pathogenesis and treatment of pelvic inflammatory disease, 2014, 235-247.
 27. Chernesky M.A., Mahoney J.B., Castriciano S., Mores M., Stewart I.O., Landis S.F., Seidelman W., Sargeant E.J., Leman C., Detection of *Chlamydia trachomatis* antigens by enzyme immunoassay and immunofluorescence in genital specimens from symptomatic and asymptomatic men and women, *J. Infect. Dis.*, 1986,154: 1 41-148.

28. Choe, H. S., Lee, D. S., Lee, S. J., Hong, S. H., Park, D. C., Lee, M. K., Kim, T. H., Cho, Y. H., Performance of Anyplex™ II multiplex real-time PCR for the diagnosis of seven sexually transmitted infections: comparison with currently available methods. 2013, *Int. J. Infect. Dis.* 17(12): 1134-1140.
29. Chow JM, Bauer HM., What data are really needed to evaluate the population impact of chlamydia screening programs? *Sex Transm Dis*, 2016, 43: 9–11.
30. Christiansen, G., Jensen, L.T., Boesen, T., Emmersen, J., Ladefoged, S.A., Schiøtz, L.K., Birkelund, S.: Molecular biology of Mycoplasma. *Wien KlinWochenschr* 1997, 109:557-561.
31. Chu D SC, Seferovic M, Suter M, Cox J, Vidaeff A, Aagaard K. Profiling of microbiota in second trimester amniotic fluid reveals a distinctive community present in the mid trimester and predictive of the placental microbiome at parturition. Supplementary S1-S560 presented at 37th Annual Meeting of the Society for Maternal Fetal Medicine: The Pregnancy Meeting; 2017; Las Vegas, Nevada.
32. Cohen, C.R., Manhart, L.E., Bukusi, E.A., Astete, S., Brunham, R.C., Association between Mycoplasma genitalium and acute endometritis. *Lancet* 2002. 359: 765–766.
33. Cristiane Netto, Vanete Thomaz Soccol, Lya Sepulveda, Gabriel Henrique Oliveira Garcia and Jorge Timenetsky, Quality Control of Biotechnological Inputs Detecting Mycoplasma, *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 2015, 58 (2): 239-243.
34. Deguchi, T., Maeda, S., Mycoplasma genitalium: another important pathogen of non-gonococcal urethritis. *J Urol*, 2002, 167:1210-1217.
35. Deguchi, T., Yoshida, T., Miyazawa, T. Yasuda, M., Tamaki, M., Ishiko, H., Maeda, S. Association of Ureaplasma urealyticum (biovar 2) with nongonococcal urethritis. *Sex. Transm. Dis.* 2004, 31(3): 192-195.
36. Elwell C., Mirrashidi K., Engel J., Chlamydia cell biology and pathogenesis, *Nat Rev Microbiol.*, 2016, Jun 14(6): 385-400.
37. Espy, M.J., Uhl, J.R., Sloan, L.M., Buckwalter, S.P., 2006. Real-time PCR in Clinical Microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin. Microbiol. Rev.* 19(1): 165-256.

38. Fagundo, R., Sanchez, A., Jauregui, J., Comportamiento antimicrobiano de aislamientos clínicos de *Mycoplasma hominis* y *Ureaplasma urealyticum* así como la evolución de su Resistencia en un periodo de cinco años, 2006, *Labciencia*, 14(2): 75-79.
39. Fenkci, V., Yilmazer, M., Aktepe, O. Have *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* infections any significant effect on female fertility? *Le Infezioni in Medicina*, 2002, 9(5): 965-976.
40. Foulon W., Naessens A., Dewaele M., Lauwers S., Amy J.J.: Chronic *Ureaplasma urealyticum* amnionitis associated with abruption placentae. *ObstetGynecol* 1986, 68:280-282.
41. Gerber S, Vial Y, Hohlfeld P, Witkin SS. Detection of *Ureaplasma urealyticum* in second-trimester amniotic fluid by polymerase chain reaction correlates with subsequent preterm labor and delivery. *J Infect Dis.* 2003;187(3):518-521.
42. Gerovassili A., Marcandona O., Asimakopoulos B., Karavasilis V., Panopoulou M., Ikonomidis A., Relationship between Chlamydia-Ureaplasma-Mycoplasma genital detection with semen concentration and motility among greek men, *Int. J. Fertil. Steril.*, 2017, 11(2): 130-133.
43. Gervasi MT, Romero R, Bracalente G, et al. Midtrimester amniotic fluid concentrations of interleukin-6 and interferon-gamma-inducible protein-10: evidence for heterogeneity of intra-amniotic inflammation and associations with spontaneous early (<32 weeks) and late (>32 weeks) preterm delivery. *J Perinat Med.* 2012;40(4):329-343.
44. Global incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted infections – 2008. www.who.int/gho/sti/statistical_reports/en/
45. Goldenberg RL, Hauth JC, Andrews WW. Intrauterine infection and preterm delivery. *N Engl J Med.* 2000;342(20):1500-1507.
46. Gottlieb S.L., Xu F., Brunham R.C., Screening and treating Chlamydia trachomatis genital infection to prevent pelvic inflammatory disease: interpretation of findings from randomized controlled trials, *Sex Transm Dis.*, 2013, 40(2): 97–102.

47. Gratton, C. A., R. Lim-Fong, E. Prasad, and P. C. Kibsey, Comparison of a DNA probe with culture for detecting *Chlamydia trachomatis* directly from genital specimens, *Mol. Cell. Probes*, 1990, 4: 25-31.
48. Gray DJ, Robinson HB, Malone J, Thomson RB, Jr. Adverse outcome in pregnancy following amniotic fluid isolation of *Ureaplasmaurealyticum*. *Prenat Diagn.* 1992;12(2):111-117.
49. Gregoriou, O., Botsis, D., Papadias, K., Kassanos, D., Liapis, A., Zourlas, P. A. Culture of seminal fluid in infertile men and relationship to semen evaluation. *Int. Gynaecol. Odstet.*, 1989, 28(2): 149-153.
50. Grenabo, L., Hedelin, H., Pettersson, S., Urinary infection stones caused by *Ureaplasmaurealyticum*: a review. *Scand J. Infect. Dis.*, 1988, 53: 46-49.
51. Haggerty C.L., Gottlieb S.L., Taylor B.D., Low N, Xu F., Ness R.B., Risk of sequelae after *Chlamydia trachomatis* genital infection in women, *J Infect Dis.*, 2014, 201(2): S134–155.
52. Haggerty C.L., Totten PA, Astete SG, Lee S, Hoferka SL, et al., 2008, Failure of cefoxitin and doxycycline to eradicate endometrial *Mycoplasma genitalium* and the consequence for clinical cure of pelvic inflammatory disease, *Sex. Transm. Infect.*, 84: 338–342.
53. Halberstaedter L. and von Powazek, S. Zur Aetiologies, *Trachoms*, *Deutsch Med Wschr.*, 1907, 1285-1287.
54. Hannan, P. C. T. 1998. Comparative susceptibilities of various AIDS associated and human genital tract *Mycoplasmas* and strains of *Mycoplasma pneumoniae* to 10 classes of antimicrobial agent in vitro, *J. Med. Microbiol.*, 47:1115–1122.
55. Harasawa R., Kanamoto Y., Differentiation of two biovars of *Ureaplasmaurealyticum* based on the 16S-23S rRNA intergenic spacer region, *J Clin. Microbiol.*, 1999, 37(12): 4135–4138.
56. Horner, P., et al. 2003. Antibodies to *Chlamydia trachomatis* heat-shock protein 60 kDa and detection of *Mycoplasma genitalium* and *Ureaplasmaurealyticum* are associated independently with chronic nongonococcal urethritis. *Sex. Transm. Dis.* 30: 129-133.
57. Horner, P.J., B. Thomas, C.B. Gilroy, M. Egger, and D. Taylor-Robinson., Do all men attending departments of genitourinary medicine

- need to be screen for non-gonococcal urethritis? *Int.J. STD AIDS*, 2002, 13: 667-673.
58. Horner, P.J., C.B. Gilroy, B.J. Thomas, R.O. Naidoo, and D. Taylor-Robinson. 1993. Association of *Mycoplasma genitalium* with acute non-gonococcal urethritis, *Lancet*, 342: 582-585.
59. Huard, R., C., Luiz Claudio de Oliveira Lazzrini, Butler, W., R., Dick van Soolingen, Ho, J., L., PCR-Based Method To Differentiate the Subspecies of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex on the Basis of Genomic Deletions, *J Clin Microbiol.*, 2003, April, 41(4): 1637–1650.
60. Imudia, A. N., Detti, L., Puscheck, E. E., Yelian, F D., Diamond, M P., The prevalence of *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*, *Chlamydia trachomatis* and *neisseria gonorrhoeae* infections, and the rubella status of patients undergoing an initial infertility evaluation, *J. Assist. Reprod. Genet.*, 2008, 25(1): 43-46.
61. Jeffrey, K.J. Denny and A. C. Morris. 2023. Differentiating infection, colonisation, and sterile inflammation in critical illness: the emerging role of host-response profiling, *Intensive Care Medicine* 49(17)
62. Jensen, J.S., H.T. Hansen, and K. Lind. 1996. Isolation of *Mycoplasma genitalium* strains from the male urethra, *J. Clin. Microbiol.*, 34: 286-291.
63. Jensen, J.S., R. Orsum, B. Dohn, S. Uldum, A.M. Worm, and K Lind., *Mycoplasma genitalium*: a cause of male urethritis? *Genitourin. Med.*, 1993, 69: 265-269.
64. Joanna Lewis, Malcolm J. Price, Paddy J. Horner, and Peter J. White, Genital *Chlamydia trachomatis* Infections Clear More Slowly in Men Than Women, but Are Less Likely to Become Established. *The Journal of Infectious Diseases*, 2017, 216: 237–44.
65. Joshi N.J., Miller D., Doxycycline revisited, *Arch. Intern. Med.*, 1997, 157: 1421–1428.
66. Kanakas N., Mantzavinos T., Boufidou F., Koumentakou I., Creatsas G., *Ureaplasma urealyticum* in semen: is there any effect on in vitro fertilization outcome? *Fertil Steril.*, 1999, Mar 71(3): 523-7.
67. Karabay, O., Topcuoglu, A., Kocoglu, E., Gurel, S., Gurel, H., Ince, N. K., Prevalence and antibiotic susceptibility of genital *Mycoplasma*

hominis and *Ureaplasmaurealyticum* in a university hospital in Turkey, 2006, 33(1): 36-38.

68. Kechagia, N., Bersimis, S., Chatzipanagiotou, S., Incidence and antimicrobial susceptibilities of genital Mycoplasmas in outpatients women with clinical vaginitis in Athens, Greece., *J. antimicrob. Chemother.*, 2008, 62(1): 122-125.
69. Kenny, G. E., and F. D. Cartwright, Effect of pH, inoculum size and incubation time on the susceptibility of *Ureaplasmaurealyticum* to erythromycin in vitro, *Clin. Infect. Dis.*, 1993, 17(1): 215–218.
70. Kenny, G.E., and Cartwright F.D., Susceptibilities of *Mycoplasma hominis*, *M. pneumoniae*, and *Ureaplasmaurealyticum* to GAR-936, Dalbapristin, Dirithromycin, Evernimicin, Gatifloxacin, Linezolid, Moxifloxacin, Quinupristin- Dalbapristin, and Telithromycin Compared to Their Susceptibilities to Reference Macrolides, Tetracyclines, and Quinolones, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2001, 2604-2608.
71. Kong F, James G, Ma Z, Gordon S, Bin W, Gilbert GL: Phylogenetic analysis of *Ureaplasmaurealyticum*—support for the establishment of a new species, *Ureaplasma parvum*, *Int J Syst Bacteriol*, 1999, 49(4): 1879–1889.
72. Kong F, Ma Z, James G, Gordon S, Gilbert GL: Molecular genotyping of human *Ureaplasma* species based on multiple-banded antigen (MBA) gene sequences, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2000, 50(5): 1921–1929.
73. Kong F, Ma Z, James G, Gordon S, Gilbert GL: Species identification and subtyping of *Ureaplasma parvum* and *Ureaplasmaurealyticum* using PCR-based assays, *J. Clin. Microbiol.*, 2000, 38(3): 1175–1179.
74. Kotrotsiou, Tz., Exindari, M., Diza, E., Gioula, G., Melidou, A., Kaplanis, K., Malisiovas, N., Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Ureaplasmaurealyticum* in asymptomatic women in Northern Greece, *Hippokratia*, 2013, 17(4): 319-321.

75. Kotrotsiou, Tz., Exindari, M., Ureaplasma Urealyticum: so common but so disregarded microorganism, J. Hellenic microbiol. Society, 55(4): 295-303.
76. Ladefoged, S. A. and G. Christiansen. Physical and genetic mapping of the genomes of five Mycoplasma hominis strains by pulsed-field gel electrophoresis, J. Bacteriol. 1992, 174(7): 2199.
77. Ladefoged, S. A., Birkelund, S., Hauge, S., Brock, B., Jensen, L. T. & Christiansen, G., A 135-kilodalton surface antigen of Mycoplasma hominis PG21 contains multiple directed repeated sequences. Infect Immun., 1995, 63: 212-223.
78. Ladefoged, S.A. Jensen, L.T., Brock, B., Bikerlund, S. & Christiansen, G. Analysis of 05-kilobase-pair repeats in the Mycoplasma hominis Imp gene system and identification of gene products., J. Bacteriol., 1996, 178: 2775-2784.
79. Lamont R.F., Taylor-Robinson D., Wigglesworth J.S., Furr P.M., Evans R.T., Elder M.G.: The role of Mycoplasmas, Ureaplasmas and Chlamydiae in the genital tract of women presenting in spontaneous early preterm labour. J. Med. Microbiol., 1987, 24: 253-257.
80. Land J.A., van Bergen JEAM, Morr  S.A., Postma M.J.: Epidemiology of Chlamydia trachomatis infection in women and the cost-effectiveness of screening. Hum Reprod Update, 2010, 16: 189-204.
81. Larsen B, Hwang J. Mycoplasma, Ureaplasma, and adverse pregnancy outcomes: a fresh look. Infect Dis Obstet Gynecol. 2010; Article ID 521921.
82. Lefebvre, J., H. Laperriere, H. Rousseau, R. Masse, Comparison of three techniques for detection of Chlamydia trachomatis in endocervical specimens from asymptomatic women, J. Clin. Microbiol., 1998, 26: 726-731.
83. Levidiotou S., Vrioni G., Papadogeorgaki H., Avdeliodi K., Kada H., Kaparos G., Kouskouni E., Fragouli E., Legakis N.J., Chlamydia trachomatis infections in Greece: first prevalence study using nucleic acid amplification tests, Eur J Clin Microbiol Infect Dis., 2005, Mar 24(3): 207-13.

84. Liechti G.W., E. Kuru, E. Hall, A. Kalinda, Y.V. Brun, M. VanNieuwenhze,, et al, A new metabolic cell-wall labelling method reveals peptidoglycan in *Chlamydia trachomatis*, *Nature*, 2014, 506: 507-510.
85. Loeffler J, Henke N, Hebart H, et al. Quantification of fungal DNA by using fluorescence resonance energy transfer and the light cyclor system. *J Clin Microbiol.* 2000;38(2):586-590.
86. Madar H., Brun S., Coatleven F., Chabanier P., Gomer H., Nithart A., Coustel M.A. , Merlot B. , Horovitz J., Dallay D. Mahieu-Caputo† D, Sentilhes L. Fisiología y regulación del Líquido Amniótico. *EMC-Ginecología-Obstetricia.* 2016;52(4):1–10.
87. Manavi K.: A review on infection with *Chlamydia trachomatis*, *Best Pract Res Clin ObstetGynaecol.*, 2006, 20: 941-951.
88. Maniloff, J., and H. J. Morowitz. Cell biology of the Mycoplasmas, *Bacteriol. Rev.*, 1972, 36: 263-290.
89. Mardh P A, Westrom L. Tubal and cervical cultures in acute salpingitis with special reference to *Mycoplasma hominis* and T -strain Mycoplasmas. *Br J Vener Dis*, 1970, 46: 179-86.
90. McCormack W and Rein M.F. Urethritis. In *Principles and Practice of Infectious Diseases.* Mandell, G. L., Bennet, G E., Dolin, R., Churchill Livindstone, New York, 2000, 1208-1217.
91. Mestrovic T., Ljubin-Sternak S. Molecular mechanisms of *Chlamydia trachomatis* resistance to antimicrobial drugs, *Front Biosci. (Landmark Ed).*, 2018 Jan 1(23): 656-670.
92. Miller BR, Taylor-Robinson D, Furr PM, Toft B, Allen J. Serological evidence that *Chlamydiae* and *Mycoplasmas* are involved in infertility of women. *J ReprodFertil*, 1985, 73: 237-40.
93. Mishori R, McClaskey EL, WinklerPrins VJ., *Chlamydia trachomatis* infections: screening, diagnosis and management, *Am Fam Physician.*, 2012, 86(12): 1127–32.
94. Morowitz, H. J., and D. C. Wallace. Genome size and life cycle of the *Mycoplasma*. *Ann N.Y. Acad. Sci.*, 1973, 225: 62-73.
95. Mullis K.B. 1990. The unusual origin of polymerase chain reaction. *Sci. Am.* 262: 56-65.

96. Mullis, K. B., and F. A. Faloon. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.*, 1987, 55: 335–350.
97. Munday, P., Furr, P., Taylor-Robinson, D., The prevalence of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* in the cervix and anal canal of women. *J. Infect.*, 1981, 253-257.
98. Mylonas I., Female genital *Chlamydia trachomatis* infection: Where are we heading? *Arch. Gynecol. Obstet.*, 2012, 285: 1271–85.
99. Naessens A., Foulon W., Cammu H., Goossens A., Lauwers S.: Epidemiology and pathogenesis of *Ureaplasma urealyticum* in spontaneous abortion and early preterm labor. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.*, 1987, 66:513-516.
100. Nguyen DP, GS, Hohlfeld P, Sandrine G, Witkin SS. *Mycoplasma hominis* in midtrimester amniotic fluid: relation to pregnancy outcome. *J Perinat Med.* 2004;32:323-326.
101. Nikkari S, Lopez FA, Lepp PW, et al. Broad-range bacterial detection and the analysis of unexplained death and critical illness. *Emerg Infect Dis.* 2002;8(2):188-194.
102. Nye M.B., Osiecki J., Lewinski M, Liesenfeld O., Young S., Taylor S.N., Lillis R.A., Body B.A., Eisenhut C., Hook III E.W., Van Der Pol B., Detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* with the cobas CT/NG v2.0 test: performance compared with the BD ProbeTec CT Qx and GC Qx amplified DNA and Aptima AC2 assays., *Sex Transm Infect.*, 2019, Mar 95(2): 87-93.
103. Nyvold, C., Birkelund, S. & Christiansen, G. The *Mycoplasma hominis* P120 membrane protein contains a 216 amino acid hypervariable domain that is recognized by the human immune response. *Microbiology*, 1997, 143: 675-688.
104. Paavonen J., *Chlamydia trachomatis* infections of the female genital tract: state of the art, *Ann Med.*, 2012, 44(1): 18-28.
105. Pereyre, S. P. Gonzalez, B. de Barbeyrac, A. Darnige, H. Renaudin, A., Charron, S. Raheison, C. Bebear, and C. M. Bebear, Mutations in 23S rRNA Account for Intrinsic Resistance to Macrolides in *Mycoplasma hominis* and *Mycoplasma fermentans* and for Acquired

- Resistance to Macrolides in *M. hominis*, *Antimicrob. Ag. And Chemoth.*, Oct. 2002, 3142-3150.
106. Perni SC VS, Korneeva I, Tuttle SL, Paraskevas LR, Chasen ST, Kalish RB, Witkin SS. *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasmaurealyticum* in midtrimester amniotic fluid: association with amniotic fluid cytokine levels and pregnancy outcome. *Am J Obstet Gynecol.* 2004;191(4):1382-1386.
 107. Pickering, W. J., Birch, D F., Kincaid-Smith, P. Biochemical and histologic findings in experimental pyelonephritis due to *Ureaplasmaurealyticum*. *Infect. Immun.* 1990, 58(10): 3401-3406.
 108. Poonam Sachdeva, Achchhe Lal Patel, Divya Sachdev, Mashook Ali, Aruna Mittal and Daman Saluja, Comparison of an in-house PCR assay, direct fluorescence assay and the Roche AMPLICOR *Chlamydia trachomatis* kit for detection of *C. trachomatis*, *Journal of Medical Microbiology*, 2009, 58: 867–873.
 109. Price MJ, Ades A, Soldan K, et al. The natural history of *Chlamydia trachomatis* infection in women: a multi-parameter evidence synthesis, *Health Technol Assess*, 2016, 20:22.
 110. Prince AL, Chu DM, Seferovic MD, Antony KM, Ma J, Aagaard KM. The perinatal microbiome and pregnancy: moving beyond the vaginal microbiome. *Cold Spring HarbPerspect Med.* 2015;5(6).
 111. Public Health England. Opportunistic chlamydia screening of young adults in England: an evidence summary. London: Public Health England, 2014.
 112. Rahimkhani M., Mordadi A., Gilanpour M., Detection of urinary *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium* and human papilloma virus in the first trimester of pregnancy by PCR method, *Ann Clin Microbiol Antimicrob.*, 2018 Jun 17(1): 25.
 113. Ramirez, C., Casanova, G., Menoca, G., Ortiz, F., Ahued, R., Prevalencia de la infeccioncervico-vaginal por *Mycoplasma hominis* y *Ureaplasmaurealyticum* enpacientesginecologicas del Instituto Nacional de Perinatologia. *Enf. Inf. Microbiol.*, 2004, 24(1): 107-111.
 114. Razin, S. The *Mycoplasmas*. *Microbiological Reviews*, 1978, 42: 414-470.

115. Razin, S., Yogen, D., Naot, Y., Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1998, 1094-1156.
116. Rivera, J. A., Cedillo, M. L., Vega, M., Micoplasmas y su importancia medica. *Rev. Biomed*, 2001, 12(4): 262-271.
117. Rivera, J. A., Centeno, M., Santellan, O. M., Rodriguez, N. M., Prevalencia de Ureaplasma urealyticum en mujeres. *Rev. Mex. Pato. Clin.*, 2004, 51(1): 33-36.
118. Roberts, M. C., and G. E. Kenny. Dissemination of the tetM tetracycline resistance determinant to Ureaplasma urealyticum. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1986, 29: 350–352.
119. Robertson JA, Stemke GW: Expanded serotyping scheme for Ureaplasma urealyticum strains isolated from humans. *J Clin Microbiol*, 1982, 15(5): 873–878.
120. Rodriguez N, Fernandez C, Zamora Y, Berdasquera D, Rivera JA. Detection of Ureaplasma urealyticum and Ureaplasma parvum in amniotic fluid: association with pregnancy outcomes. *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society o.* 2011;24(1):47-50.
121. Romero R, Gomez R, Chaiworapongsa T, Conoscenti G, Kim JC, Kim YM. The role of infection in preterm labour and delivery. *Paediatr Perinat Epidemiol.* 2001;15 Suppl 2:41-56.
122. Romero R, Miranda J, Chaemsaihong P, et al. Sterile and microbial-associated intraamniotic inflammation in preterm prelabor rupture of membranes. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2015;28(12):1394-1409.
123. Romero R, Miranda J, Chaiworapongsa T, et al. A novel molecular microbiologic technique for the rapid diagnosis of microbial invasion of the amniotic cavity and intra-amniotic infection in preterm labor with intact membranes. *American journal of reproductive immunology.* 2014;71(4):330-358.
124. Romero R, Miranda J, Chaiworapongsa T, et al. Prevalence and clinical significance of sterile intra-amniotic inflammation in patients

- with preterm labor and intact membranes. *American journal of reproductive immunology*. 2014;72(5):458-474.
125. Rosenstein IJ, Morgan DJ, Sheehan M, Lamont RF, Taylor-Robinson D. Bacterial vaginosis in pregnancy: distribution of bacterial species in different gram-stain categories of the vaginal flora. *J Med Microbiol*, 1996, 45: 120-126.
 126. Saada, A. B., Y. Terespolski, A. Adoni, and I. Kahane. Adherence of *Ureaplasma urealyticum* to human erythrocytes. *Infect. Immun.*, 1991, 59: 467–469.
 127. Sadler TW. *Langman's medical embryology*. 13th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health; 2015.
 128. Saiki, R. K., S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich, and N. Arnheim. Enzymatic amplification of b-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 1985, 230: 1350–1354.
 129. Saikku P. Chlamydia. In: Cohen, J. *Infectious Diseases*, 2nd ed. Orlando, Florida, USA, Mosby, 2003.
 130. Sexually Transmitted Diseases Surveillance, 2012. www.cdc.gov/std/stats12/defaultl.htm
 131. Shepard MC, Lunceford CD, Differential agar medium (A7) for identification of *Ureaplasma urealyticum* (Human T Mycoplasmas) in primary cultures of clinical material. *J. Clin. Microbiol.*, 1976, 3: 613-625.
 132. Shepard MC, Lunceford CD, Ford DK, Purcell RH, Taylor-Robinson D, Razin S, Black FT: *Ureaplasma urealyticum* gen. nov. sp. nov.: proposed nomenclature for the human T 7 (T-strain) Mycoplasmas. *Int J Syst Bacteriol*, 1974, 24:160–171.
 133. Shepard MC: The recovery of pleuropneumonia-like organisms from Negro men with and without nongonococcal urethritis. *Am J Syph Gonorr Dis*, 1954, 38:113-124.
 134. Smith, D. G., W. C. Russell, and D. Thirkell. Adherence of *Ureaplasma urealyticum* to human epithelial cells. *Microbiology*, 1994, 140:2893–2898.

135. Soper D.E., Pelvic inflammatory disease, *Obstet Gynecol.*, 2010, 116(2 Pt 1): 419–28.
136. Sung Taek Park, Suk Woo Lee, Min Jeong Kim, Young Mo Kang, Hye Min Moon & Chae Chun Rhim, Clinical characteristics of genital chlamydia infection in pelvic inflammatory disease, *BMC Women's Health*, 2017, 17(5).
137. Svenstrup HF, Fedder J, Kristoffersen SE, Trolle B, Birkelund S, et al. Mycoplasma genitalium, Chlamydia trachomatis, and tubal factor infertility—a prospective study. *FertilSteril*, 2008, 90: 513–520.
138. Tabrizi SN, Chen S, Cohenford MA, et al. Evaluation of real time polymerase chain reaction assays for confirmation of Neisseria gonorrhoeae in clinical samples tested positive in the Roche Cobas Amplicor assay. *Sex Transm Infect.* 2004;80(1):68-71.
139. Takahashi, S., Takeyama, K., Miyamoto, S., Ichihara, K., Maeda, T., Kunishima, Y., et al, Detection of Mycoplasma genitalium, Mycoplasma hominis, Ureaplasma urealyticum and Ureaplasma parvum DNAs in urine from asymptomatic healthy young Japanese men. *J. Infect. Chemother.*, 2006, 12(5): 269-271.
140. Tang FF, Chang HL, Huang YT, Wang KC. Studies on the etiology of trachoma with special reference to isolation of the virus in chick embryo. *Chin Med J* 1957; 75, 429-447.
141. Taylor-Robinson D, Furr PM: Update on sexually transmitted Mycoplasmas. *Lancet*, 1998, 351(3): 12-15.
142. Taylor-Robinson D, Lamont RF. Mycoplasmas in pregnancy. *BJOG*. 2010;118(2):164-174.
143. Taylor-Robinson, D., Jensen, J. S., Svenstrup, H., Stacey, C. M., Difficulties experienced in defining the microbial cause of pelvic inflammatory disease. 2012, *Int. J. STD AIDS*, 23(1): 18-24.
144. Taylor-Robinson, D., McCormack, W.M., The genital Mycoplasmas. *N Engl Med*, 1980, 302: 1003-1010.
145. Teng K, Li M, Yu W, Li H, Shen D, Liu D: Comparison of PCR with culture for detection of Ureaplasma urealyticum in clinical samples from patients with urogenital infections. *J Clin Microbiol*, 1994, 32(9): 2232–2234.

146. Thomsen AC. Mycoplasmas in human pyelonephritis: demonstration of antibodies in serum and urine. *J Clin Microbiol.*,1978, 8: 197-202.
147. Todd WJ, Caldwell HD, The interaction of *Chlamydia trachomatis* with host cells ultrastructural studies of the mechanism of release of a biovar II strain from HeLa 229 cells, *J Infect Dis*, 1985, 151: 1037-1044.
148. Tully, J.G., Taylor-Robins, D., Rose, L., Cole, R.M., Boye, J.M., *Mycoplasma genitalium*, a new species from the human urogenital tract. *Int Syst Bacteriol*, 1983, 33: 387-396.
149. Tully, J.G., Taylor-Robinson, D., Cole, R.M., Rose, D.L.: A newly discovered *Mycoplasma* in the human urogenital tract. *Lancet*, 1981, 1288-1291.
150. Twin J, Taylor N, Garland SM, et al. Comparison of two *Mycoplasma genitalium*realtime PCR detection methodologies. *J Clin Microbiol*. 2011;49(3):1140-1142.
151. van den Broek I.V., van Bergen J.E., Brouwers E.E., et al, Effectiveness of yearly, register based screening for chlamydia in the Netherlands: controlled trial with randomised stepped wedge implementation, *BMJ*, 2012, 354: 4316.
152. Waites, K. B., Katz, B., Schelonka, R. L., *Mycoplasmas and Ureaplasmas as Neonatal Pathogens*, *Clin. Microb. Rev.*, 2005, 757–789.
153. Waites, K. B., Rikihisu, Y., Tylor-Robinson, D. J., *Mycoplasmas and obligate intracellular bacteria*, Murray P R., Jo Baron, E., Jorgensen, J H., Phaller, M. A., Yolken, R. H., *Manual of Clinical Microbiology*, 8th Edition, vol. 1, ASM Press Washington DC, 2003, 972-990.
154. Woodhall SC, Soldan K, Sonnenberg P,, et al, Is chlamydia screening and testing in Britain reaching young adults at risk of infection? Findings from the third National Survey of Sexual Attitudes and Lifestyles (Natsal-3), *Sex Transm Infect*, 2016, 92: 218–27.
155. Workowski K.A., Berman S.M., *Sexually transmitted diseases treatment guidelines*, *MMWR Recomm Rep*. 2006, 55(11): 1–94.

156. World Health Organ. 2012. Global Incidence and Prevalence of Selected Curable Sexually Transmitted Infections—2008. Geneva: World Health Inst.
157. Xiao L, Glass JI, Paralanov V, Yooseph S, Cassell GH, Duffy LB, Waites KB, Detection and characterization of human *Ureaplasma* species and serovars by real-time PCR. *J Clin Microbiol*, 2010, 48(8): 2715–2723.
158. Yoon B.H., Romero R., Park J.S., Chang J.W., Kim Y.A., Kim J.C., Kim K.S.: Microbial invasion of the amniotic cavity with *Ureaplasmaurealyticum* is associated with a robust host response in fetal, amniotic, and maternal compartments. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1998, 179: 1254-1260.
159. Yoon BH, Romero R, Lim JH, et al. The clinical significance of detecting *Ureaplasmaurealyticum* by the polymerase chain reaction in the amniotic fluid of patients with preterm labor. *Am J Obstet Gynecol*. 2003;189(4):919-924.
160. Yoshida T, Deguchi T, Ito M, Maeda S, Tamaki M, Ishiko H. Quantitative detection of *Mycoplasma genitalium* from first-pass urine of men with urethritis and asymptomatic men by real-time PCR. *J Clin Microbiol*. 2002;40(4):1451-1455.
161. Yoshida, T., Maeda, S., Deguchi, T., Ishiko, H., Phylogeny-based rapid identification of *Mycoplasma* and *Ureaplasma* from urethritis patients. *J. Clin. Microb.*, 2002, 105-110.
162. Zhang, Q. & Wise, K. 5. (1996). Molecular basis of size and antigenic variation of a *Mycoplasma hominis* adhesin encoded by divergent *vaa* genes. *Infect Immun*, 64, 2737-2744.
163. Zheng X, Teng LJ, Watson HL, Glass JI, Blanchard A, Cassell GH: Small repeating units within the *Ureaplasmaurealyticum* MB antigen gene encode serovar specificity and are associated with antigen size variation. *Infect Immun*, 1995, 63(3): 891–898.
164. Zuo, C. X., Huang, J. H., Chen, J., Lu, J. Y., Xiang, Y. P., Female urogenital *Mycoplasma* infection nad drug sensitivity statuw in Changsha. *NanFangYiKeDaXueXueBao*, 2006, 26(6): 831-836.

165. Αρσένη Α., Κλινική μικροβιολογία και εργαστηριακή διάγνωση λοιμώξεων, 1994, τόμος 2, 4η έκδοση, εκδόσεις ΖΗΤΑ.
166. Πόγγας Ν., Χαρβάλου Α., Ιατρική Μικροβιολογία, εκδόσεις Οδυσσέας, Αθήνα, 2011 (ISBN 978-960-210-577-1)
167. Φωκάς Σπ., Φωκάς Στ., Μαρκάτου Φ., Κλινική Μικροβιολογία, Τόμος 1, Αθήνα, 2003.

