



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ - ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΑΝΕΣΤΗΣ Κ. ΜΑΥΡΙΑΔΗΣ

ΑΝΑΖΗΤΗΣΗ CHLAMYDIA TRACHOMATIS ΣΕ ΚΛΙΝΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ
ΑΠΟ ΤΟ ΟΥΡΟΠΟΙΟΓΕΝΝΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΚΑΙ ΤΟΥΣ
ΟΦΘΑΛΜΟΥΣ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ

ΝΙΚΟΛΕΤΑ Κ. ΧΗΤΑ
ΙΑΤΡΟΣ ΒΙΟΠΑΘΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2006



«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα».

N.5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού τμήματος).



Ημερομηνία αίτησης της κ. Χήτα Νικολέτας: 7-4-1999

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 330^α/12-10-1999

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπουσα

Λεβειδιώτου -Στεφάνου Σταματίνα Επίκουρος Καθηγήτρια Μικροβιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Λώλης Δημήτριος Καθηγητής Μαιευτικής -Γυναικολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ψύλλας Κωνσταντίνος Καθηγητής Οφθαλμολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 29-11-1999

ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 588^α/25-7-2006

Ανδρονίκου Στυλιανή	Καθηγήτρια Νεογνολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Μαυρίδης Ανέστης	Καθηγητής Μικροβιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Παρασκευαΐδης Ευάγγελος	Καθηγητής Μαιευτικής Γυναικολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Καλογερόπουλος Χρήστος	Αναπληρωτής Καθηγητής Οφθαλμολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Λεβειδιώτου- Στεφάνου Σταματίνα	Επίκουρος Καθηγήτρια Μικροβιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Μπασιούκας Κωνσταντίνος	Επίκουρος Καθηγητής Δερματολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Βρυώνη Γεωργία	Λέκτορα Μικροβιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 15-11-2006

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ

Επαμεινώνδας Τσιάνος

Καθηγητής Παθολογίας



Η Γραμματέας της Σχολής

ΕΛΙΑ ΤΣΑΓΓΑΛΑ



στο Γιώργο,
στην Πένυ,
στην Άρτεμις



ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Οι λοιμώξεις από *Chlamydia trachomatis* αποτελούν ένα σημαντικό πρόβλημα της δημόσιας υγείας καθώς αποτελούν την πιο συχνή, σεξουαλικά μεταδιδόμενη λοίμωξη, παγκοσμίως (WHO, 2001). Εκτιμάται ότι 92 εκατομμύρια νέα περιστατικά εμφανίζονται, κάθε χρόνο, παγκοσμίως. Στις ΗΠΑ, υπολογίζεται ότι κάθε χρόνο, εμφανίζονται 2,8 εκατομμύρια νέα περιστατικά λοιμώξεων από *Chlamydia trachomatis* (Weinstock et al., 2000).

Τα *C. trachomatis* προκαλούν ουρηθρίτιδα και επιδιδυμίτιδα στους άνδρες, ενώ στις γυναίκες είναι αίτιο τραχηλίτιδας, πυελικής φλεγμονώδους νόσου, στειρότητας, χρόνιου πυελικού πόνου και έκτοπης εγκυμοσύνης. Επίσης και στα δύο φύλα μπορεί να προκαλέσουν αφροδίσιο λεμφοκοκκίωμα, πνευμονία νεογνών και επιπεφυκίτιδα. Εάν υπάρχουν συμπτώματα, γίνονται αισθητά περισσότερο στους άνδρες από τις γυναίκες, αλλά και στα δύο φύλα η πλειοψηφία των χλαμυδιακών λοιμώξεων είναι ασυμπτωματικές. Οι ασυμπτωματικές λοιμώξεις μπορούν να οδηγήσουν σε σοβαρές επιπλοκές εάν παραμείνουν αθεράπευτες.

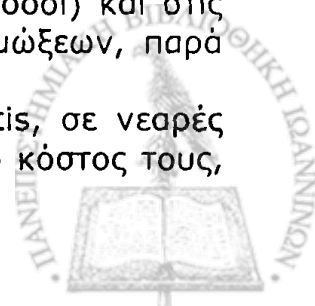
Πολλές διαγνωστικές τεχνικές υπάρχουν για την ανίχνευση των *Chlamydia trachomatis* σε δείγματα από το ουροποιογεννητικό σύστημα, αλλά οι πιο ευαίσθητες μέχρι σήμερα είναι οι μοριακές τεχνικές που βασίζονται στην ενίσχυση του γεννητικού υλικού (Nucleic Acid Amplification Techniques, NAAT). Οι μοριακές τεχνικές (NAAT), οι probe μοριακές τεχνικές και οι μέθοδοι ανίχνευσης του χλαμυδιακού αντιγόνου έχουν αντικαταστήσει πλέον την κυτταροκαλλιέργεια, η οποία παλαιότερα ήταν η μέθοδος αναφοράς για την ανίχνευση των *Chlamydia trachomatis*. Επιπλέον, οι περισσότερες από μοριακές μεθόδους που κυκλοφορούν σήμερα, έχουν κριθεί κατάλληλες από το FDA (Food and Drug Administration) για την ανίχνευση *Chlamydia trachomatis* σε ενδοτραχηλικά δείγματα γυναικών, ουρηθρικά ανδρών και ούρων ανδρών και γυναικών.

Η ανεύρεση και θεραπεία των ασθενών με *Chlamydia trachomatis* είναι σημαντική, όχι μόνο για τους ίδιους, αλλά και για το ευρύτερο κοινωνικό σύνολο, γιατί μπορεί να προλάβει την εξάπλωση των *Chlamydia trachomatis*. Πολλές μελέτες έχουν ασχοληθεί με την αξιολόγηση των μοριακών μεθόδων, καθώς και με τη συχνότητα εμφάνισης της χλαμυδιακής λοίμωξης σε συμπτωματικούς και ασυμπτωματικούς ασθενείς, συσχετίζοντάς την με ποικίλους παράγοντες κινδύνου.

Στις ΗΠΑ, οι λοιμώξεις από *Chlamydia trachomatis* έχουν αυξηθεί σημαντικά κατά την περίοδο 1987-2001 (51-278 περιστατικά /100,000 ανθρώπους). Μια παρόμοια αυξητική τάση παρατηρήθηκε και στη Μεγ.Βρετανία. Τα τελευταία χρόνια, σχεδόν κάθε μεγάλος οργανισμός δημόσιας υγείας στις ΗΠΑ, προτείνει να εξετάζονται για *C. trachomatis*, με προγράμματα ελέγχου, όλες οι σεξουαλικά ενεργά, νεαρές γυναίκες (Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2002), (Hollblad-Fadiman et al., 2003).

Αυτή η αύξηση των λοιμώξεων από *C. trachomatis* πιθανόν να οφείλεται στην ευρύτερη εφαρμογή προγραμμάτων ελέγχου (screening), στις βελτιωμένες μεθόδους διάγνωσης (όπως οι μοριακές μέθοδοι) και στις καλύτερες και περισσότερες αναφορές των χλαμυδιακών λοιμώξεων, παρά σε πραγματική αύξηση της συχνότητάς τους.

Η εφαρμογή προγραμμάτων ελέγχου για *C. trachomatis*, σε νεαρές γυναίκες, φαίνεται να είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική, παρά το κόστος τους,



προλαμβάνοντας τις σοβαρές επιπλοκές της νόσου (Scholes et al., 1996). Μολονότι, ο αριθμός των γυναικών που συμμετέχουν σε προγράμματα ελέγχου φαίνεται να αυξάνει, 60% των γυναικών που απειλούνται από χλαμυδιακές λοιμώξεις παραμένουν εκτός των προγραμμάτων ελέγχου (Levine et al., 2004).

Σε γεωγραφικές περιοχές όπου οι χλαμυδιακές λοιμώξεις θεωρούνται σημαντικές- και όπου οι αναφορές γύρω από αυτές πιθανόν να είναι πιο ολοκληρωμένες- έχει παρατηρηθεί πτώση της συχνότητάς τους τα τελευταία 20-30 χρόνια. Τέτοιες χώρες είναι οι Σκανδιναβικές χώρες και ιδίως η Σουηδία, αλλά και στις ΗΠΑ, όπου τα *Chlamydia trachomatis* πρέπει σύμφωνα με τον νόμο, να διερευνώνται και να αναφέρονται. Περισσότερα ακριβή στοιχεία για τη συχνότητα των χλαμυδιακών λοιμώξεων χρειάζεται να συγκεντρωθούν και σε χώρες, όπου οι χλαμυδιακές λοιμώξεις δεν θεωρούνται ιδιαίτερα σημαντικές, όπως στην Ελλάδα. Αυτό μπορεί να πραγματοποιηθεί εύκολα με τη βοήθεια των μοριακών μεθόδων, οι οποίες διαθέτουν υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα, και εφαρμόστηκαν στα κλινικά εργαστήρια της χώρας μας τα τελευταία χρόνια.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η ανίχνευση των *Chlamydia trachomatis* με μοριακές μεθόδους, σε δείγματα από το ουροποιογεννητικό σύστημα και από τους οφθαλμούς (επιπεφυκότες) παιδιών και ενηλίκων, με συμπτωματολογία ή όχι λοίμωξης. Συγχρόνως με την ανάλυση των αποτελεσμάτων, στόχος της μελέτης ήταν η πιθανή συσχέτιση των χλαμυδιακών λοιμώξεων με διάφορους δημογραφικούς παράγοντες και παράγοντες σεξουαλικής συμπεριφοράς.

Για τη συγκρότηση και πραγματοποίηση αυτής της εργασίας παρακινήθηκα από την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας κ. Σταματίνα Λεβειδιώτου.

Η εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε εξ'ολοκλήρου στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων υπό την επίβλεψη της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας κας Σταματίνας Λεβειδιώτου.

Επιθυμώ να εκφράσω την ευγνωμοσύνη και τις ευχαριστίες μου στην Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Σταματίνα Λεβειδιώτου, τόσο για την ανάθεση και επίβλεψη αυτής της εργασίας, όσο και για τις πολύτιμες υποδείξεις της, το απεριόριστο επιστημονικό ενδιαφέρον και την αμέριστη συμπαράστασή της σε όλη τη διάρκεια εκπόνησης της εργασίας.

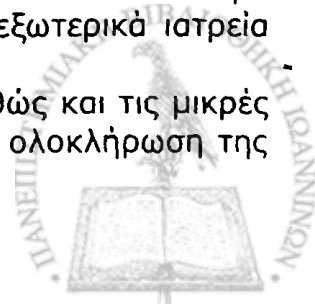
Εκφράζω τις ιδιαίτερες ευχαριστίες μου στα μέλη της Συμβουλευτικής Επιτροπής, στον Καθηγητή Μαιευτικής - Γυναικολογίας κ. Δημήτριο Λώλη και στον Καθηγητή Οφθαλμολογίας κ. Κωνσταντίνο Ψύλλα, για το ενδιαφέρον που επέδειξαν κατά την εκτέλεση της εργασίας.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Λέκτορα κ. Γεωργία Βρυώνη για το ξεχωριστό ενδιαφέρον και την επιστημονική υποστήριξη.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης, όλο το επιστημονικό, τεχνικό και διοικητικό προσωπικό του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας και ιδιαίτερα την Τεχνολόγο Ιατρικών Εργαστηρίων κ. Έφη Παπανίκου για τη βοήθειά της στη συλλογή, αποθήκευση και επεξεργασία των κλινικών δειγμάτων.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επιμελητή Α, της Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής, κ. Γεώργιο Τσανάδη για το ιδιαίτερο ενδιαφέρον που έδειξε στη συλλογή των δειγμάτων στα εξωτερικά ιατρεία της κλινικής.

Ευχαριστώ το σύζυγό μου κ. Γεώργιο Μαντέλλο, καθώς και τις μικρές Πένυ και Άρτεμις, για την κατανόηση που έδειξαν έως την ολοκλήρωση της εργασίας αυτής.



• Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής:

Σταματίνα Λεβειδιώτου - Στεφάνου: Επιβλέπουσα Αναπληρώτρια Καθηγήτρια. Μέλος Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Ευάγγελο Παρασκευαΐδη: Μέλος Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, Καθηγητής Μαιευτικής - Γυναικολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Χρήστο Καλογερόπουλο: Μέλος Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, Αναπληρωτής Καθηγητής Οφθαλμολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

• Ανέστη Κ. Μαυρίδη: Μέλος Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής, Καθηγητής Μικροβιολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Στυλιανή Ανδρονίκου: Μέλος Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής, Καθηγήτρια Νεογνολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Κωνσταντίνο Μπασιούκα: Μέλος Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής, Επίκουρος Καθηγητής Δερματολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Γεωργία Βρυώνη: Μέλος Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής, Λέκτορας Μικροβιολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών.



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	Σελίδα
I. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	1
1. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ	3
2. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΩΝ ΧΛΑΜΥΔΙΩΝ	5
 ΧΛΑΜΥΔΙΑ TRACHOMATIS	
3. ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ	8
3.1. Μορφολογία - Δομή	8
3.2. Φυσιολογία - Μεταβολισμός	11
3.3. Καλλιέργεια	13
3.4. Κύκλος ανάπτυξης	14
3.5. Αντιγονική δομή	18
Ορότυποι	19
4. ΟΙΚΟΛΟΓΙΑ - ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ	21
4.1. Τρόποι μετάδοσης των <i>C. trachomatis</i>	21
4.2. Παράγοντες κινδύνου εμφάνισης λοίμωξης από <i>C. trachomatis</i>	22
4.3. Επιδημιολογικά χαρακτηριστικά	23
5. ΛΟΙΜΟΓΟΝΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ - ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ	25
6. ΠΑΘΟΓΟΝΟΣ ΔΡΑΣΗ	29
6.1. Λοιμώξεις ουροποιογεννητικού συστήματος σε άνδρες και γυναίκες	29
6.1.1. Λοιμώξεις του ουροποιογεννητικού συστήματος σε άνδρες	29
6.1.2. Λοιμώξεις του ουροποιογεννητικού συστήματος σε γυναίκες	31
6.2. Επιπεφυκίτιδα από έγκλειστα των ενηλίκων	35
6.3. Περιγεννητικές λοιμώξεις των νεογνών	36
6.3.1. Νεογνική επιπεφυκίτιδα από έγκλειστα	36
6.3.2. Πνευμονία των νεογνών	37



6.4.	Οφθαλμικό τράχωμα	38
6.5.	Αφροδίσιο λεμφοκοκκίωμα	41
6.6.	Εξέλιξη λοίμωξης από C.trachomatis: αυτόματη ίαση ή επιμονή;	43
7.	ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ	45
7.1.	Συλλογή των δειγμάτων	45
7.1.1.	Συλλογή και μεταφορά των δειγμάτων για ανίχνευση C.trachomatis με καλλιέργεια	45
7.1.2.	Συλλογή και μεταφορά των δειγμάτων για ανίχνευση C.trachomatis με μη καλλιεργητικές μεθόδους	46
7.2.	Απομόνωση – Κυτταροκαλλιέργεια	48
7.3.	Ορολογική διάγνωση	50
7.4.	Οπτικό μικροσκόπιο	53
7.5.	Μέθοδοι ανίχνευσης αντιγόνου	53
7.5.1.	« Rapid in office tests»	53
7.5.2.	Ανοσοενζυμικές μέθοδοι (EIA/ELISA)	54
7.5.3.	Άμεσος ανοσοφθορισμός (DFA)	55
7.6.	Τεχνικές ανίχνευσης γενετικού υλικού (DNA/RNA)	56
7.6.1.	Probe τεχνικές	56
7.6.2.	Τεχνικές ενίσχυσης νουκλεϊκού οξέος (NAAT)	57
7.7.	Η σημασία των προγνωστικών αξιών στην εφαρμογή μιας μεθόδου	63
8.	ΘΕΡΑΠΕΙΑ	65
9.	ΠΡΟΛΗΨΗ	67



II. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	71
1. ΣΚΟΠΟΣ	73
2. ΥΛΙΚΟ - ΜΕΘΟΔΟΙ	75
2.1 Υλικό - Ασθενείς και δείγματα	75
2.2 Μέθοδοι	78
2.2.1 Κυτταροκαλλιέργεια	78
2.2.2 Μοριακές τεχνικές	80
2.3 Εξωτερικός ποιοτικός έλεγχος	83
2.4. Επεξεργασία δεδομένων	84
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	87
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	91
5. ΠΕΡΙΛΗΨΗ	105
6. SUMMARY	106
7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	107



I. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



1. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

Το τράχωμα ήταν γνωστό από την αρχαιότητα ως μια νόσο που προκαλεί τύφλωση. Στην Αίγυπτο είχε περιγραφεί πριν από 3.500 χρόνια (Jones, 1975). Θεραπεία για το τράχωμα και τις επιπλοκές του περιγράφηκε στην Κίνα τον 27^ο αι. π.Χ. και στην Αίγυπτο τον 19^ο αι. π.Χ. (Schachter et al., 1978). Σαφής περιγραφή του τραχώματος υπάρχει στον πάπυρο Ebers, του 1500 π.Χ. (Schachter et al., 1988). Το 13^ο αι. μ.Χ. αναγνωρίσθηκε στη Συρία η μεταδοτικότητα της νόσου (al-Rifai, 1988), αλλά ιδιαίτερη προσοχή δόθηκε κατά τη διάρκεια των εκστρατειών του Ναπολέοντα στην Αίγυπτο (1798-1799), όταν οι Ευρωπαίοι στρατιώτες εμφάνισαν εικόνα τραχώματος.

• Ο Ιπποκράτης παρατήρησε και περιέγραψε το τράχωμα ως μια χρόνια ουλώδη οφθαλμική νόσο για την οποία πρότεινε χειρουργική επέμβαση με καυτηρίαση και θεραπεία με θειικό χαλκό (Πουρναρόπουλος Γ., Άπαντα: Ιπποκράτης).

Η λέξη τράχωμα (roughness:τραχύτητα) είναι ελληνική και αναφέρεται στα χαρακτηριστικά θυλάκια (follicles) που δημιουργούνται στον επιπεφυκότα.

Στα τέλη του 19^{ου} αι. και στις αρχές του 20ου αι., κλινική εικόνα τραχώματος εμφάνισαν οι μετανάστες που έζησαν στο νησί Ellis, κοντά στη Ν.Υόρκη.

Παρ' όλα αυτά, ο ρόλος των *Chlamydia trachomatis* στις λοιμώξεις του γεννητικού συστήματος δεν αναγνωρίσθηκε έως τις αρχές του 20ου αι. Πριν την εφαρμογή της περιγεννητικής προφύλαξης των οφθαλμών για γονόρροια θεωρούνταν εξ' αρχής ότι όλες οι νεογνικές επιπεφυκίτιδες ήταν γονοκοκκικές. Οι πρώτες περιγραφές νεογνικής οφθαλμίας έγιναν από τον Saint-Yves το 1722 και μετά από τον Vetch το 1820 που διατύπωσε την υπόθεση της διασποράς της λοίμωξης με αιματογενή οδό από την ουρήθρα στο μάτι. Το 1884 ο Knoper και το 1903 ο Morax υποστήριξαν τη μετάδοση της λοίμωξης κατά τη διάρκεια του τοκετού. Ο Juliard ήταν ο πρώτος, το 1835, ο οποίος συμβούλεψε για τη χρησιμοποίηση του νιτρικού αργύρου για την πρόληψη της νεογνικής οφθαλμίας και κατόπιν ο Crede το 1884 συνέστησε τη συστηματική εφαρμογή του σε όλα τα νεογνήνητα.

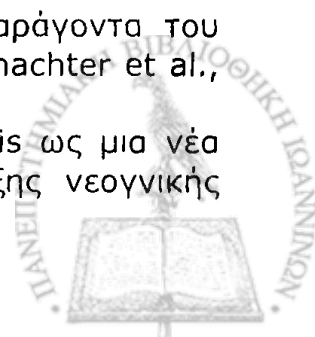
Παρόλα αυτά, ακόμα και μετά την εφαρμογή της προφυλακτικής αγωγής, οι νεογνικές επιπεφυκίτιδες συνέχιζαν να εμφανίζονται και το 1907, οι Halberstaedter και ο von Provaszek (Halberstaedter et al., 1909) εντόπισαν, σε επιχρίσματα επιπεφυκότα από νεογνά με επιπεφυκίτιδα, κύτταρα με κυτταροπλασματικά έγκλειστα παρόμοια με εκείνα που εμφάνιζαν οι ασθενείς με οφθαλμικό τράχωμα. Επίσης, θεώρησαν τους καινούργιους μικροοργανισμούς ως πρωτόζωα και τους ονόμασαν *Chlamydozoa* από την ελληνική λέξη «χλαμύς» λόγω του μπλε κεχρωσμένου περιβλήματος μέσα στο οποίο ήταν τα έγκλειστα.

Το 1910, ο Lindner και ταυτόχρονα ο Heymann, εντόπισαν έγκλειστα σε κύτταρα από τον τράχηλο της μητέρας και από την ουρήθρα του πατέρα ενός μολυσμένου νεογνού (Lindner et al., 1910), καθώς και σε ουρηθρικά επιχρίσματα ανδρών με μη γονοκοκκική ουρηθρίτιδα (NGU) (Heymann et al., 1910).

• Το 1912 περιγράφηκε για πρώτη φορά το αφροδίσιο λεμφοκοκκίωμα, μια άλλη νόσος που προκαλούν τα *C.trachomatis*.

Το 1931 επιτεύχθηκε η αναπαραγωγή του αιτιολογικού παράγοντα του αφροδίσιου λεμφοκοκκιώματος σε κύτταρα εγκεφάλου πιθήκου (Schachter et al., 1978).

• Το 1975 περιγράφηκε πνευμονία νεογνών από *C.trachomatis* ως μια νέα νόσος (Beem et al., 1977) καθώς και η δυνατότητα συνύπαρξης νεογνικής οφθαλμίας, ρινοφαρυγγικού αποικισμού και πνευμονίας.



Η πρώτη ιστορικά μέθοδος (Schachter et al., 1966) που εφαρμόστηκε για την ανίχνευση των χλαμυδίων, ήταν η χρώση Giemsa, η οποία πρώτη χρησιμοποιήθηκε για να γίνουν ορατά τα χαρακτηριστικά ενδοκυτταροπλασματικά έγκλειστα που παράγονται από τα χλαμύδια. Μολονότι είναι μια διαδικασία με μικρή ευαισθησία και αρκετά χρονοβόρα, πολλά πράγματα έγιναν γνωστά γύρω από το κλινικό φάσμα και το επιδημιολογικό προφίλ των χλαμυδιακών λοιμώξεων με τη χρήση της χρώσης Giemsa. Από τις αρχές μέχρι και τα μέσα του 20ου αι. αυτή ήταν βασικά η μόνη διαθέσιμη τεχνική για τη διάγνωση των χλαμυδιακών λοιμώξεων.

Το 1957, μετά την πρώτη αναφορά από τον Tang και συν. (1957), για την απομόνωση χλαμυδίων από οφθαλμό με ενδημικό τράχωμα, υιοθετήθηκε από αρκετά εργαστήρια η απομόνωση των χλαμυδίων σε λεκιθικό σάκκο εμβρυοφόρων αυγών κότας. Τα απομονωθέντα χλαμύδια ενοφθαλμίζοντο στους οφθαλμούς πιθήκων rhesus, οι οποίοι εν συνεχεία εκδήλωναν τράχωμα. Οι ερευνητές τότε πίστεψαν ότι τα χλαμύδια είναι ιοί.

Το 1965, από τους Gordon και Quan (Gordon et al., 1965), απομονώθηκαν *C. trachomatis* σε κυτταροκαλλιέργεια κυττάρων McCoy.

Το 1966, ο Moulder δημοσίευσε μια εκτενή αναφορά, θεωρώντας ότι τα χλαμύδια είναι ενδοκυττάρια βακτήρια, μ'ένα ξεχωριστό κύκλο ανάπτυξης και μοναδική δομή (Moulder, 1966).

Το 1974 οι Wang και Grayston, ανέπτυξαν τη μέθοδο του μικροανοσοφθορισμού (Micro-IF) για την ανίχνευση αντισωμάτων από *C. trachomatis* (Wang et al., 1971, Wang et al., 1974).

Στις αρχές της δεκαετίας του '80 κυκλοφόρησαν στο εμπόριο φθορίζοντα μονοκλωνικά αντισώματα έναντι, ειδικών του είδους, επιτόπων των *C. trachomatis* καθώς και μια ανοσοενζυματική μέθοδος για την ανίχνευση χλαμυδιακών αντιγόνων σε κλινικά δείγματα.

Σήμερα, σύμφωνα με την τελευταία ταξινόμηση (Everett et al., 1999), αναγνωρίζονται 15 μεγάλες ομάδες βακτηρίων, εκ των οποίων, τα χλαμύδια είναι τα μόνα αποκλειστικά ενδοκυττάρια παράσιτα των ευκαρυωτικών.



2. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΩΝ ΧΛΑΜΥΔΙΩΝ

Στο γένος *Chlamydiae* περιλαμβάνονται μικροοργανισμοί που είναι μεταξύ των πιο συχνά παθογόνων μικροοργανισμών του ζωικού βασιλείου (Meyer et al., 1967). Είναι μη κινητά, Gram αρνητικά, υποχρεωτικά ενδοκυττάρια βακτήρια μεγέθους 0,2-1,5 μm. Ο μοναδικός κύκλος αναπαραγωγής τους τα διαφοροποιεί από τους άλλους μικροοργανισμούς (Moulder et al., 1971). Αναπαράγονται μέσα στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου-ξενιστή σχηματίζοντας τα χαρακτηριστικά ενδοκυττάρια έγκλειστα που μπορούν να φανούν με το οπτικό μικροσκόπιο. Διαφέρουν από τους ιούς γιατί διαθέτουν DNA και RNA και έχουν κυτταρικά τοιχώματα παρόμοιας δομής με εκείνα των Gram αρνητικών βακτηρίων. Είναι ευαίσθητα σε πολλά ευρέως φάσματος αντιβιοτικά, διαθέτουν ένζυμα και έχουν περιορισμένη μεταβολική δραστηριότητα. Καμιά όμως μεταβολική τους δράση δεν έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή ενέργειας. Γι'αυτό, έχουν θεωρηθεί ως ενεργά παράσιτα, εφόσον χρησιμοποιούν το ATP, που παράγεται από το κύτταρο-ξενιστή, για τις δικές τους ανάγκες.

Το 1909, οι Halberstaedter L. και von Provaszek, κατέταξαν τα χλαμύδια στα πρωτόζωα (*Chlamydozoa*). Από άλλους, τα χλαμύδια θεωρήθηκαν ως "παράγοντες". Έτσι, αναφέρονταν ως "παράγων TRIC" (*Trachoma-Inclusion Conjunctivitis*), ή "παράγων των ενδοκυττάρων εγκλείστων" και ως "παράγων LGV". Άλλα ονόματα που δόθηκαν στα χλαμύδια ήταν: *Bedsonia* (από το όνομα του Άγγλου ερευνητή Bedson), *Miyagawanella* και *Neorickettsia*.

Στα μέσα του 20ου αιώνα αποτέλεσαν την τάξη *Rickettsiales* στην οποία ανήκαν δυο οικογένειες: η οικογένεια *Chlamydiales* και η οικογένεια *Rickettsiales*.

Ως τις αρχές της δεκαετίας του '60, τα χλαμύδια θεωρήθηκαν ως ιοί, επειδή είναι υποχρεωτικά ενδοκυττάρια, δεν αναπτύσσονται στα κοινά θρεπτικά υλικά και επειδή λόγω του μικρού τους μεγέθους διαπερνούσαν τους μικροβιοκρατείς ηθμούς.

Το 1966, ο Page (Page et al., 1966), μελετώντας τη μορφολογία, τις φυσικοχημικές ιδιότητες και το μεταβολισμό των χλαμυδίων, ανέφερε ότι τα χλαμύδια δεν είναι ιοί αλλά σχιζομύκητες.

Το 1980, δημοσιεύθηκε για πρώτη φορά ο "Κατάλογος των βακτηριακών ονομάτων", στον οποίο τα *Chlamydiae* διακρίνονταν σε δυο είδη: *C.trachomatis* και *C.psittaci* (Page, 1968).

Το 1986, ο Grayston και συν. (Grayston et al., 1986), θεώρησαν ότι ο μικροοργανισμός TWAR είναι στέλεχος των *C.psittaci*, αλλά περαιτέρω έρευνες απέδειξαν ότι ο μικροοργανισμός αυτός δεν ανήκει σε κανένα από τα δυο αναγνωρισμένα είδη των *C.trachomatis* και *C.psittaci*, διότι με τη χρήση, ειδικών του γένους, φθοριζόντων μονοκλωνικών αντισωμάτων αποδείχθηκε ότι ο μικροοργανισμός TWAR έχει κοινό αντιγόνο γένους με τα άλλα χλαμύδια, αλλά με τη δοκιμή του μικροανοσοφθορισμού δεν παρουσιάζει διασταυρούμενη αντίδραση με τα άλλα δυο είδη των *C.trachomatis* και *C.psittaci*.

Τα ενδοκυττάρια έγκλειστα που σχηματίζει ο TWAR σε κυτταροκαλλιέργειες, φαίνονται στρογγυλά, πυκνά και δεν περιέχουν γλυκογόνο. Σε αντίθεση με τα άλλα είδη, ο TWAR δεν περιέχει εξωχρωμοσωμιακό DNA (πλασμίδια). Λιγότερο από 10% του DNA βρέθηκε να είναι ομόλογο μεταξύ του μικροοργανισμού TWAR και των δυο άλλων χλαμυδιακών ειδών (Cox et al., 1988), ενώ η ομολογία στην ακολουθία του DNA είναι υψηλή (94%) μεταξύ των στελεχών του. Παρόμοια υψηλή ομολογία υπάρχει μεταξύ των στελεχών των *C.trachomatis*, ενώ υπάρχει αξιοσημείωτη ετερογένεια μεταξύ των στελεχών των *C.psittaci*.

Το 1988, ο Cox και συν. πρότειναν να θεωρείται ο μικροοργανισμός TWAR ως το 3^ο είδος του γένους *Chlamydiae*, ονομαζόμενο ως *C.pneumonia*, γεγονός

που έγινε αποδεκτό και από μεταγενέστερες μελέτες (Grayston, Kuo et al., 1989, Grayston, Wang et al., 1989, Grayston et al., 1992).

Μια ακόμα ομάδα στελεχών αρχικά ταξινομήθηκε στα *C.psittaci*. Ακολούθως, αποτέλεσαν ένα επιπλέον είδος, τα *Chlamydia pecorum* (Fukushi et al., 1992).

Σύμφωνα με μια από τις τελευταίες ταξινομήσεις (Moulder et al., 1971, Pudjiatmoko et al. 1997), η οποία βασίστηκε στον μοναδικό κύκλο αναπαραγωγής των *Chlamydiae*, καθώς και στη φυλογενετική ανάλυση του γένους *Chlamydia* με τη μελέτη της αλληλουχίας του γονιδίου 16S rRNA, όλα τα *Chlamydia* ταξινομήθηκαν σε μια δική τους τάξη: στην **τάξη** *Chlamydiales*, η οποία έχει μόνο **μια οικογένεια**, *Chlamydiaceae*. Η οικογένεια αυτή περιλαμβάνει μόνο το **γένος** *Chlamydia*, στο οποίο αναγνωρίζονται **τέσσερα είδη**: *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia psittaci*, *Chlamydia pneumoniae* και *Chlamydia pecorum* (The National Institute of Health.NIH Taxonomy Browser,1998).

Τέλος, με βάση την πρόσφατη ανάλυση της αλληλουχίας των γονιδίων 16S και 23SrRNA προτείνεται μια νέα ταξινόμηση (Everett et al., 1999), σύμφωνα με την οποία, η **τάξη** *Chlamydiales* διαιρείται σε **τέσσερις οικογένειες**, ως εξής:

1. Οικογένεια *Chlamydiaceae*, που περιλαμβάνει **δύο γένη** και **εννέα είδη**:
το γένος *Chlamydia* (που περιλαμβάνει τρία είδη: *C.trachomatis*, *C.muridarum* και *C.suis*) και
το γένος *Chlamydiophila* (που περιλαμβάνει έξι είδη: *C.pneumoniae*, *C.pecorum*, *C.psittaci*, *C.abortus*, *C.caviae* και *C. felis*)
2. Οικογένεια *Simkaniaceae*, που περιλαμβάνει το γένος *Simkania negevensis*
3. Οικογένεια *Parachlamydiaceae*, που περιλαμβάνει το γένος *Parachlamydia acanthamoeba* (strain BN9) και
4. Ανώνυμη οικογένεια, που περιλαμβάνει το στέλεχος *Waddlia strain WSU 86-1044*.

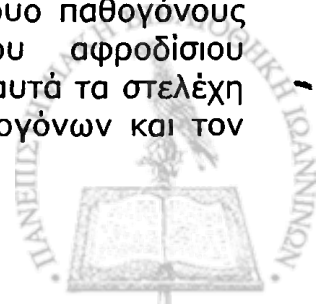
Μερικά από τα γένη της οικογένειας *Chlamydiaceae* έχουν συσχετισθεί με ποικίλα νοσήματα στον άνθρωπο (Εικόνα 1):

- Τα στελέχη *C.trachomatis* προκαλούν τράχωμα, επιπεφυκίτιδα, αφροδίσιο λεμφοκοκκίωμα (LGV), λοιμώξεις του γεννητικού συστήματος, πνευμονία στα νεογνά και στους ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς, καθώς και ενεργό αρθρίτιδα (Σύνδρομο Reiter).

Διαίρονται σε τρεις βιότυπους (boilers):

1. του τραχώματος,
2. του αφροδίσιου λεμφοκοκκιώματος και
3. της πνευμονίτιδας των ποντικών (στελέχη: MoPn και SFPD). Κανένα από τα στελέχη αυτά δεν είναι παθογόνο για τον άνθρωπο.

Ο διαχωρισμός των στελεχών των *C.trachomatis*, στους δυο παθογόνους για τον άνθρωπο βιότυπους, του τραχώματος και του αφροδίσιου λεμφοκοκκιώματος, βασίστηκε στον τροπισμό που παρουσιάζουν αυτά τα στελέχη προς συγκεκριμένους ιστούς: τα επιθηλιακά κύτταρα των βλεννογόνων και τον λεμφικό ιστό, αντίστοιχα.



Τα στελέχη του αφροδίσιου λεμφοκοκκιώματος περιλαμβάνουν 4 ορότυπους και του τραχώματος 15 ορότυπους.

Οι 19 ορότυποι διακρίνονται μεταξύ τους με βάση την ικανότητά τους να συνδέονται με μονοκλωνικά αντισώματα. Μπορούν επίσης να διακριθούν με πολυμορφισμό της αλληλουχίας του MOMP αντιγόνου (Major Outer Membrane Protein Antigen) ή της αλληλουχίας του γονιδίου *omp1*, το οποίο κωδικοποιεί το MOMP αντιγόνο.

Οι 4 ορότυποι του αφροδίσιου λεμφοκοκκιώματος (L1, L2, L2a και L3) είναι σπάνιοι. Όλοι είναι σεξουαλικά μεταδιδόμενοι, μολονότι οι οφθαλμοί μπορούν να αποτελέσουν πύλη εισόδου.

Οι 15 ορότυποι του τραχώματος υποδηλώνονται με τα γράμματα: A έως K και *επιπλέον: Ba, Da, Ia και Ja. Συγκεκριμένα, οι ορότυποι A, B, Ba και C αποικίζουν τους οφθαλμούς προκαλώντας τράχωμα, ενώ οι ορότυποι D έως K και επιπλέον οι Da, Ia και Ja προκαλούν γενετικές λοιμώξεις (Fredlund et al., 2004).

Οι ορότυποι αυτοί ενώ παρουσιάζουν τροπισμό για ορισμένους ιστούς, δεν είναι και ειδικοί. Δηλαδή, στελέχη που προκαλούν τράχωμα έχουν απομονωθεί και από το γεννητικό σύστημα (Frost et al, 1993). Επίσης, ορότυποι του γεννητικού συστήματος έχουν περιστασιακά απομονωθεί και στους οφθαλμούς, ακόμα και σε περιοχές όπου ενδημεί το τράχωμα (Brunham et al, 1990, Mabey et al, 1987).

Τα *C.trachomatis* είναι ευαίσθητα στις σουλφοναμίδες και παράγουν μια ουσία μέσα στα έγκλειστα που μοιάζει με το γλυκογόνο και χρωματίζεται με τη χρώση ιωδίνης καστανέρυθρο.

- Τα στελέχη *C.psittaci* προκαλούν νόσους σε αρκετά θηλαστικά, όπως ψιπτάκωση, ορνίθωση, πνευμονίτιδα στις γάτες και αποβολές βοοειδών. Οι άνθρωποι μολύνονται δευτερογενώς από τα ζώα και εμφανίζουν πνευμονία ή συστηματική λοίμωξη, καθώς και ενδοκαρδίτιδα.

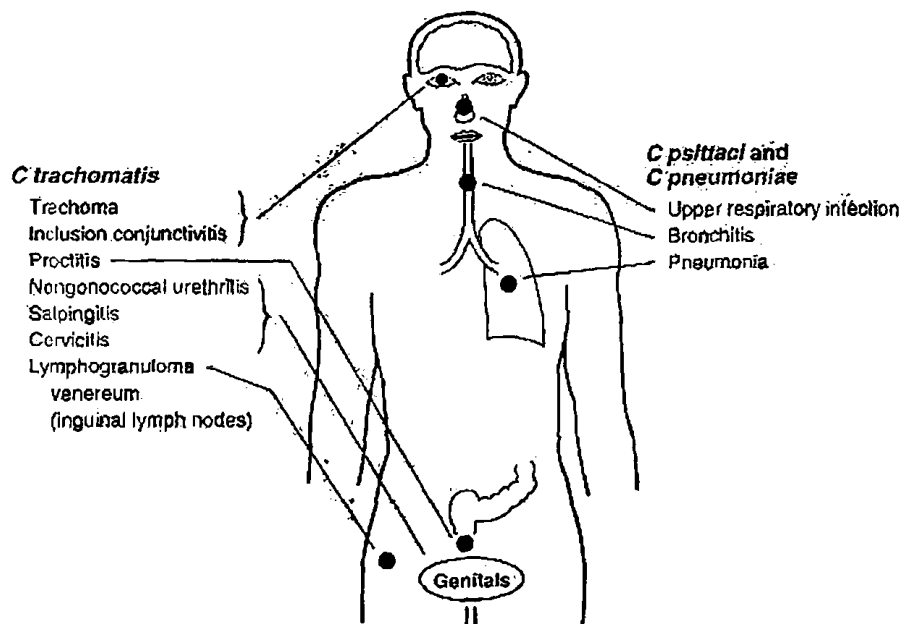
Πρόσφατα, τα *C.psittaci* συσχετίστηκαν με το "ocular adnexal lymphoma" (OAL) που προσβάλλει τους οφθαλμούς (Ferreti et al., 2003). Συγκεκριμένα, συσχετίστηκαν τα *C.psittaci* με non-Hodgkin λέμφωμα και αναφέρθηκε η παρουσία DNA των *C.psittaci* στα λευκά αιμοσφαίρια της κυκλοφορίας αυτών των ασθενών.

Τα *C. psittaci* είναι ανθεκτικά στις σουλφοναμίδες και παράγουν έγκλειστα που δεν χρωματίζονται με τη χρώση ιωδίνης.

- Τα στελέχη *C. pneumoniae* προκαλούν λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος (φαρυγγίτιδα, ιγμορίτιδα, βρογχίτιδα και πνευμονία) στον άνθρωπο, καθώς επίσης προκαλούν λοιμώξεις σε διάφορα ζώα, από τα κοάλα έως τα ερπετά (Grayston et al., 1992). Τα *C.pneumoniae* είναι το πιο συχνό αίτιο πνευμονίας στην κοινότητα, ενώ παράλληλα έχουν συσχετισθεί με αθηροσκλήρωση και νόσο των στεφανιαίων αγγείων. Επίσης έχουν συσχετισθεί με σκλήρυνση κατά πλάκας. Δεν υπάρχουν μελέτες που να το επιβεβαιώνουν, αλλά σε πολλούς ασθενείς με νόσο αυτή ανιχνεύθηκαν *C.pneumoniae* στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό.

- Το τέταρτο στέλεχος, *C. pecorum*, έχει επίσης περιγραφεί, αλλά ο ρόλος του ως παθογόνο δεν έχει αποσαφηνισθεί, ενώ εξειδικευμένα αντιδραστήρια απαιτούνται για την ταυτοποίησή του (Ridker et al., 1988, Fukushi et al., 1992).





Εικόνα 1: Συνήθεις λοιμώξεις από χλαμύδια στον άνθρωπο.

ΧΛΑΜΥΔΙΑ TRACHOMATIS

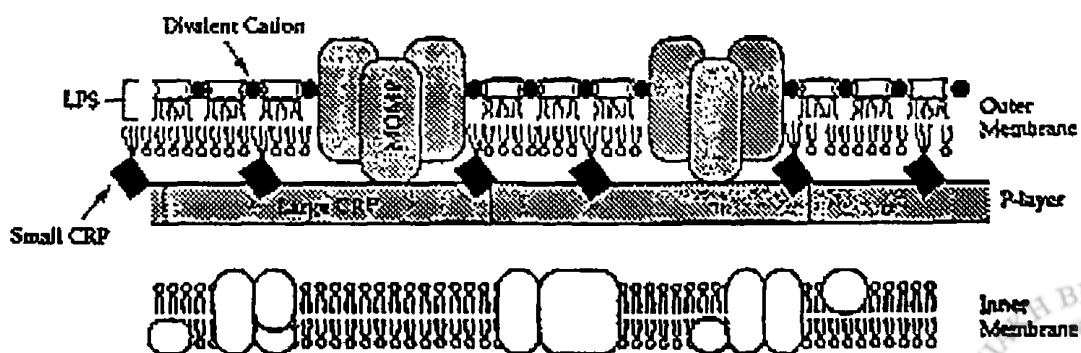
3. ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ

3.1. Μορφολογία – Δομή

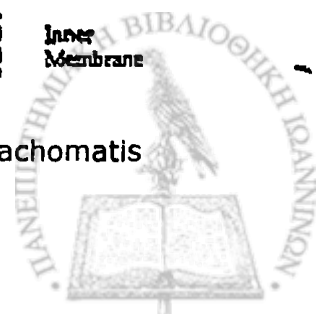
Τα Chlamydiae είναι προκαρυωτικά. Με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, τα χλαμύδια φαίνεται ότι διαθέτουν ένα κοκκιώδες κυτταρόπλασμα, εξαιτίας της παρουσίας των 70S ριβοσωμάτων και έναν έκκεντρα τοποθετημένο πυρήνα (Matsumoto, 1988).

Η κυτταρικός φάκελος (cell envelope) (Εικόνα 2), μοιάζει μορφολογικά και δομικά με των Gram (-) βακτηριδίων, όπως της E.coli. Ο κυτταρικός φάκελος είναι διπλός, αποτελούμενος από την κυτταροπλασματική μεμβράνη προς τα έσω και το κυτταρικό τοίχωμα (cell wall), που βρίσκεται εξωτερικά αυτής.

Το κυτταρικό τοίχωμα διακρίνεται σε δυο στιβάδες: από μια εσωτερική στιβάδα p (p layer), αποτελούμενη από εξαγωνικές πρωτεϊνικές δομές και την εξωτερική μεμβράνη, που είναι πλούσια σε πρωτεΐνες και λιπίδια. Η στιβάδα p βρίσκεται μέσα στον περιπλασματικό χώρο.



Εικόνα 2. Ο κυτταρικός φάκελλος (cell envelope) των C. trachomatis



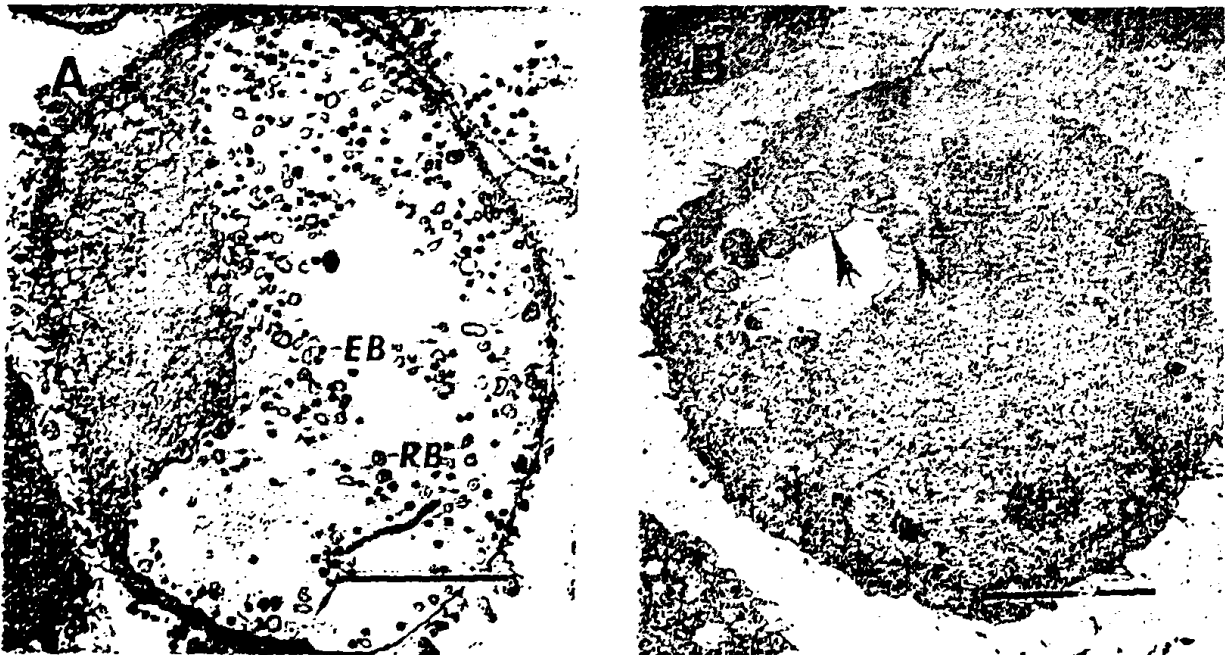
Τα Chlamydia δεν διαθέτουν πεπτιδογλυκάνη (Moulder, 1984, Fox et al., 1990), παρότι στο γενετικό υλικό των χλαμυδίων υπάρχουν τα γονίδια που είναι υπεύθυνα για τη σύνθεση της πεπτιδογλυκάνης (Stephens et al., 1998). Πρόκειται για ένα μακρομόριο που παρέχει στα περισσότερα προκαρυωτικά κύτταρα, δομική ακαμψία και ωσμωτική σταθερότητα. Επίσης, δεν διαθέτουν μουραμικό οξύ, ή σπανίως ανευρίσκονται ίχνη αυτού.

Λειτουργικό ρόλο παρόμοιο με αυτό της πεπτιδογλυκάνης φαίνεται να έχουν οι πρωτεΐνες του συμπλέγματος της εξωτερικής μεμβράνης. Τέτοιες είναι οι «**πρωτεΐνες πλούσιες σε κυστεΐνη**» (**cystein-rich proteins:CRP**) και η «**κύρια πρωτεΐνη της εξωτερικής μεμβράνης**» (**major outer membrane protein: MOMP**). Ισχυροί δισουλφιδικοί δεσμοί συνδέουν τα υπολείμματα κυστεΐνης μεταξύ τους, αλλά και τις MOMP πρωτεΐνες εγκαρσίως μεταξύ τους. Αυτή η μοναδική δομή εξασφαλίζει σταθερότητα, επιτρέποντας την ενδοκυττάρια διαίρεση και την εξωκυττάρια επιβίωση (Hatch,Thomas., 1996).

Τα Chlamydiae είναι υποχρεωτικά ενδοκυττάρια βακτήρια, με ένα μοναδικό διφασικό κύκλο ανάπτυξης (Moulder, 1984). Αναγνωρίζονται δηλαδή, δυο διαφορετικοί τύποι του ίδιου μικροοργανισμού: το στοιχειώδες σωματίο (elementary body: EB) και το δικτυωτό σωματίο (reticulate body: RB) (Εικόνα 3 και 4)

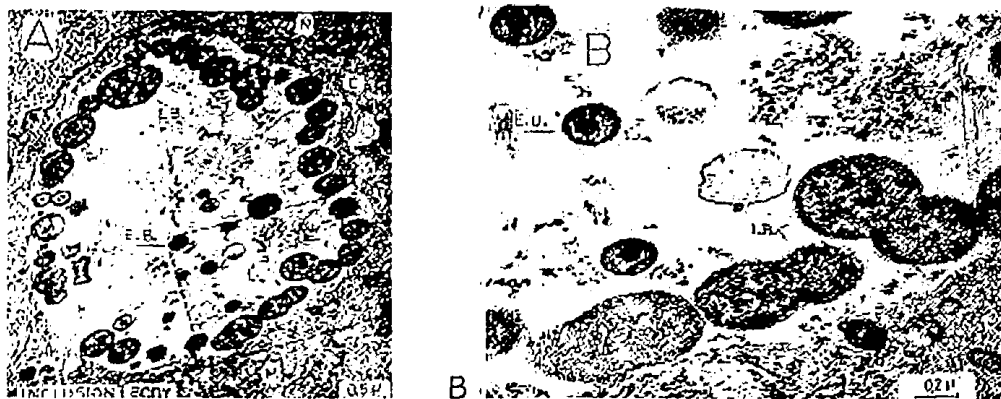
Το στοιχειώδες σωματίο (Elementary Body, EB), έχει διάμετρο περίπου 200-400 nm, είναι ιδιαίτερα λοιμογόνο, προσαρμοσμένο για την εξωκυττάρια επιβίωση γιατί διαθέτει σποριόμορφη δομή (De Mets A. 2000, Jones et al., Chlamydial diseases).

Το δικτυωτό σωματίο (Reticulate Body, RB), ή αρχικό σωματίο (Initial Body, IB), είναι μεγαλύτερο από το EB και έχει διάμετρο 800-1000 nm (Schachter et al., 1980). Είναι ελάχιστα λοιμογόνο και αποτελεί τον ενδοκυττάρια αναπαραγωγικό τύπο των χλαμυδίων.



Εικόνα 3. Στοιχειώδη σωματίδια (Elementary Body, EB) και δικτυωτά σωματίδια (Reticulate Body, RB) των *C. trachomatis* μέσα σε κύτταρο - στόχο. Εικόνα από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.





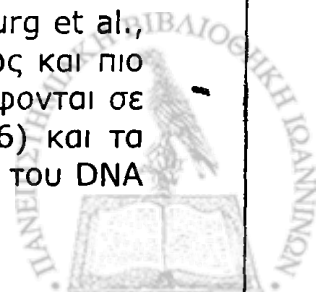
Εικόνα 4. A: Εικόνα από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο των χλαμυδιακών εγκλειστών στο κυτταρόπλασμα (C) μολυσμένου κυττάρου. Διακρίνεται μέρος του πυρήνα (N) και των μιτοχονδρίων (M). B: Μεγέθυνση των στοιχειωδών (Elementary Body, EB) και των δικτυωτών ή αρχικών σωματιδίων (Reticulate Body, RB ή Initial Body IB). Becker Y, Jerusalem, Israel.

Σε αντίθεση με τους ιούς, τα χλαμύδια περιέχουν **DNA και RNA** και το μέγεθος του γενώματός τους είναι περίπου 500-1000 kilobases. Είναι τα μικρότερα από κάθε άλλο προκαρυωτικό μικροοργανισμό, εκτός από το *Mycoplasma spp.* Το γενετικό υλικό του πυρήνα του RB είναι λιγότερο πυκνό από το γενετικό υλικό του πυρήνα του EB. Τα χλαμύδια διαθέτουν επίσης ριβοσώματα που δεν υπάρχουν στους ιούς. Τα ριβοσώματα είναι περισσότερα στο RB σε σύγκριση με το EB.

Τα *C. trachomatis* διαθέτουν επίσης **πλασμίδιο** που είναι παρόν σε περίπου 10 αντίγραφα σε κάθε μικροοργανισμό (Palmer et al., 1986, Sriprakash et al., 1987), αν και έχουν καλλιεργηθεί στελέχη *C. trachomatis* χωρίς πλασμίδιο (Peterson et al., 1990, An Q et al., 1994). Τα *C. pneumoniae* δεν φαίνεται να περιέχουν εξωχρωμοσωμιακό γενετικό υλικό (Grayston, Kuo et al., 1989). Το πλασμίδιο υπάρχει σε όλους τους ορότυπους των *C. trachomatis*, αλλά διαφέρει από τα πλασμίδια των *C. psittaci*. Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με το ότι υπάρχει σε πολλά αντίγραφα, καθιστούν το πλασμίδιο έναν πολύ καλό στόχο κατά τη γενετική ανίχνευση των *C. trachomatis*. Έχει υποστηριχθεί ότι ίσως παίζει ρόλο στην αναδίπλωση του DNA (Stephens et al., 1998), αλλά η λειτουργία του παραμένει άγνωστη.

Το 1998, αποκωδικοποιήθηκε πλήρως η αλληλουχία βάσεων των *C. trachomatis* του ορότυπου D, η οποία βρέθηκε ότι αποτελείται από ένα χρωμόσωμα 1,042,519 ζευγών βάσεων και από ένα πλασμίδιο 7,493 ζευγών βάσεων (Fox et al., 1990, Stephens et al., 1998). Βασιζόμενοι στη μελέτη της αλληλουχίας τους διαπιστώθηκε ότι απουσιάζουν βασικοί μεταβολικοί οδοί, όπως: η βιοσύνθεση αμινοξέων, πουρίνης-πυριμιδίνης, η αναερόβια ζύμωση, καθώς και η παραγωγή πρωτεϊνών μεταφοράς. Βρέθηκε όμως ότι πραγματοποιούν πλήρως τη γλυκολυτική και γλυκογενετική οδό και έχουν πλήρη ικανότητα σύνθεσης λιπαρών οξέων, φωσφολιπιδίων, λιποπολυσακχαριτών και πεπτιδογλυκάνης (Fox et al., 1990).

Τέλος, στο γενετικό υλικό των *C. trachomatis*, υπάρχουν γονίδια που κωδικοποιούν το ριβοσωμιακό RNA (**rRNA**) και τα οποία είναι τα πιο φυλογεννητικά διατηρημένα γονίδια μέσα σ' όλα τα ευβακτήρια (Weisburg et al., 1991). Τα γονίδια rRNA περιέχουν υψηλά διατηρημένες περιοχές, καθώς και πιο μεταβλητές περιοχές, βρίσκονται εις διπλούν στα χλαμύδια και μεταγράφονται σε εκατοντάδες αντίγραφα rRNA. Τα γονίδια rRNA (Monstein et al. 1996) και τα μόρια rRNA (Iwen et al., 1991) έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση του DNA των *C. trachomatis* και του RNA, αντιστοίχως.



3.2. Φύσιολογία – Μεταβολισμός

Το EB είναι μεταβολικά αδρανές γιατί, ενώ διαθέτει αποθήκη τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) και το ένζυμο ATPάση (Tipples et al., 1993), καμιά από τις μεταβολικές του αντιδράσεις δεν έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή ενέργειας. Βάφεται κατά τη χρώση Castaneda κυανό, κατά τη χρώση Macchiavello ερυθρό και κατά τη χρώση Giemsa πορφυρό.

Το δικτυωτό σωματίο (RB), έχει διάμετρο 800-1000 nm (Palmer et al., 1986). Είναι ελάχιστο λοιμογόνο και αποτελεί τον ενδοκυττάριο αναπαραγωγικό τύπο των χλαμυδίων. Βάφεται υποκύανο με τη χρώση Giemsa.

Μια σημαντική διαφορά, μεταξύ των χλαμυδίων και των ιών, προκύπτει από τη δράση της κυκλοεξαμίδη (Oriol et al., 1982). Η κυκλοεξαμίδη, αναστέλλει τη πρωτεϊνοσύνθεση των ριβοσωμάτων των ευκαρυωτικών κυττάρων, όχι όμως των προκαρυωτικών. Τα χλαμύδια δεν επηρεάζονται από αυτή την ουσία, δηλαδή εναντιθέση με τους ιούς, δεν χρησιμοποιούν τη συσκευή μετάφρασης του κυττάρου-ξενιστή για να συνθέσουν τη δική τους DNA πρωτεΐνη.

Τα χλαμύδια μολονότι διαθέτουν τα μεταβολικά μονοπάτια για να συνθέσουν ATP, θεωρούνται ενεργά παράσιτα διότι χρησιμοποιούν την ATP (τριφωσφορική αδενοσίνη) και την GTP (τριφωσφορική γουανοσίνη) των κυττάρων που τα φιλοξενούν. Οι ουσίες είναι απαραίτητες για τον μεταβολισμό και την αναστροφή τους (Hatch et al., 1982, Φραντζίδου-Αδαμοπούλου, 1999). Επίσης, χρησιμοποιούν μερικά αμινοξέα του κυττάρου ξενιστή, ενώ άλλα αμινοξέα μπορούν να τα συνθέσουν, ανάλογα με το είδος και το στέλεχος των χλαμυδίων.

“Αντοχή” (Persistence) των χλαμυδίων

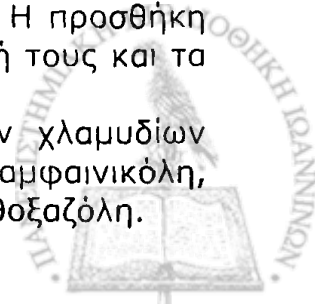
Κάτω από δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως σε έλλειψη γλυκόζης ή αμινοξέων, σε μεταβολές θερμοκρασίας, ή λόγω παρουσίας μη ιδανικών συγκεντρώσεων αντιβιοτικών, τα Chlamydiae μετατρέπονται στη μη αναπαραγωγίμη μορφή, των ανθεκτικών σωματιδίων (Persistent Body, PB), εμφανίζοντας ένα εναλλακτικό μοντέλο γονιδιακής έκφρασης (Mathews et al., 2001), το οποίο τους παρέχει τη δυνατότητα της ενδοκυττάριας επιβίωσης.

Ως «αντοχή των χλαμυδίων» ορίζεται η μακροχρόνια «σχέση» μεταξύ των χλαμυδίων και των κυττάρων-ξενιστών, κατά την οποία τα χλαμύδια παραμένουν ζωντανά, αλλά μη ανιχνεύσιμα στην καλλιέργεια. Πρόκειται για μια διαφοροποίηση από την τυπική ανάπτυξη των χλαμυδίων, που έχει ως αποτέλεσμα μια καθυστερημένη ενδοκυττάρια ανάπτυξη, κάτω από την επίδραση εξωγενών παραγόντων. Τα δικτυωτά σωματίδια (RB) καθυστερούν στην ανάπτυξη τους, αναστέλλεται η διαφοροποίηση των στοιχειωδών σωματιδίων (EB) και παρατηρούνται μορφολογικές παραλλαγές των RB, που χαρακτηρίζονται από μεγάλους, άτυπους χλαμυδιακούς σχηματισμούς.

“Αντοχή” των χλαμυδίων στην κυτταροκαλλιέργεια

Η κυστεΐνη είναι απαραίτητη στην καλλιέργεια για τη βιοσύνθεση τριών πρωτεϊνών πλούσιων σε κυστεΐνη (cysteine-rich proteins): MOMP, 12 και 60Kda, οι οποίες είναι απαραίτητες για τη διαφοροποίηση των RB σε EB. Όταν η κυστεΐνη απουσιάζει, τα χλαμύδια παραμένουν μη λοιμογόνα, αλλά ζωντανά. Η προσθήκη των κατάλληλων αμινοξέων στην καλλιέργεια διεγείρει την ανάπτυξη τους και τα διαφοροποιεί σε λοιμογόνα (Allan et al., 1985).

Επίσης, αρκετά αντιβιοτικά αναστέλλουν την ανάπτυξη των χλαμυδίων στην καλλιέργεια, όπως: πενικιλίνη, αμπικιλίνη, χλωραμφαινικόλη, τετρακυκλίνη, ερυθρομυκίνη, υδροξυουρία, τριμεθοπρίμη-σουλφαμεθοξαζόλη.



Ο Beatty και συν. (1994), περιέγραψαν έναν ανοσολογικό μηχανισμό αντοχής, στον οποίο βασικό ρόλο παίζει η ιντερφερόνη- γ (INF- γ). In vitro, η παρουσία, σε πολύ μικρή ποσότητα, INF- γ , σε καλλιέργεια κυττάρων HeLa 229 μολυσμένων με C.trachomatis ορότυπου A, προκαλεί "αντοχή των χλαμυδίων". Η πλήρης απομάκρυνση της INF- γ αναστρέφει το φαινόμενο, ενώ αυξημένα επίπεδα INF- γ αναστέλλουν πλήρως την ανάπτυξη των χλαμυδίων. In vivo, η INF- γ παράγεται από τα T-κύτταρα και παρεμβαίνει στον μεταβολισμό της τρυπτοφάνης.

Τα C.trachomatis που παρουσιάζουν αντοχή από την παρουσία INF- γ , εμφανίζουν μια ασυνήθιστη ενδοκυττάρια μορφολογία, αλλά και διαφορετική έκφραση των χλαμυδιακών αντιγόνων, με συνεχή σύνθεση ενός ανοσοπαθολογικού αντιγόνου, του hsp-60 και μείωση της σύνθεσης ενός προστατευτικού αντιγόνου, του MOMP. Επίσης, παρουσιάζουν μείωση δομικών συστατικών των C.trachomatis, όπως της 60Kda πρωτεΐνης και των λιποπολυσακχαριτών.

Έρευνες έδειξαν ότι η χορήγηση εξωγενούς τρυπτοφάνης, αναστέλλει την αντοχή λόγω της παρουσίας INF- γ , με αποτέλεσμα την ανάπτυξη τυπικών χλαμυδιακών εγκλείστων.

Η κυκλοεξιμίδη, είναι αναστολέας της πρωτεϊνοσύνθεσης του ξενιστή, και έχει το ίδιο αποτέλεσμα, με τη χορήγηση εξωγενούς τρυπτοφάνης, στην αντοχή λόγω INF- γ .

Άλλος δυνητικός παράγοντας αντοχής in vitro είναι η παρουσία cAMP. Κύτταρα μολυσμένα με C.trachomatis ορότυπου L2, εμφανίζουν μικρά, ανώριμα εγκλείστα, που παραμένουν μη λοιμογόνα λόγω παρουσίας cAMP.

"Αντοχή" των χλαμυδίων in vivo

1. Οφθαλμικές λοιμώξεις: Σε περισσότερο από 20% των περιπτώσεων τραχώματος, ακόμα και παρουσία σοβαρών ανωμαλιών, τα C.trachomatis δεν μπορούν να ταυτοποιηθούν ούτε με καλλιέργεια, ούτε με ανοσοκυτταρολογικές μεθόδους. Φαίνεται ότι τα C.trachomatis παραμένουν ζωντανά στους ιστούς σε λανθάνουσα, μη αναπαραγώγιμη κατάσταση, οδηγώντας προοδευτικά στην τύφλωση ακόμα και μετά από πολλές δεκαετίες.

2. Γενετικές λοιμώξεις: Η λοίμωξη του τραχήλου από C.trachomatis μπορεί να είναι χρόνια και να παραμένει αδιάγνωστη και ασυμπτωματική, μέχρι να φτάσει προοδευτικά στις σάλπιγγες και στους φαλλοπιανούς πόρους. Και σ'αυτές τις λοιμώξεις φαίνεται ότι RB των C.trachomatis παραμένουν ζωντανά και μη λοιμογόνα, προκαλώντας σοβαρές ανοσοπαθολογικές αλλαγές.



3.3. Κάλλιέργεια

Η καλλιέργεια ήταν αρχικά η μέθοδος αναφοράς στην ανίχνευση των *C.trachomatis*, αλλά πλέον αποτελεί μια μη ικανοποιητική μέθοδο για την ανίχνευση των *C.trachomatis* και ακόμη περισσότερο των *C. pneumoniae* (Pekka, 2004). Επιπλέον, η καλλιέργεια των *C.psittaci* είναι γνωστό ότι αποτελεί αιτία εργαστηριακών λοιμώξεων.

Τα δείγματα για καλλιέργεια πρέπει να περιέχουν ζωντανά κύτταρα από την εστία της λοίμωξης, γεγονός που μπορεί να είναι δύσκολο, ιδίως όταν ο λοιμογόνος παράγων έχει διεισδύσει σε εν τω βάθει ιστούς. Τα δείγματα αυτά συλλέγονται σε μέσο που περιέχει σουκρόζη, αμινογλυκοσίδες, βανκομυκίνη και αντιμυκητιακούς παράγοντες.

Οι κυτταρικές σειρές των McCoy κυττάρων, καθώς και των κυττάρων από νεφρά πράσινου πιθήκου, χρησιμοποιούνται συνήθως για την απομόνωση των *C.trachomatis*, ενώ οι κυτταρικές σειρές Hep2 και HL για τα *C.pneumoniae*. Οι ιδανικότερες συνθήκες καλλιέργειας επιτυγχάνονται με την φυγοκέντρηση του δείγματος πάνω από τα κύτταρα και την προσθήκη κυττοστατικών (συνήθως κυκλοεξιμίδης) στο καλλιεργητικό μέσο.

Για την κυτταροκαλλιέργεια των *C. trachomatis* χρησιμοποιούνται οι «πλάκες πολλαπλών υποδοχών» ή «πλάκες με πολλαπλά φρεάτια» (multiwell plates). Αυτές είναι κατάλληλες για ταυτόχρονη επεξεργασία μεγάλου αριθμού δειγμάτων, αλλά παρουσιάζουν διασταυρούμενες επιμολύνσεις. Επίσης, έχουν χαμηλή ευαισθησία λόγω του μικρού όγκου του κλινικού δείγματος που χρησιμοποιούν.

Επίσης για κυτταροκαλλιέργεια χρησιμοποιούνται τα «σωληνάρια με καλυπτρίδα» (shell vials) τα οποία είναι καλύτερα προστατευμένα από επιμολύνσεις.

Τα *C. trachomatis* χρωματίζονται με τη χρώση ιωδίνης. Οι χρώσεις του ανοσοφθορισμού δίνουν ένα πιο ξεκάθαρο αποτέλεσμα. Τα αποτελέσματα της καλλιέργειας ολοκληρώνονται σε 2-3 μέρες. Τα έγκλειστα ανιχνεύονται με μονοκλωνικά αντισώματα, σημασμένα με φλουοροσκεΐνη, τα οποία είναι ειδικά για το MOMP αντιγόνο των *C. trachomatis*.

Τα *C.trachomatis* που βρίσκονται στα κλινικά δείγματα σε μεγάλο βαθμό μπορεί να είναι τοξικά για την κυτταροκαλλιέργεια.

Όταν ένα επιθηλιακό κύτταρο μολύνεται από περισσότερα του ενός EB, τα ενδοσώματα συρρικνώνονται συνήθως, έτσι ώστε κάθε κύτταρο-στόχος να περιέχει μόνο ένα έγκλειστο στο τέλος των διχοτομήσεων. Κάθε έγκλειστο περιέχει 100-1000 λοιμογόνες μονάδες (EB), ποσό που αντιστοιχεί σε 8-12 φορές διπλασιασμό του αρχικού μικροοργανισμού. Τα EB που προκύπτουν, ελευθερώνονται από το κύτταρο-ξενιστή με μια διαδικασία παρόμοια της εξωκύτωσης.

Το αρχικό γεγονός που πυροδοτεί τη μετατροπή του EB σε RB δεν έχει διευκρινισθεί πλήρως. Σημαντικό ρόλο φαίνεται να παίζει η σύνθεση νέων χλαμυδιακών πρωτεϊνών (Moulder, 1991), η ενεργοποίηση της ATPάσης και η εξασθένιση των ισχυρών δισουλφιδικών δεσμών, που συνδέουν εγκαρσίως μεταξύ τους τα μόρια της MOMP πρωτεΐνης (Hatch et al., 1986, Peeling et al., 1989), αλλά και με τις άλλες, πλούσιες σε κυστεΐνη, μεμβρανικές πρωτεΐνες. Αυτή η λιγότερο στερεή δομή του κυτταρικού τοιχώματος, όπως συναντάται στα δικτυωτά σωμάτια, λόγω εξασθένισης των δισουλφιδικών δεσμών (Bavoil et al., 1984, Newhall et al., 1987), ίσως αποτελεί τον παράγοντα κλειδί για την έναρξη της μετατροπής αυτής.



3.4. Κύκλος ανάπτυξης

Τα χλαμύδια είναι υποχρεωτικά ενδοκυττάρια βακτήρια και ο μοναδικός διφασικός τους κύκλος ανάπτυξης είναι κοινός για όλα τα χλαμύδια. Η μόλυνση ξεκινά κατά την επαφή του λαιμογόνου, μεταβολικά ανενεργού, στοιχειώδους σωματιδίου (EB) με το ευπαθές επιθηλιακό κύτταρο (Εικόνα 5 και 6).

Υποδοχείς υπεύθυνοι για αυτή την προσκόλληση δεν έχουν προσδιορισθεί με ακρίβεια, αν και έχουν περιγραφεί υποδοχείς στα επιθηλιακά κύτταρα-στόχους, ή στην επιφάνεια των χλαμυδίων (Wyrick, 1998, Su et al., 1990, Joseph et al., 1991, Joseph et al., 1992). Έχουν ενοχοποιηθεί υποδοχείς σιαλικοί οξέος στα επιθηλιακά κύτταρα του οφθαλμού, του λαιμού, ή των γεννητικών οργάνων, σε περιοχές δηλαδή που δεν είναι εύκολα προσεγγίσιμες από τα φαγοκύτταρα, τα Τα και Β λεμφοκύτταρα (Jones et al., Chlamydial diseases, 2004).

Επίσης, η μοναδική δομή του κυτταρικού τοιχώματος των χλαμυδίων είναι ένας ακόμη παράγων μολυσματικότητας (virulence factor) (Jones et al., Chlamydial diseases, 2004). Φαίνεται ότι τα EB μπορούν να προσκολλώνται στην επιφάνεια του κυττάρου-ξενιστή με γέφυρες ηπαρίνης. Σημαντικό ρόλο παίζουν πρωτεΐνες του συμπλέγματος της εξωτερικής μεμβράνης των χλαμυδίων: η MOMP (major outer membrane protein) και η OmcB η οποία είναι μια πρωτεΐνη πλούσια σε κυστεΐνη (Stephens et al., 2001).

Μετά την προσκόλληση του EB, ακολουθεί η είσοδος του στο κυτταρόπλασμα του ξενιστή με πινοκύτωση (Wyrick, 1998) ή με ενδοκύτωση μέσω υποδοχέα, από ειδικά κοιλώματα-εγκολπώματα της μεμβράνης των επιθηλιακών κυττάρων (Moulder, 1991).

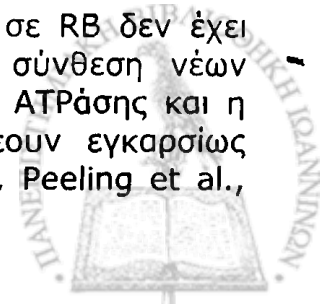
Αξιόπιστα δεδομένα, που υποστηρίζουν τον μηχανισμό της ενδοκύτωσης μέσω υποδοχέα, προκύπτουν από πειράματα με στελέχη τραχώματος των *C.trachomatis* χρησιμοποιώντας ανθρώπινα γεννητικά επιθηλιακά κύτταρα (Wyrick et al., 1989). Τα εντυπώματα που υπάρχουν στην επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων εγκολπώνονται και γίνονται ενδοκυτταροπλασματικά κυστίδια που περιέχουν το EB (Wyrick et al., 1989).

Το 1991, ο Moulder υποστήριξε ότι το ίδιο το κύτταρο-ξενιστής, με τους οξειδωτικές και γλυκολυτικές μεταβολικές του οδούς, συμμετέχει ενεργά στην είσοδο του EB. Σ'αυτό φαίνεται να συμφωνούν και μεταγενέστεροι μελετητές, υποστηρίζοντας τη συμμετοχή της φωσφορυλίωσης της τυροσίνης των πρωτεϊνών του κυττάρου-ξενιστή, καθώς της ακτίνης του κυτταροσκελετού (Rockey, 2002).

Η διαδικασία προσκόλλησης και εισόδου των EB στο κύτταρο-ξενιστή, μπορεί να διαφέρει μεταξύ των ειδών των χλαμυδίων, αλλά και μεταξύ των οροτύπων του ίδιου είδους (Rockey, 2002).

Όταν ένα επιθηλιακό κύτταρο μολύνεται από περισσότερα του ενός EB, τα ενδοσώματα συρρικνώνονται συνήθως, έτσι ώστε κάθε κύτταρο-στόχος να περιέχει μόνο ένα έγκλειστο στο τέλος των διχοτομήσεων. Κάθε έγκλειστο περιέχει 100-1000 λοιμογόνες μονάδες (EB), ποσό που αντιστοιχεί σε 8-12 φορές διπλασιασμό του αρχικού μικροοργανισμού. Τα EB που προκύπτουν, ελευθερώνονται από το κύτταρο-ξενιστή με μια διαδικασία παρόμοια της εξωκύτωσης.

Το αρχικό γεγονός που πυροδοτεί τη μετατροπή του EB σε RB δεν έχει διευκρινισθεί πλήρως. Σημαντικό ρόλο φαίνεται να παίζει η σύνθεση νέων χλαμυδιακών πρωτεϊνών (Moulder, 1991), η ενεργοποίηση της ATPάσης και η εξασθένιση των ισχυρών δισουλφιδικών δεσμών, που συνδέουν εγκαρσίως μεταξύ τους τα μόρια της MOMP πρωτεΐνης (Hatch et al., 1986, Peeling et al.,

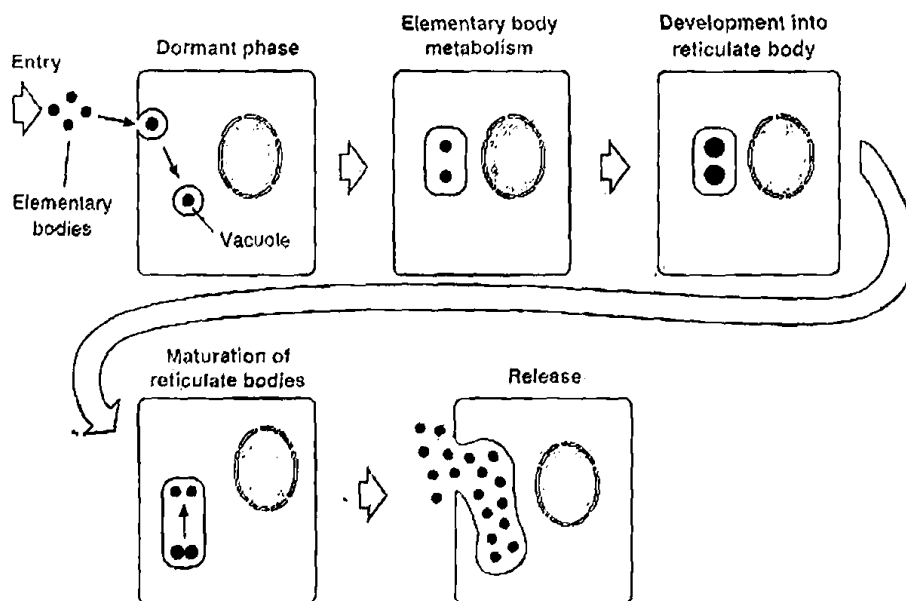


1989), αλλά και με τις άλλες, πλούσιες σε κυστεΐνη, μεμβρανικές πρωτεΐνες. Αυτή η λιγότερο στερεή δομή του κυτταρικού τοιχώματος, όπως συναντάται στα δικτυωτά σωμάτια, λόγω εξασθένησης των δισουλφιδικών δεσμών (Bavoil et al., 1984, Newhall et al., 1987), ίσως αποτελεί τον παράγοντα κλειδί για την έναρξη της μετατροπής αυτής.

Η σύντηξη του νεοεισαχθέντος κυστιδίου από τα λυσοσώματα (Eissenberg et al., 1983), αναστέλλεται με άγνωστο μηχανισμό, επιτρέποντας έτσι στο EB να εδραιωθεί στο κυστίδιο, το οποίο προστατεύεται από μια τροποποιημένη μεμβράνη του κυττάρου-ξενιστή. Το κυστίδιο αυτό ονομάζεται "έγκλειστο". Τα στοιχειώδη σωμάτια (EB) μετατρέπονται σε δικτυωτά σωμάτια (RB). Τα RB διαιρούνται με διχοτόμηση και έχουν χρόνο αναδιπλασιασμού 2-3 ώρες. Τα RB είναι μεταβολικά ενεργά αλλά μη λοιμογόνα. Καθώς αυξάνει ο αριθμός των δικτυωτών σωματίων, το έγκλειστο μεγαλώνει και παίρνει ημισεληνοειδές σχήμα γύρω από τον πυρήνα του κυττάρου-ξενιστή, τον οποίο απωθεί στην περιφέρεια. Στο στάδιο αυτό, τα *C. trachomatis*, όχι όμως και τα *C. psittaci*, συσσωρεύουν στα έγκλειστα τους γλυκογόνο, ιδιότητα που τους επιτρέπει τη χρώση των εγκλειστών με ιώδιο. Αφού πραγματοποιηθούν 8-12 διχοτομήσεις, δηλαδή 20 περίπου ώρες μετά την έναρξη του πολλαπλασιασμού, το RB αρχίζει να συμπυκνώνεται σε EB. Στη φάση αυτή, της μετατροπής του RB σε EB, συντίθενται οι πρωτεΐνες του εξωτερικού συμπλέγματος των χλαμυδίων: OmcB και OmcA, καθώς και δυο πρωτεΐνες-ιστόνες: Hc1 και Hc2, οι οποίες συμμετέχουν στη συμπύκνωση της χρωματίνης του DNA (Barry et al., 1992, Christiansen et al., 1993, Christiansen et al., 2002).

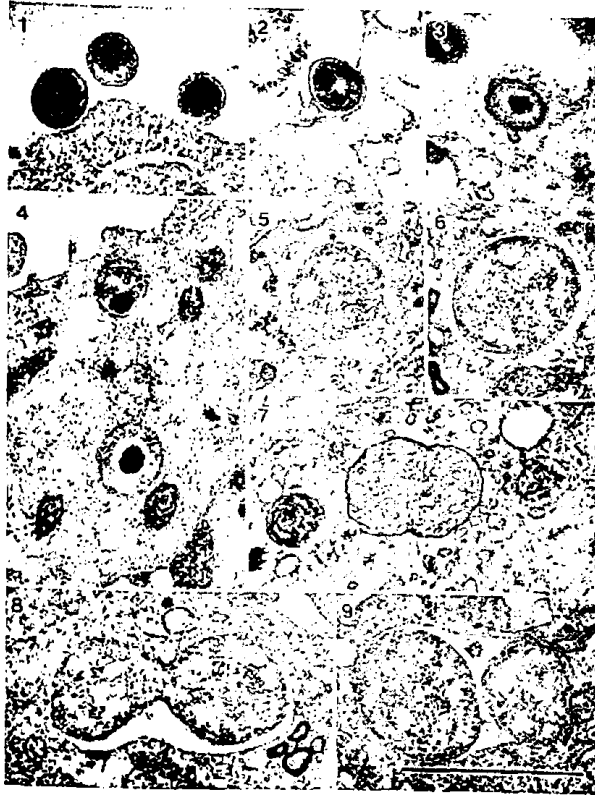
Η συμπύκνωση του δικτυωτού σωματίου (RB) σε στοιχειώδη σωμάτια (EB) οδηγεί σε μείωση του μεγέθους με εκτεταμένη αποβολή των μεμβρανών του κυστιδίου (Stirling et al., 1980).

48-72 ώρες μετά την εισβολή το κύτταρο-ξενιστής λύεται, η μεμβράνη του καταστρέφεται και το ώριμο έγκλειστο ελευθερώνει εκατοντάδες λοιμογόνα στοιχειώδη σωμάτια (EB), τα οποία μπορούν να μολύνουν νέα κύτταρα, ολοκληρώνοντας έτσι τον κύκλο ανάπτυξης των χλαμυδίων.



Εικόνα 5. Κύκλος ανάπτυξης των *Chlamydia trachomatis*



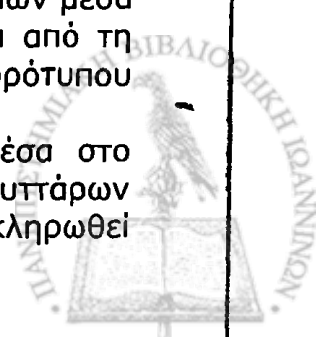


Εικόνα 6. Προσκόλληση και ενδοκυττάρια ανάπτυξη των *C. trachomatis* στα κύτταρα - στόχους, με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. 1 και 2: Προσκόλληση των στοιχειωδών σωματιδίων (EB) στην κυτταρική επιφάνεια. 3 και 4: Ενσωμάτωση στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου με τη μορφή ενός συμπαγούς ενδοκυττάριου κυστιδίου. 5 και 6: Διαφοροποίηση σε δικτυωτό ή αρχικό σωματίδιο (RB). 7,8 και 9: Διχοτόμηση σε EB.

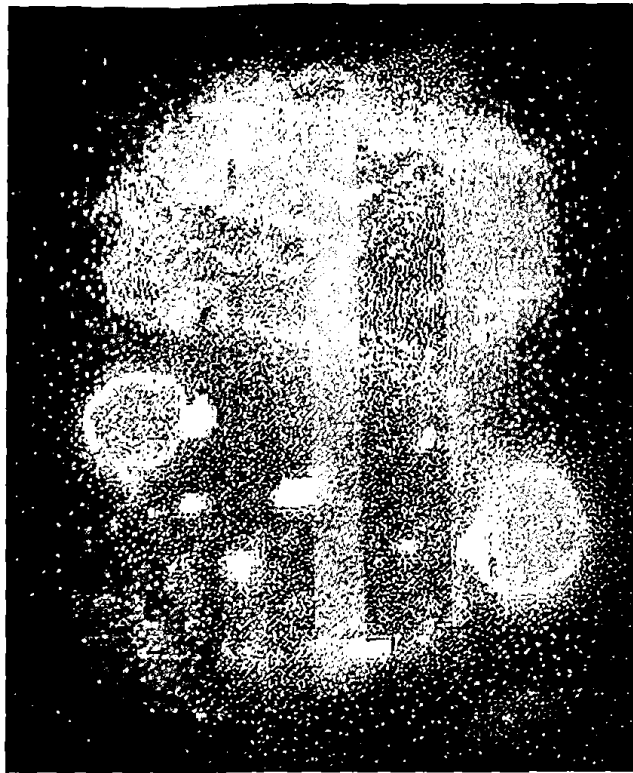
Και στις κυτταροκαλλιέργειες, ο κύκλος αναπαραγωγής των χλαμυδίων, ποικίλει από 48-72 ώρες, διότι μερικά στελέχη ή ορότυποι αναπτύσσονται γρηγορότερα από άλλα. Ειδικότερα, τα στελέχη του αφροδισίου λεμφοκοκκιώματος συνήθως ολοκληρώνουν τον κύκλο αναπαραγωγής τους πιο γρήγορα από εκείνα του τραχώματος. Στο τέλος του κύκλου, τα έγκλειστα που περιέχουν στοιχειώδη σωματίδια από τους ορότυπους του αφροδισίου λεμφοκοκκιώματος, διαρρηγνύονται μέσα στο κύτταρο προκαλώντας λύση και κυτταρικό θάνατο με την απελευθέρωση των στοιχειωδών σωματιδίων (EB) (Todd et al., 1975, Moulder, 1991). Η ίδια αλληλουχία γεγονότων παρατηρείται και στους ορότυπους του τραχώματος, με τη διαφορά ότι τα έγκλειστα τους ελευθερώνουν τα στοιχειώδη σωματίδια χωρίς να σκοτώσουν το κύτταρο-ξενιστή, με μια διαδικασία παρόμοια με την εξωκύττωση (De la Maza et al., 1982, Todd et al., 1985). Αυτή η διαφορά της επίδρασης των χλαμυδίων στο κύτταρο-ξενιστή παραλληλίζεται με την πιο αποτελεσματική, κύτταρο προς κύτταρο, εξάπλωση των στελεχών αφροδισίου λεμφοκοκκιώματος στις κυτταροκαλλιέργειες και στην τάση τους να προκαλούν πιο επιθετική νόσο *in vivo*.

Οι μηχανισμοί ενδοκυττάριας επιβίωσης και ανάπτυξης των χλαμυδίων μέσα στο κύτταρο-ξενιστή, είναι πιθανόν να διευκρινισθούν, όπως προκύπτει από τη μελέτη της βιολογίας του κυττάρου και της γενετικής αλληλουχίας του ορότυπου D των *C. trachomatis* που δημοσιεύθηκε το 1998 (Stephens et al., 1998).

Τα *C. trachomatis* κατά την προσπάθεια εγκατάστασή τους μέσα στο κυτταρόπλασμα, αναστέλλουν την απόπτωση των επιθηλιακών κυττάρων χρησιμοποιώντας μια ποικιλία σημάτων (Fan et al., 1998), μέχρι να ολοκληρωθεί



ο κύκλος ανάπτυξής τους. Τα χλαμύδια εκφράζουν πρωτεΐνες που εντοπίζονται στην κυτταροπλασματική επιφάνεια της μεμβράνης των εγκλείστων, το πρότυπο των οποίων είναι η πρωτεΐνη IncA (Rockey et al., 1997) (Εικόνα 7).



Εικόνα 7. Inc - πρωτεΐνες φθορίζουσες σε ένα κύτταρο μολυσμένο με *C. trachomatis* (πράσινο), με *C. pneumoniae* (κόκκινο, επάνω) και *C. psittaci* (κόκκινα στίγματα, κάτω), δείχνοντας ότι και οι 3 τύποι χλαμυδίων παράγουν χαρακτηριστικές Inc - πρωτεΐνες.

Στα αμυντικά κύτταρα του ξενιστή, όπως τα μακροφάγα, μερικά στελέχη των *C. psittaci*, μπορούν να αναπτυχθούν. Αντιθέτως, τα μακροφάγα περιορίζουν την ανάπτυξη των οροτύπων του LGV και του τραχώματος (Kuo, 1978). Τα ανθρώπινα πολυμορφοπύρρηνα λαμβάνουν και καταστρέφουν τα *C. trachomatis* και τα *C. psittaci* αρκετά αποτελεσματικά. Παρόλα αυτά ένας μικρός αριθμός των μικροοργανισμών παραμένει ζωντανός και δυνητικά ικανός να διαιωνίσει τη λοίμωξη (Register et al., 1986), εξηγώντας τη χρονιότητα μερικών λοιμώξεων (McCormack et al., 1979) και τον μεγάλο αριθμό των ασυμπτωματικών φορέων με ουρογεννητική λοίμωξη από *C. trachomatis* (Stamm et al., 1986).



3.5. Αντιγονική δομή

Οι μικροοργανισμοί που ανήκουν στην οικογένεια Chlamydiae διαθέτουν διάφορα αντιγόνα στην επιφάνειά τους. Διακρίνονται σε αντιγόνα ειδικά του γένους (ή της ομάδας), του είδους και αντιγόνα ειδικά του τύπου. Μολονότι πρόκειται για αντιγονικά σύνθετους μικροοργανισμούς, μόνο μερικά αντιγόνα παίζουν ρόλο στη διάγνωση και στην παθογένεια των χλαμυδίων.

α) Το λιποπολυσακχαριδικό αντιγόνο (lipopolysaccharide-LPS), που εκφράζεται στην επιφάνεια και των τεσσάρων χλαμυδιακών ειδών, είναι το ειδικό του γένους αντιγόνο. Βρίσκεται στα στοιχειώδη και δικτυωτά σωμάτια, είναι θερμοανθεκτικό και συνδέει το συμπλήρωμα. Αποτελεί ένα σύμπλοκο μιας λιποπολυσακχαριδικής πρωτεΐνης με έναν όξινο πολυσακχαρίτη ως αντιγονικό καθοριστή, με ανοσοεπικρατέστερη ομάδα ένα κετο-δεοξυ-οκτανοϊκό οξύ. Το LPS αντιγόνο είναι ανάλογο με το LPS αντιγόνο άλλων Gram αρνητικών βακτηρίων (Nurminen et al., 1983), ιδίως του γένους Salmonella, με τα οποία έχουν αναφερθεί διασταυρούμενες ανοσολογικές αντιδράσεις.

β) Η «μείζων πρωτεΐνη της εξωτερικής μεμβράνης» (major outer membrane protein, MOMP ή omp1 πρωτεΐνη) αποτελεί μέρος του «μείζονος πρωτεϊνικού συμπλέγματος της εξωτερικής μεμβράνης» (major outer membrane protein complex). Αυτό το πρωτεϊνικό σύμπλεγμα εκφράζεται στην επιφάνεια όλων των χλαμυδιακών μικροοργανισμών. Η «μείζων πρωτεΐνη της εξωτερικής μεμβράνης» (major outer membrane protein, MOMP ή omp1 πρωτεΐνη) αποτελεί το 60% αυτού του πρωτεϊνικού συμπλέγματος και είναι το κυρίαρχο αντιγόνο (Campbell et al., 1990, Zhong et al., 1990).

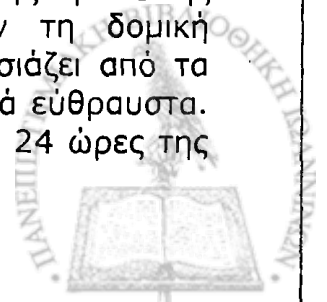
Η MOMP πρωτεΐνη, η οποία είναι παρούσα σε όλα τα χλαμυδιακά είδη, αποτελείται από 5 διατηρημένα τμήματα και 4 μεταβλητά (I, II, III και IV) τα οποία διαφέρουν σημαντικά μεταξύ των διαφόρων ειδών (Yuan et al., 1989), (Zhang et al., 1989).

Στο μεταβλητό τμήμα IV της πρωτεΐνης MOMP βρίσκεται ένας ειδικός του είδους επίτοπος για όλα τα C.trachomatis (Stephens et al., 1988, Toye et al., 1990). Αντισώματα έναντι αυτού του επιτόπου έχουν χρησιμοποιηθεί με αποτέλεσμα την ανίχνευση των C.trachomatis και όχι των άλλων ειδών του γένους Chlamydia (Zhong et al., 1990). Επιπλέον, η πρωτεΐνη MOMP διαθέτει στα μεταβλητά τμήματά της μια ποικιλία επιτόπων που αποτέλεσαν την αντιγονική βάση για περαιτέρω υποδιαίρεση των C.trachomatis σε ορότυπους (Stephens et al., 1988).

Μια ακόμα σημαντική παρατήρηση είναι ότι, πολυκλωνικά και μονοκλωνικά αντισώματα έναντι της πρωτεΐνης MOMP φάνηκε ότι εξουδετερώνουν τη μολυσματικότητα του ζωντανού οργανισμού (Caldwell et al., 1982). Αυτή η παρατήρηση έδωσε ελπίδες ότι η πρωτεΐνη MOMP θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για τη δημιουργία προστατευτικού εμβολίου. Δυστυχώς, αυτό παραμένει ακόμη ανέφικτο (Mabey et al., 2003).

Η πρωτεΐνη MOMP φαίνεται ότι λειτουργεί σαν ένα μεμβρανικό κανάλι ή σαν μια πουρίνη διαπερατή από το ATP. Πιθανόν τα αντισώματα έναντι της πρωτεΐνης MOMP, μπλοκάρουν την κυτταρική λειτουργία, εμποδίζοντας την πρόσληψη του ATP από το κύτταρο-ξενιστή (Wyllie et al., 1998).

Επίσης, οι δισουλφιδικοί δεσμοί που αναπτύσσονται μεταξύ της πρωτεΐνης MOMP και των άλλων μεμβρανικών πρωτεϊνών, εξασφαλίζουν τη δομική σταθερότητα των στοιχειωδών σωματιδίων (EB). Αυτή δομή απουσιάζει από τα δικτυωτά σωμάτια (RB), τα οποία και γι'αυτό το λόγο είναι ωσμωτικά εύθραυστα. Οι πρωτεϊνικοί δεσμοί φαίνεται ότι εμφανίζονται κατά τις τελευταίες 24 ώρες της



ενδοκυττάριας φάσης του αναπαραγωγικού κύκλου των χλαμυδίων (Newhall, 1987).

- Δυο ακόμα πρωτεΐνες, έχει γίνει γνωστό ότι αποτελούν μέρος της μεμβράνης των *C.trachomatis*, ανήκουν στο «μείζων πρωτεϊνικό σύμπλεγμα της εξωτερικής μεμβράνης» και φέρουν επιτόπους ειδικούς του γένους (Mondesire et al., 1989):

γ) Η «outer membrane protein» (omp2), η οποία είναι πλούσια σε κυστεΐνη και γι'αυτό ονομάζεται και cystein-rich 60 Kda protein (60KdaCrP) (Mondesire et al., 1989, Coles et al., 1990) και

δ) Η «60Kda heat shock protein» (HSP60) (Yuan et al., 1992).

Ορότυποι

Αρχικά, τα *C.trachomatis* διακρίθηκαν σε 15 ορότυπους (A, B, Ba, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L1, L2, L3) από τους Wang και Grayston (Wang et al., 1970, Wang et al., 1973, Wang et al., 1974, Wang et al., 1975) με την τεχνική του μικροανοσοφθορισμού (micro-IF). Η MOMP πρωτεΐνη είναι υπεύθυνη για τις περισσότερες αντιδράσεις που πραγματοποιούνται με την τεχνική αυτή.

Οι τρεις ορότυποι L1, L2 και L3 συσχετίστηκαν με το LGV. Οι υπόλοιποι δώδεκα ορότυποι συσχετίστηκαν με οφθαλμο-γενετική νόσο: τα στελέχη A, B, Ba και C, με το οφθαλμικό ενδημικό τράχωμα και τα στελέχη D έως K, με «επιπεφυκίτιδα εξ εγκλείστων» και νόσο του ουροποιογεννητικού συστήματος, κυρίως σε μη ενδημικές περιοχές, και με την νεογνική πνευμονία. Περιστασιακά, ορότυποι B και Ba έχουν απομονωθεί από το γεννητικό σύστημα, ενώ οι A και C δεν έχουν απομονωθεί.

Σε μεταγενέστερες μελέτες, τα *C.trachomatis* ταξινομήθηκαν σε 18 ορότυπους (serotyping). Συγκεκριμένα, με τη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων επιβεβαιώθηκε η αρχική διαίρεση των *C.trachomatis* σε 15 ορότυπους (Newhall et al., 1982, Wang et al., 1985, Βρεττού και συν., 1992), ενώ επιπλέον, αναγνωρίστηκαν τρεις καινούργιοι ορότυποι: Da, Ia και L2a (Wang et al., 1991, Vretou et al., 1992). Αυτή η ταξινόμηση βασίστηκε στην ανάλυση των ανοσοεπιτόπων του MOMP αντιγόνου με μονοκλωνικά αντισώματα. Απαιτούσε ως εκ τούτου, πολλές κυτταρικές σειρές και μεγάλο «panel» μονοκλωνικών αντισωμάτων.

Τα τελευταία χρόνια η μελέτη της αλληλουχίας του DNA του MOMP γονιδίου, με μοριακές μεθόδους, οι οποίες χρησιμοποιούν εκκινητές (primers) έναντι αλληλουχιών που κωδικοποιούν τα μεταβλητά τμήματα της MOMP πρωτεΐνης, είναι δυνατή η διάκριση των διαφόρων στελεχών των *C. trachomatis* (genotyping).

Ειδικότερα, εφαρμόζεται η RFLP (Restriction Frangment Length Polymorphism) για την ενίσχυση του omp-1 γονιδίου, το οποίο κωδικοποιεί και το MOMP αντιγόνο. Το omp-1 γονίδιο είναι η αλληλουχία-στόχος της RFLP. Αρχικά το omp-1 γονίδιο ενισχύεται με PCR. Το προϊόν πέπτεται με περιοριστικά ένζυμα. Ακολουθεί η ηλεκτροφόρηση, κατά την οποία κάθε είδος χλαμυδίων θα δώσει χαρακτηριστική «μπάντα».

Η μέθοδος αυτή βοηθά στην οροτυπία και γενοτυπία των *C.trachomatis* (Gaydos et al., 1992, Lampe et al., 1993) αποτελώντας έτσι ένα γρήγορο και

ισχυρό μέσο για επιδημιολογικές μελέτες των *C.trachomatis* και συσχέτισή τους με την παθογένεια.

Σήμερα, με τη βοήθεια των μεθόδων αυτών, τα *C.trachomatis* διακρίνονται σε 19 ορότυπους (Fredlund et al., 2004). Ειδικότερα, τα στελέχη του αφροδίσιου λεμφοκοκκιώματος περιλαμβάνουν 4 ορότυπους και του τραχώματος 15 ορότυπους.

Οι 4 ορότυποι του αφροδίσιου λεμφοκοκκιώματος (L1, L2, L2a και L3) είναι σπάνιοι. Όλοι είναι σεξουαλικά μεταδιδόμενοι, μολονότι οι οφθαλμοί μπορούν να αποτελέσουν πύλη εισόδου.

Οι 15 ορότυποι του τραχώματος υποδηλώνονται με τα γράμματα: A έως K και επιπλέον: Ba, Da, Ia και Ja. Συγκεκριμένα, οι ορότυποι A, B, Ba και C αποικίζουν τους οφθαλμούς προκαλώντας τράχωμα, ενώ οι ορότυποι D έως K και επιπλέον οι Da, Ia και Ja προκαλούν γενετικές λοιμώξεις.

Ο Fredlund και συν. (2004), από ανασκοπικές μελέτες των τελευταίων ετών διαπίστωσαν ότι, ο γενότυπος E φαίνεται να είναι ο συχνότερος, στα πιο πολλά μέρη του κόσμου που παρουσιάζουν αυξημένη συχνότητα χλαμυδιακών λοιμώξεων. Ως εκ τούτου, εάν μελλοντικά αναπτυχθεί κάποιο προστατευτικό εμβόλιο θα ήταν προτιμότερο να προφυλάσσει από τον γενότυπο E.

Σύμφωνα με τους ίδιους ερευνητές, δεν προτείνεται η γενοτυπία (genotyping) των *C. trachomatis* σε γεωγραφικές περιοχές με χαμηλή συχνότητα, λόγω της μικρής γενετικής ποικιλίας των χλαμυδίων (Fredlund et al., 2004).

Τέλος, η γενοτυπία των *C. trachomatis* θα μπορούσε να παίξει έναν σημαντικό ρόλο σε ειδικές περιπτώσεις, όπως σε περιπτώσεις σεξουαλικής κακοποίησης.



4. ΟΪΚΟΛΟΓΙΑ – ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

4.1. ΤΡΟΠΟΙ ΜΕΤΑΔΟΣΗΣ

Μετάδοση μεταξύ σεξουαλικών συντρόφων :

Ο κίνδυνος μετάδοσης των *C. trachomatis* μετά από σεξουαλική επαφή χωρίς προφύλαξη με ένα μολυσμένο σύντροφο είναι άγνωστος. Η προσωπική συνέντευξη-ιστορικό και οι ευαίσθητες μοριακές μέθοδοι μπορούν να βοηθήσουν προς αυτήν την κατεύθυνση.

Σε μια πρόσφατη μελέτη στη Γερμανία αναζητήσαν *C. trachomatis* σε άνδρες και γυναίκες από 1690 ζευγάρια χρησιμοποιώντας LCR στο πρώτο ρεύμα ούρων (Clad et al., 2001). Μελετήθηκαν γυναίκες που προσέρχονταν σε Γυναικολογικές κλινικές για έλεγχο ρουτίνας. Κανένας από τους δυο συντρόφους δεν ανέφερε συμπτώματα πριν την εξέταση. Τουλάχιστον ένας από τους δυο συντρόφους ήταν μολυσμένος με *C. trachomatis* σε ποσοστό 4,6% (78/1690). Σε αυτά τα 78 ζευγάρια, 35% εμφάνιζαν λοίμωξη και οι δυο σύντροφοι, 19% μόνο οι γυναίκες και 46% μόνο οι άνδρες. Η ταυτόχρονη λοίμωξη και των δυο συντρόφων αύξανε αντιστρόφως ανάλογα με την ηλικία. Έτσι σε ζευγάρια στα οποία η γυναίκα ήταν κάτω από 25 ετών και ο άνδρας κάτω από 30 ετών, η συχνότητα λοίμωξης και των δυο ήταν 48% και δεν επηρεαζόταν από τη διάρκεια της σχέσης.

Σε μια άλλη μελέτη που έγινε σε Ουρολογικές κλινικές στις ΗΠΑ (Quinn et al., 1996), σε 17% των ζευγαριών (101/494) τουλάχιστον σε έναν από τους δυο συντρόφους ανιχνεύθηκαν *C. trachomatis* σε ουρηθρικά δείγματα ανδρών ή σε ενδοτραχηλικά δείγματα γυναικών. Και στους δυο συντρόφους βρέθηκαν *C. trachomatis* σε ποσοστό 53% (53/101), 22% (23/105) μόνο στους άνδρες και 24% (25/105) μόνο στις γυναίκες.

Συμπερασματικά, σε ζευγάρια στα οποία στον ένα τουλάχιστον σύντροφο ανιχνεύθηκαν *C. trachomatis*, η πιθανότητα και ο άλλος σύντροφος να έχει μολυνθεί είναι 40 - 60%. Δηλαδή, η αμφίδρομη-οριζόντια μετάδοση των *C. trachomatis*, ιδιαίτερα στα νεαρά ζευγάρια, είναι σχετικά συχνή. Η μετάδοση λοίμωξης στο σεξουαλικό σύντροφο σχετίζεται με τη συχνότητα των επαφών (Blythe et al., 1988), αλλά και με βιολογικούς παράγοντες του «λήπτη». Ειδικότερα, η σχετική αντίσταση στη λοίμωξη των πιο ηλικιωμένων γυναικών, ίσως να είναι αποτέλεσμα των αμυντικών χαρακτηριστικών της βλέννης ή του πιο ώριμου τραχηλικού επιθηλίου. Ο κίνδυνος μετάδοσης της λοίμωξης στις γυναικών από τους συντρόφους τους, μειώνεται όσο αυξάνει η ηλικία των γυναικών, ενισχύοντας έτσι την υπόθεση ότι υπάρχουν βιολογικοί παράγοντες στις πιο ηλικιωμένες γυναίκες, που δρουν προστατευτικά έναντι της εμφάνισης της λοίμωξης και προάγουν την κάθαρση της λοίμωξης στις γυναίκες που έχουν ήδη μολυνθεί (Norman, 2002).

Κάθετη μετάδοση

Λίγες μελέτες υπάρχουν σχετικά με τον κίνδυνο μετάδοσης των *C. trachomatis* από μολυσμένες μητέρες στο μωρό, στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν μοριακές μέθοδοι. Η πιθανότητα μετάδοσης φαίνεται να είναι της τάξης του 40 - 60%. Σε μια μελέτη στην Κίνα, όπου στο 14% (39/278) των γυναικών ανιχνεύθηκαν *C. trachomatis* με PCR (Wu et al., 1999), η συχνότητα της κάθετης μετάδοσης (δηλ. στη μητέρα και στο μωρό ανιχνεύθηκαν *C. trachomatis* με PCR) ήταν 55% (11/20). Σε μια μελέτη στη Φινλανδία σε μωρά που γεννήθηκαν πρόωρα, ανιχνεύθηκε *C. trachomatis* DNA στο 55% (11/20) των μωρών που γεννήθηκαν ή από μητέρες οροθετικές για *C. trachomatis* ή από μητέρες στις

οποιές είχε ανιχνευθεί *C.trachomatis* DNA. Σύμφωνα με τα ανωτέρω είναι και τα ποσοστά μετάδοσης στα οποία κατέληξε έρευνα στο Seattle, όπου ανιχνεύθηκαν *C.trachomatis* με ορολογικές μεθόδους (Bell et al., 1994).

Μετάδοση του τραχώματος

Στις περιοχές που ενδημεί το τράχωμα φορείς των *C. trachomatis* είναι οι μύγες και οι μολυσμένες με εκκρίσεις πετσέτες.

4.2. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ ΛΟΙΜΩΞΗΣ ΑΠΟ C. TRACHOMATIS

Η ηλικία: Η νεαρή ηλικία (κάτω από 20 ή 25 χρονών) βρέθηκε ότι αποτελεί παράγοντα κινδύνου σε αρκετές μελέτες, όπως σε μια μελέτη σε εθνικό επίπεδο στη Μ. Βρετανία σε μη επιλεγμένο γυναικείο πληθυσμό (Fenton et al., 2001), σε γυναίκες που ελέγχονταν για τεστ Παπανικολάου (Grun et al., 1997), σε γυναίκες που υπηρετούσαν στο στρατό (Gaydos et al., 1998), σε γυναίκες που προσέρχονταν σε τμήματα επειγόντων περιστατικών (Todd et al., 2001), που νοσηλεύονταν σε ουρολογικές κλινικές (Hiltunen-Back et al., 2001), σε γυναίκες που επιθυμούσαν διακοπή κύησης και σε γυναίκες που προσέρχονταν για περιγεννητική φροντίδα (Ryan et al., 1990). Επίσης, η επαναμόλυνση (re-infection) ήταν πιο συχνή σε γυναίκες κάτω των 25 ετών σε σχέση με μεγαλύτερες γυναίκες (Xu et al., 2000, Barnett et al., 2001, Burstein et al., 2001). Γενικότερα η λοίμωξη είναι 5 έως 8 φορές πιο συχνή σε γυναίκες κάτω των 20-25 ετών, σε σχέση με γυναίκες άνω των 30-35 ετών.

Η αυξημένη συχνότητα των *C. trachomatis* στις νεαρές ηλικίες αποτελεί ίσως απόρροια της σεξουαλικής συμπεριφοράς τους, αλλά πιθανόν να έχει βιολογική και/ή ανοσολογική βάση. Συγκεκριμένα, έχει αποδοθεί σε ανατομικές διαφορές του τραχήλου των νεαρών γυναικών, ιδιαίτερα του μεταβατικού επιθηλίου, που αποτελεί την αρχική θέση-στόχο των *C.trachomatis*.

Αυτός πιθανόν να είναι ο λόγος που παρατηρείται κάποιες φορές αυτόματη ίαση της χλαμυδιακής λοίμωξης, χωρίς θεραπεία, στις μεγαλύτερες ηλικίες γυναικών, καθώς και η μειωμένη πιθανότητα ταυτόχρονης λοίμωξης των ζευγαριών στα οποία ο ένας έχει λοίμωξη από *C. trachomatis*.

Ο αριθμός των σεξουαλικών συντρόφων: Η πιθανότητα λοίμωξης από *C. trachomatis* είναι σημαντικά μεγαλύτερη στις γυναίκες που αναφέρουν δύο ή περισσότερους σεξουαλικούς συντρόφους είτε τον τελευταίο χρόνο (3 φορές πιο συχνή σε σχέση με τις γυναίκες με έναν σεξουαλικό σύντροφο τον τελευταίο χρόνο) (Grun et al., 1997, Burstein et al., 2001, Fenton et al., 2001, Todd et al., 2001), είτε τις τελευταίες 90 ημέρες (1,4 φορές πιο συχνή) (Gaydos et al., 1998), συγκριτικά με γυναίκες που είχαν έναν ή κανέναν νέο σεξουαλικό σύντροφο στη διάρκεια αυτής της περιόδου. Οι πολλαπλοί σεξουαλικοί σύντροφοι στο πρόσφατο παρελθόν παραμένουν σημαντικός παράγοντας κινδύνου ακόμα και όταν δεν υπάρχουν άλλοι επιβαρυντικοί παράγοντες, όπως η ηλικία, εφόσον αυξάνεται η πιθανότητα ένας από αυτούς τους συντρόφους να είναι μολυσμένος.

Άλλοι παράγοντες κινδύνου: Η μαύρη φυλή (Gaydos et al., 1998, Groseclose et al., 1999), η μη χρήση προφυλακτικού (Gaydos et al., 1998, Dowe et al., 1999, Burstein et al., 2001, Fenton et al., 2001), οι φτωχές κοινωνικο-οικονομικές συνθήκες (Cates et al., 1991, Λώλης Δ. 1995, Weinstock et al., 1994), και συνυπάρχων σεξουαλικό μεταδιδόμενο νόσημα (όπως τριχομονάδες, γονοκοκκική λοίμωξη, κ.α.) (Magder et al., 1988), βρέθηκε ότι σχετίζονται σε μικρότερο βαθμό με χλαμυδιακή λοίμωξη. Επίσης, σε μελέτες στις οποίες έλαβαν

υπόψιν το είδος της κλινικής, διαπιστώθηκε ότι η συχνότητα *C. trachomatis* είναι πιο μεγάλη στις Ουρολογικές κλινικές ως προς του Οικογενειακού Προγραμματισμού ή τις Γυναικολογικές κλινικές (Dowe et al., 1999, Burstein et al., 2001). Η χρήση αντισυλληπτικών φαρμάκων, συνδέεται με τραχηλική χλαμυδιακή λοίμωξη, όχι όμως με πυελική φλεγμονώδη νόσο (PID) (Harrison et al., 1985, Cottingham et al., 1992, Han et al., 1993).

Η αξιολόγηση των ανωτέρω παραγόντων κινδύνου μπορεί να βοηθήσει ώστε τα προγράμματα μαζικού ελέγχου του πληθυσμού (screening programs) να γίνουν πιο αποτελεσματικά και να εξοικονομηθούν χρήματα.

4.3. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Τις τελευταίες δυο δεκαετίες μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα σεξουαλικά μεταδιδόμενα νοσήματα, λόγω της ευρείας διασποράς τους αλλά και των κινδύνων που εγκυμονούν. Έτσι, το ενδιαφέρον για τα «παραδοσιακά» αφροδίσια νοσήματα, όπως η γονόρροια και η σύφιλη, έχει συμπεριληφθεί στη γενικότερη ανησυχία του ιατρικού κόσμου γύρω από σύνδρομα που σχετίζονται με τα: *C. trachomatis*, Herpes simplex virus (HSV), Human papilloma virus (HPV) και τα τελευταία χρόνια οι ιδιάζουσες συνθήκες που προκαλούνται από τον ιό της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (Human immunodeficiency virus, HIV). Μελέτες έχουν δείξει (Laga et al., 1993), ότι γυναίκες με λοίμωξη από *C. trachomatis* έχουν 3-5 φορές μεγαλύτερη πιθανότητα να προσβληθούν από τον ιό HIV. Επομένως, η θεραπεία των χλαμυδιακών λοιμώξεων θα μπορούσε να καθυστερήσει την εξάπλωση του HIV σε μερικές ομάδες πληθυσμού.

Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO) υπολογίζει ότι 92 εκατ. νέα περιστατικά λοίμωξης από *C. trachomatis* εμφανίζονται παγκοσμίως κάθε χρόνο (WHO, 2001). Είναι το πιο συχνό και ευρέως διαδεδομένο, σεξουαλικά μεταδιδόμενο νόσημα στις ΗΠΑ, όπου υπολογίζεται ότι πάνω από 4 εκατομ. νέα περιστατικά λοίμωξης εμφανίζονται κάθε χρόνο και περίπου 3 εκατομ. στην Ευρώπη ((WHO, 1990). Στις ΗΠΑ τα τελευταία 15 χρόνια τα νέα περιστατικά αυξήθηκαν σημαντικά από 78,5 περιστατικά ανά 100,000 κατοίκους το 1987, σε 404 νέα περιστατικά ανά 100,000 χιλιάδες το 2000 (CDC, 2002). Παρόμοια αύξηση παρατηρήθηκε και σε άλλες χώρες όπως τη Μεγ.Βρετανία. Το γεγονός αυτό πιθανόν να οφείλεται στην ευρύτερη εφαρμογή προγραμμάτων ελέγχου, στις βελτιωμένες διαγνωστικές μεθόδους (όπως είναι οι μοριακές μέθοδοι) και στην καλύτερη καταγραφή των περιστατικών και όχι σε πραγματική αύξηση της επίπτωσης της νόσου. Αντιθέτως, σε χώρες όπου υπάρχουν εθνικά προγράμματα καταγραφής της νόσου, όπως στη Σουηδία (Egger et al., 1998), παρατηρήθηκε μείωση της συχνότητας της νόσου τα τελευταία 10-20 χρόνια. Για παράδειγμα, σε γυναίκες που συμμετείχαν σε ένα εθνικό πρόγραμμα, παρατηρήθηκε μείωση της συχνότητας της νόσου κατά 33% από το 1990 έως το 1997 (Mertz et al., 2001).

Το άμεσο και έμμεσο ετήσιο κόστος των χλαμυδιακών λοιμώξεων στις ΗΠΑ υπολογίζεται στα 2,4 δις. δολάρια (Washington et al., 1986, Washington et al., 1987, CDC, 1993).

Η συχνότητα των *C. trachomatis* εξαρτάται τόσο από την ηλικία, ώστε δεν είναι δυνατή η μελέτη της συχνότητάς τους χωρίς να λαμβάνεται υπόψιν η ηλικία (Norfman, 2002). Στις ΗΠΑ, 1 στις 10 έφηβες που εξετάζονται για χλαμύδια, βρίσκονται θετικές για *C. trachomatis*. Οι έφηβες φαίνεται να φέρουν το μεγαλύτερο ποσοστό χλαμυδιακών λοιμώξεων. Κορίτσια ηλικίας 15-19 ετών, αποτελούν το 46% του συνολικού πληθυσμού με *C. trachomatis*, ενώ γυναίκες

ηλικίας 20-24 ετών, αντιπροσωπεύουν το 33% αυτού (Washington et al., 1987, Sexually Transmitted Disease Resource – 2002). Στη Μ. Βρετανία, υπολογίζεται ότι 5-12% των σεξουαλικά ενεργών ενηλίκων, είναι μολυσμένοι με *C.trachomatis* (Smith et al., 1991, Oakeshott et al., 1995, STD quarterly report. Comm Dis Rep CDR Rev., 1995), ενώ σε μια έρευνα που μελέτησε τη σεξουαλική συμπεριφορά γυναικών ηλικίας 18-24 χρόνων στη Μεγ. Βρετανία, ανιχνεύθηκαν *C. trachomatis* σε δείγματα ούρων με την LCR σε ποσοστό 3% (Fenton et al., 2001).

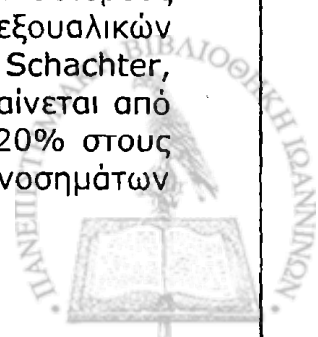
Στη Γαλλία, σύμφωνα με το Εθνικό Δίκτυο Χλαμυδιακών Λοιμώξεων, το 1996, ανιχνεύθηκαν *C.trachomatis*, στο 2-4% των γυναικών. Από το 1990, στη Γαλλία, η λοίμωξη από *C.trachomatis* βρίσκεται σε μείωση. Από το 1990-1996, ελαττώθηκε κατά 51% και από το 1995-1996 κατά 12%. Η πλειοψηφία των ασθενών (ποσοστό 64%) ήταν ηλικίας 20-34 ετών, με μια υπερίσχυση στις ηλικίες 20-24 ετών (ποσοστό 26%) (Reseau National de Sante Publique, 1996).

Στην Ιταλία, η συχνότητα της λοίμωξης ποικίλει από περιοχή σε περιοχή, με μεγαλύτερη συχνότητα στο Νότο από ότι στο Βορρά. Το Εθνικό Ινστιτούτο Υγείας της Ιταλίας, αναφέρει ότι, η συχνότητα του γυναικείου πληθυσμού με χλαμυδιακή λοίμωξη κυμαίνεται από 2-6%, 2-15% στις έγκυες γυναίκες και 11-30% στις γυναίκες που επισκέπτονται τα κέντρα σεξουαλικών μεταδιδόμενων νοσημάτων (Guaschino et al., 2000). Το European Collaboratory Study (Bassiri et al., 1997, Guaschino et al., 1997), αναφέρει ότι, στην Ιταλία υπάρχει χαμηλότερη συχνότητα νόσου στις γυναίκες που απευθύνονται στα Centers for Contraceptive Advice (2,3%), από ότι στις χώρες της Ανατ. Ευρώπης (3-5%) και στη Μ. Βρετανία (4,2%).

Η συλλογή των στοιχείων για τον προσδιορισμό της συχνότητας των χλαμυδιακών λοιμώξεων είναι δυστυχώς δύσκολη. Διάφοροι μελετητές (Stamm et al. 1990, Cates et al., 1991), αποδίδουν την αποτυχία ελέγχου των χλαμυδιακών λοιμώξεων και των επιπλοκών τους, σε ποικίλους παράγοντες:

1. Στην ανεπαρκή υλικοτεχνική υποδομή, όπως στη χρήση μεθόδων με χαμηλή ευαισθησία και ειδικότητα, ή στο υψηλό κόστος των σύγχρονων τεχνικών,
2. Στη μη συμμόρφωση των ασθενών στη θεραπεία, που μέχρι πρόσφατα ήταν θεραπεία τουλάχιστον 10 ημερών και πολλαπλών δόσεων, αλλά κυρίως
3. Στην ιδιαιτερότητα της νόσου να έχει ήπια ή μη ειδικά συμπτώματα, ή να παραμένει ασυμπτωματική σε πολύ μεγάλο ποσοστό ασθενών: περίπου 70% των γυναικών και πάνω από 50% των ανδρών (Schachter et al., 1983, Stamm et al., 1986, Zelin et al., 1995). Έτσι, το «ρεζερβουάρ» της νόσου είναι υψηλό και αποτελείται κυρίως από νεαρά, σεξουαλικά ενεργά άτομα, που μεταδίδουν τη νόσο στους σεξουαλικούς τους συντρόφους. Επιπλέον επιβαρυντικός παράγων είναι ότι η προστασία που αφήνει η νόσος δεν είναι προστατευτική και μόνιμη. Γι'αυτό είναι συχνές οι υποτροπιάζουσες λοιμώξεις (Pearlman et al., 1992). Μελέτες έχουν δείξει ότι το 38% των ασθενών με χλαμυδιακή λοίμωξη εμφανίζουν υποτροπή αυτής μέσα στα επόμενα 3 χρόνια (Blythe et al., 1992) και ότι ο κίνδυνος να εμφανισθούν οι επιπλοκές της νόσου, όπως έκτοπες εγκυμοσύνες ή στειρότητα, αυξάνει μετά από κάθε επεισόδιο επαναλοίμωξης (Martin, 1990, Hillis et al., 1994).

Κατά μέσο όρο, η συχνότητα των χλαμυδιακών λοιμώξεων στις, σεξουαλικά ενεργά, έφηβες γυναίκες – η οποία ηλικιακή ομάδα έχει και τους περισσότερους παράγοντες κινδύνου – ξεπερνά το 10% και σε μερικά κέντρα σεξουαλικών μεταδιδόμενων νοσημάτων φτάνει το 40% (Batteiger et al., 1987, Schachter, 1989, CDC, 1993). Η συχνότητα στους ασυμπτωματικούς άνδρες κυμαίνεται από 4-10% (Rietmeijer et al., 1991, McNaghy et al., 1992) και από 15-20% στους άνδρες που επισκέπτονται κέντρα σεξουαλικών μεταδιδόμενων νοσημάτων (Stamm et al., 1984).



Οι έγκυες γυναίκες παρουσιάζουν λοίμωξη του γεννητικού συστήματος από *C.trachomatis* (ασυμπτωματική, ή πολύ-συμπτωματική) σε ποσοστά που ποικίλουν από χώρα σε χώρα, από 2-47% (Myhre et al., 1982, CDC, 1985).

Η μετάδοση στο νεογνό, κατά τη γέννηση έχει υψηλό ποσοστό, 50-70% (Bell et al., 1994, Postema et al., 1996, Schachter et al., 1986, Bell et al., 1987).

5. ΛΟΙΜΟΓΟΝΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ – ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ

Είναι περιορισμένος ο αριθμός του τύπου των κυττάρων που μπορούν να μολυνθούν από *C.trachomatis*. Συγκεκριμένα, τα λοιμογόνα στοιχειώδη σωμάτια προσκολλώνται στα κυλινδρικά επιθήλια ή στα κύτταρα που βρίσκονται στη ζώνη μετάπτωσης σε επιθηλιακά κύτταρα, τα οποία βρίσκονται στους βλεννογόνους της ουρήθρας, του ενδοτραχήλου, του ενδομητρίου, των σαλπίνγων, του πρωκτού, του αναπνευστικού συστήματος των νεογνών και του επιπεφυκότα. Στους άνδρες είναι δυνατόν να μολυνθούν η επιδιδυμίδα και ο προστάτης (Kuo et al., 1988). Οι ορότυποι του LGV μπορούν να πολλαπλασιάζονται στα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα που υπάρχουν στο λεμφικό σύστημα (Kuo et al., 1988).

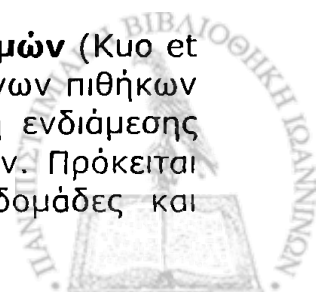
Οι κλινικές εκδηλώσεις των χλαμυδιακών λοιμώξεων οφείλονται στην άμεση καταστροφή των κυττάρων κατά τη διάρκεια του πολλαπλασιασμού των χλαμυδίων, καθώς και στη φλεγμονώδη και ανοσολογική απάντηση του ξενιστή προς τη λοίμωξη, με μηχανισμούς που δεν έχουν πλήρως διευκρινισθεί (Guaschino et al., 2000).

Η αρχική αντίδραση του ξενιστή στη λοίμωξη φαίνεται να είναι η συσσώρευση τοπικά πολυμορφοπύρηνων λευκοκυττάρων (Braley et al., 1938, Brunham et al., 1984, Griffin et al., 1990). Πρόσφατες μελέτες (Rasmussen et al., 1997), παρατήρησαν, *in vitro*, την παραγωγή ιντερλευκίνης-8 και άλλων προφλεγμονωδών κυτοκινών από τα μολυσμένα επιθηλιακά κύτταρα, η οποία οδηγεί αρχικά στην αύξηση των πολυμορφοπύρηνων. Επίσης, το πολυσακχαριδικό αντιγόνο (LPS) μπορεί να προκαλέσει την παραγωγή αυτών των κυτοκινών (Ingalls et al., 1995).

Η αρχική πολυμορφοπυρηνική διήθηση, ακολουθείται από διήθηση των ιστών από λεμφοκύτταρα, μακροφάγα, πλασματοκύτταρα και ηωσινόφιλα (Kuo et al., 1988). Μεγάλος αριθμός πλασματοκυττάρων είναι παρόν στις οφθαλμικές και γεννητικές λοιμώξεις (Raavonen et al., 1985, Patton et al., 1986), ενώ στην πνευμονία των νεογνών επικρατούν τα ηωσινόφιλα και τα ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρρηνα (Griffin et al., 1990).

Στα οφθαλμογεννητικά νοσήματα που προκαλούνται από τους ορότυπους του τραχώματος, όταν αρχίσει να υποχωρεί η οξεία φλεγμονή, σχηματίζονται τα λεμφοζίδια, τα οποία είναι συναθροίσεις λεμφοκυττάρων και μακροφάγων στον υποβλεννογόνο. Παρατηρείται λέπτυνση ή απώλεια του επιθηλίου πάνω από αυτά και καθώς προχωρεί η νόσος, αυτά μπορεί να νεκρωθούν (Kuo et al., 1988). Επίσης, γίνονται ορατά στον επιπεφυκότα καθώς παρατηρούνται ανάγγειες βλάβες (Schachter et al., 1978). Ο επιθηλιακός πολλαπλασιασμός οδηγεί στον σχηματισμό θηλών και θυλακιώδους υπερτροφίας. Έπειτα, καθώς η λοίμωξη αρχίζει να υποχωρεί, αναπτύσσεται ινώδης ιστός και ουλές.

Η αρχική λοίμωξη από *C.trachomatis* των ανθρώπινων **οφθαλμών** (Kuo et al., 1988), αλλά και των οφθαλμών (161) και των γεννητικών οργάνων πιθήκων (Patton et al., 1983, Patton et al., 1987), εκδηλώνεται με ήπια ή ενδιάμεσης βαρύτητας φλεγμονή με εισροή πολυμορφοπύρηνων λεμφοκυττάρων. Πρόκειται για μια αυτοπεριοριζόμενη λοίμωξη που κορυφώνεται σε 2 εβδομάδες και



υποχωρεί σε 5 εβδομάδες, με μικρή ή καθόλου καταστροφή των ιστών. Στα πειραματικά μοντέλα των πιθήκων οι επαναμολύνσεις μπορούν να προκαλέσουν εκτεταμένη ουλοποίηση των σαλπίγγων, έκτοπες εγκυμοσύνες και περισαλπγγικές συμφύσεις. Οι μελέτες αυτές επιβεβαιώνουν την υπόθεση ότι υπάρχει μια ανοσολογική αντίδραση του ξενιστή στη χλαμυδιακή λοίμωξη.

Παράλληλα, ο ρόλος των επαναμολύνσεων από *C.trachomatis*, αναγνωρίστηκε αρχικά στη διάρκεια εμβολιασμών με τους ορότυπους του τραχώματος, κατά τις οποίες οι εθελοντές εμβολιάστηκαν και ακολούθως ήρθαν σε επαφή με ζώντες μικροοργανισμούς *C.trachomatis* (Grayston et al., 1961, Grayston et al., 1975). Κατά τα πειράματα αυτά σε ανθρώπους και πιθήκους επιτεύχθηκε περιορισμένη προστασία έναντι ορισμένων μόνο ειδικών-οροτύπων των *C.trachomatis*. Παρόλα αυτά, όταν ο οργανισμός επαναμολύνονταν μετά την ανοσοποίησή του, η νόσος ήταν πιο σοβαρή (Grayston et al., 1975, Schachter et al., 1978). Γενικότερα μπορούμε να πούμε ότι η ανοσία έναντι των χλαμυδίων είναι σύντομη, οι ορότυποι είναι ειδικοί για κάθε λοίμωξη και οι επαναμολύνσεις είναι συχνές.

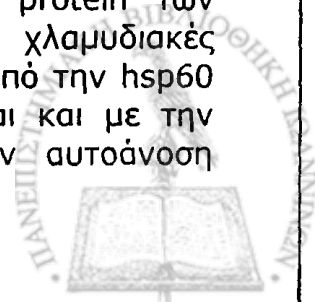
Σχετικά με τις χρονίζουσες λοιμώξεις από χλαμύδια, δεν έχει διευκρινισθεί αν τα χλαμύδια παραμένουν μέσα στα κύτταρα-ξενιστές, προστατευόμενα από τα αντισώματα, για μεγάλο χρονικό διάστημα, για να ενεργοποιηθούν αργότερα από κάποιο «σήμα», ή αν υπάρχει κάποιος ειδικός τύπος *Chlamydia spp.* στον οποίο οφείλονται οι λοιμώξεις που χρονίζουν (Moulder et al., 1980, *Infectious Diseases*, 2nd ed, 2004).

In vitro, έχει βρεθεί ότι στις χρόνιες επιμένουσες φλεγμονές, τα *Chlamydiae* είναι δυνατόν να ανταποκρίνονται με ανώμαλους μορφολογικούς σχηματισμούς, στους οποίους παράγονται οι εσωτερικές πρωτεΐνες, όπως η hsp8 και καταστρέφονται τα Ags των ώριμων EB (Kutlin et al., 2001).

Επίσης, *in vitro* τα *Chlamydiae* μπορούν να παράγουν κυτοκίνες, όπως η ιντερφερόνη- γ και η ιντερλευκίνη-1, που εμποδίζουν τον πολλαπλασιασμό των χλαμυδίων (Hackstand, 1999).

Οι Brunham και συν. (2005), μελετώντας την ανοσοβιολογία ποντικών μετά από λοίμωξη με *Chlamydia muridarum* (των οποίων τα περισσότερα γονίδια είναι κοινά με αυτά των *C.trachomatis*), βοηθήθηκαν στην κατανόηση της ανοσοβιολογίας των ανθρώπινων λοιμώξεων από *C. trachomatis*. Διαπίστωσαν λοιπόν ότι η ανοσολογική απάντηση μετά από μια χλαμυδιακή λοίμωξη περιλαμβάνει τη διέγερση των CD4+ T βοηθητικών λεμφοκυττάρων (T-helper 1), τα οποία εκκρίνουν ιντερφερόνη- γ (IFN- γ) και των B λεμφοκυττάρων. Η IFN- γ συμβάλλει στην εξάντληση της τρυπτοφάνης η οποία είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη των χλαμυδίων, ενώ τα αντισώματα που παράγονται από τα B λεμφοκύτταρα βοηθούν στην καταπολέμηση των χλαμυδίων σε μεταγενέστερη λοίμωξη. Επίσης, όταν η IFN- γ βρίσκεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις ευνοείται η εμφάνιση ανθεκτικών μορφών *C.trachomatis*, τα οποία είναι μεταβολικά ενεργά και προάγουν τη συνεχή έκκριση κυτοκινών, οι οποίες με τη σειρά τους οδηγούν στην ουλοποίηση.

Η παθογένεια των χλαμυδιακών λοιμώξεων έχει συσχετισθεί με την ανοσολογική αντίδραση του ξενιστή στην 57-kDa heat-shock protein των χλαμυδίων (hsp60). Συγκεκριμένα, στις επαναλαμβανόμενες χλαμυδιακές λοιμώξεις υπάρχει μια αντίδραση υπερευαισθησίας προκαλούμενη από την hsp60 πρωτεΐνη των χλαμυδίων. Επιπλέον, αυτή η αντίδραση σχετίζεται και με την hsp60 πρωτεΐνη που παράγει ο ξενιστής και συμμετέχει στην αυτοάνοση αντίδραση (*Infectious Diseases*, 2nd ed, 2004).



Το 1989, οι Morrison και συν., απέδειξαν ότι το αντιγόνο hsp60 προκαλεί μια επιβραδυνόμενη τύπου αντίδραση υπερευαισθησίας, χρησιμοποιώντας σε γουρούνια Γουινέας, τα οποία είχαν προηγουμένως μολυνθεί με χλαμύδια.

Λίγα χρόνια αργότερα και άλλοι συγγραφείς (Brunham et al., 1985, Wagar et al., 1990, Brunham et al., 1992, Patton et al. 1994), υποστήριξαν την άποψη ότι η παθογένεση της στειρότητας που ακολουθεί την **σαλπιγγίτιδα** από *C. trachomatis*, είναι παρόμοια με την παθογένεια της τύφλωσης που προκαλείται από οφθαλμική χλαμυδιακή λοίμωξη. Και τα δυο θεωρήθηκαν αποτελέσματα της καταστροφής των ιστών που προκαλείται από τις ανοσοπαθολογικές αντιδράσεις που ακολουθούν μια χρόνια ή επαναλαμβανόμενη χλαμυδιακή λοίμωξη. Συγκεκριμένα, τόσο η χρόνια σαλπιγγίτιδα σε στειρές γυναίκες, όσο και σε ζώα, που έχουν μολυνθεί με χλαμύδια, χαρακτηρίζεται από διηθήσεις μονοπύρηνων κυττάρων, παρόμοιες με εκείνες που παρατηρούνται στο τράχωμα, ενώ βασικό ρόλο φαίνεται να παίζει και η hsp60 πρωτεΐνη των χλαμυδίων.

Ο Toye και οι συν. (Toye et al. 1993), προσδιόρισαν τη συχνότητα των αντισωμάτων στην πρωτεΐνη hsp60 των *C. trachomatis* σε γυναίκες με σαλπιγγική στειρότητα. Επιπλέον, η παρουσία στον ορό αντισωμάτων έναντι της C-hsp60, συσχετίστηκε με έκτοπες εγκυμοσύνες κι στειρότητα των γυναικών (Brunham et al., 1985, Wagar et al., 1990, Brunham et al., 1992). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι υπάρχει σχέση μεταξύ της παραγωγής αντισωμάτων έναντι της hsp60 (Morrison et al., 1989, Yi et al., 1993, Domeika et al., 1998) και της στειρότητας λόγω προσβολής των σαλπίγγων από χλαμύδια, με έναν ανοσοπαθολογικό μηχανισμό.

Πρόσφατα δεδομένα, επιβεβαίωσαν τη σχέση της παραγωγής αντισωμάτων που προκαλείται από την παρουσία της C-hsp60 και του κινδύνου **πυελικής φλεγμονώδους νόσου (PID)** (Peeling et al., 1997) και του ουλώδους τραχώματος (Peeling et al., 1998). Εκτενέστερες μελέτες απαιτούνται να γίνουν ώστε να προσδιορισθεί η δυνατότητα να χρησιμοποιείται κλινικά η hsp60 ως προγνωστικός δείκτης σαλπιγγικής νόσου σε γυναίκες με στειρότητα, ή ως δείκτης αδυναμίας έκβασης της εγκυμοσύνης σε γυναίκες με πυελική φλεγμονώδη νόσο (PID) που σχετίζεται με χλαμύδια.

Ο μηχανισμός των βλαβών των σαλπίγγων, εκτός από την ανοσολογική αντίδραση στην C-hsp60 πρωτεΐνη, συνδέθηκε και με τις κυτοκίνες, οι οποίες είναι σημαντικές για την έκφραση παθογενετικών αντιγόνων και ενεργοποιούνται από μια συστηματική ανοσολογική αντίδραση.

Ο Ault και συν. (Ault et al., 1996), έδειξαν ότι η παραγωγή TNF- α , ως απάντηση στη χλαμυδιακή λοίμωξη, μπορεί να πυροδοτήσει την παραγωγή και άλλων κυτοκινών, όπως η ιντερλευκίνη-1 (Zhong et al., 1989, Rasmussen et al., 1997), και η ιντερλευκίνη-6, με αποτέλεσμα την καταστροφή των σαλπίγγων μέσω ανοσολογικού μηχανισμού. Η IFN- α , αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των χλαμυδίων (Rothermel et al., 1983) και σε πειράματα με ζώα προκαλεί μείωση της διάρκειας της λοίμωξης (Rank et al., 1992). In vitro, παρατείνει τη διάρκεια της λοίμωξης, κατά την οποία παρατηρείται αυξημένη σύνθεση της C-hsp60 πρωτεΐνης (Beatty et al., 1993). Εντούτοις, η απομάκρυνση της IFN- α , επιτρέπει τη βελτίωση της κατάστασης του πάσχοντα οργανισμού. Εάν τέτοιες επίμονες λοιμώξεις εμφανιστούν σε ανθρώπους, τότε αλλαγές στις ανασταλτικές κυτοκίνες, στον πολλαπλασιασμό των χλαμυδίων, στην παραγωγή αντιγόνων και στην αντίδραση υπερευαισθησίας, θα μπορούσε να εξηγήσει τη χρόνια φλεγμονή και την ουλές που σχετίζονται με τις χλαμυδιακές λοιμώξεις (Beatty et al., 1993).

Οι Witkin και Ledger (Witkin et al., 1992), αναφέρουν ότι η ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος και παραγωγή κυτοκινών ως απάντηση στα

χλαμυδιακά αντιγόνα, είναι δυνατόν να επεμβαίνει στην εμφύτευση του εμβρύου, σε ρυθμιστικούς μηχανισμούς που προστατεύουν το κύημα από την προσβολή του από το ανοσοποιητικό σύστημα της μητέρας. Επιπλέον, μια προηγούμενη χλαμυδιακή λοίμωξη μπορεί να έχει καταστρέψει σημαντικά το ενδομήτριο, ώστε να γίνεται δύσκολη η επιτυχής εμφύτευση του εμβρύου. Μια άλλη πιθανότητα είναι να προκληθεί μια αυτοάνοση αντίδραση, ως αποτέλεσμα μακροχρόνιας έκθεσης στα αντιγόνα των *C.trachomatis*. Η hsp60 πρωτεΐνη είναι μια από τις πρώτες πρωτεΐνες που παράγονται από το αναπτυσσόμενο έμβρυο. Ως εκ τούτου, η παραγωγή ευαισθητοποιημένων T λεμφοκυττάρων προς την C-hsp60 πρωτεΐνη, μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή λεμφοκυττάρων τα οποία θα αντιδρούν με την ανάλογη ανθρώπινη hsp πρωτεΐνη, η οποία μπορεί να εκφράζεται από το έμβρυο ή από τα μητρικά κύτταρα, στη μήτρα της εγκύου. Κατ' αυτόν τον τρόπο, προκύπτει ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος, η οποία θα μπορούσε άμεσα να καταστρέψει το έμβρυο, ή να παρεμβαίνει στην διαδικασία της κύησης μαζί με το συνολικό ρυθμιστικό ανοσοποιητικό σύστημα. Η συνεχής μέτρηση υψηλού τίτλου IgG αντισωμάτων έναντι των χλαμυδίων, θα μπορούσε να αποτελέσει χαρακτηριστικό της ομάδας των γυναικών με ανεξήγητες υποτροπιάζουσες εκτρώσεις ή στειρότητα.

Αντιθέτως, άλλοι μελετητές, όπως οι Rae και συν. (Rae et al. 1994), αναφέρουν ότι δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των IgG αντισωμάτων των *C.trachomatis* και των υποτροπιάζόντων αυτόματων αποβολών και καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι προϋπάρχουσα χλαμυδιακή λοίμωξη δεν έχει σχέση με την απώλεια του εμβρύου σε υποτροπιάζουσες αποβολές, ενώ δεν απέκλυσαν το ενδεχόμενο να έχει σχέση με έναν ελάχιστο αριθμό εγκύων.

Εν συντομία, ο παθογενετικός μηχανισμός καταστροφής των σαλπίνγων έχει ως εξής: η αρχική λοίμωξη από *C. trachomatis*, προκαλεί την παραγωγή ευαισθητοποιημένων λεμφοκυττάρων, τα οποία στις περιπτώσεις μακροχρόνιας λοίμωξης ή επαναμολύνσεων από τα χλαμυδιακά αντιγόνα, συνδέονται με επιτόπους της ομολόγου ανθρώπινης hsp πρωτεΐνης, προκαλώντας καταστροφή των ιστών με έναν ανοσολογικό μηχανισμό. Κατά τον ίδιο τρόπο, οι αποβολές είναι δυνατόν να οφείλονται στην ευαισθητοποίηση των λεμφοκυττάρων από την αρχική λοίμωξη, την έκφραση ενδομήτριας hsp πρωτεΐνης και της επακόλουθη προσβολή του εμβρύου.

Σύμφωνα με την πρόσφατη μελέτη των Brunham και συν. (2005), το γεννητικό σύστημα των γυναικών αντιδρά έντονα στη λοίμωξη από *C.trachomatis*. Συγκεκριμένα, τα μολυσμένα επιθηλιακά κύτταρα και τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος (B και T λεμφοκύτταρα) εκκρίνουν κυτοκίνες, οι οποίες πυροδοτούν άνοσες λειτουργίες που μπορούν να περιορίσουν τη φλεγμονή, αλλά και να καταστρέψουν τους ιστούς, οδηγώντας στην ουλοποίησή τους.

Σχετικά με τις **χλαμυδιακές λοιμώξεις στους άνδρες**, αρκετές μελέτες αναφέρουν τη σχέση μεταξύ λευκοκυττάρων στο σπέρμα και δυσλειτουργίας του. Είναι γεγονός ότι υπάρχει μια αντίστροφη σχέση μεταξύ της ελαστάσης και των σπερματοζωαρίων.

Οι Witkin και συν. (Witkin et al. 1993), εξέτασαν 28 στείρους άνδρες με PCR, οι οποίοι είχαν αρνητική καλλιέργεια και DNA probes. Βρέθηκαν 11 άνδρες θετικοί για χλαμύδια και περίπου 50% αυτών είχαν αντισπερμικά αντισώματα. Οι μελετητές εξήγησαν αυτά τα αποτελέσματα υποθέτοντας ότι τα χλαμύδια θα πρέπει να ήταν παρόντα κάτω από τον ουδό ανίχνευσης της καλλιέργειας και των DNA probes, υποδηλώνοντας την μεγαλύτερη ευαισθησία της PCR στην ανίχνευση των *C. trachomatis*. Η αυξημένη συχνότητα αυτοάνοσης αντίδρασης του σπέρματος στους άνδρες στους οποίους ανιχνεύθηκαν *C. trachomatis* στο σπέρμα,

υποδηλώνει ότι μια υποκλινική χλαμυδιακή λοίμωξη μπορεί να ενεργοποιεί μια ανοσολογική αντίδραση του σπέρματος. Επιπλέον, μια παρόμοια συσχέτιση μεταξύ των *C. trachomatis* στο σπέρμα και κυκλοφορούντων αντισπερμικών αντισωμάτων στις γυναίκες συντρόφους τους, δείχνει την πιθανότητα οι γυναίκες αυτές να έχουν αναπτύξει μια ανοσολογική αντίδραση στο σπέρμα.

Ίσως, ένα μελλοντικό πρόγραμμα ελέγχου ανίχνευσης των *C. trachomatis* στο σπέρμα συμπτωματικών, σεξουαλικά ενεργών, νεαρών ανδρών και η άμεση θεραπεία αυτών και των σεξουαλικών τους συντρόφων, θα μπορούσε να οδηγήσει σε μεγαλύτερη μείωση των περιπτώσεων ανεξήγητης στειρότητας.

6. ΠΑΘΟΓΟΝΟΣ ΔΡΑΣΗ

Τα *C. trachomatis* προκαλούν ευρύ φάσμα λοιμώξεων:

- 1) Λοιμώξεις του ουροποιογεννητικού συστήματος σε άνδρες και γυναίκες.
- 2) Επιπεφυκίτιδα από έγκλειστα των ενηλίκων.
- 3) Περιγεννητικές λοιμώξεις.
- 4) Οφθαλμικό τράχωμα.
- 5) Αφροδίσιο λεμφοκοκκίωμα (*Lymphogranuloma venereum*, LGV)

6.1. ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ ΤΟΥ ΟΥΡΟΠΟΙΟΓΕΝΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΣΕ ΑΝΔΡΕΣ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΕΣ.

6.1.1. ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ ΤΟΥ ΟΥΡΟΠΟΙΟΓΕΝΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΣΕ ΑΝΔΡΕΣ

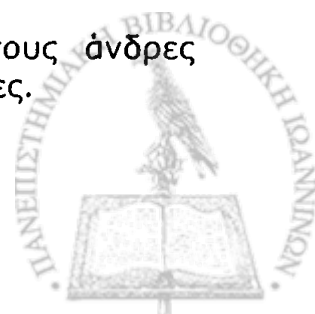
Ουρηθρίτιδα: Τα *C. trachomatis* ευθύνονται για το 30-50% της συμπτωματικής, μη γονοκοκκικής ουρηθρίτιδας και σε ακόμη μεγαλύτερο ποσοστό για τη μεταγονοκοκκική ουρηθρίτιδα. Άλλα αίτια συμπτωματικής, μη γονοκοκκικής ουρηθρίτιδας είναι το *Ureaplasma urealyticum* (10-20%) και η *Trichomonas vaginalis* (10%). *C. trachomatis* ανευρίσκονται στο 20% γονοκοκκικής ουρηθρίτιδας.

Ως επί το πλείστον, η ουρηθρίτιδα από *C. trachomatis* στους άνδρες είναι ασυμπτωματική. Σε μελέτη των Stamm και συν. διαπιστώθηκε ότι μόνο ένας στους οκτώ μολυσμένους άνδρες που παρακολούθηθηκαν χωρίς θεραπεία για τουλάχιστον 21 ημέρες εμφάνισαν συμπτώματα (Stamm et al., 1986).

Ο χρόνος επώασης της συμπτωματικής χλαμυδιακής ουρηθρίτιδας είναι περίπου 7 έως 14 ημέρες, σε αντίθεση με τη γονοκοκκική ουρηθρίτιδα που είναι περίπου 4 ημέρες. Οι ασθενείς εμφανίζουν δυσουρία και ουρηθρικό έκκριμα, ιδίως μετά από πρωινή μάλαξη του πέους.

Εργαστηριακά, η εύρεση τουλάχιστον τεσσάρων πολυμορφοπύρηνων ανά οπτικό πεδίο στη χρώση Gram ενδοουρηθρικού επιχρίσματος βάζει τη διάγνωση ουρηθρίτιδας (Bowie et al., 1990).

Οι σημαντικότερες επιπλοκές χλαμυδιακής ουρηθρίτιδας στους άνδρες είναι: επιδιδυμίτιδα, αρθρίτιδα και μετάδοση της λοίμωξης στις γυναίκες.



Επιδιδυμίτιδα και προστατίτιδα: Τα *C.trachomatis* και η *N.gonorrhoeae* είναι τα πιο συχνά αίτια επιδιδυμίτιδας σε άνδρες κάτω των 35 ετών, ενώ άνω των 35 ετών είναι τα εντεροβακτηριακά (κυρίως η *Escherichia coli*).

Η λοίμωξη είναι ανιούσα, από την ουρήθρα στην επιδιδυμίδα και στον προστάτη, όπου προσβάλλει το σπέρμα, αυξάνοντας τον κίνδυνο μετάδοσης της λοίμωξης στις γυναίκες. Τα *C.trachomatis* μειώνουν δραματικά τον αριθμό, την κινητικότητα και βιωσιμότητα του σπέρματος προκαλώντας στειρότητα στους άνδρες (Eley, 2003).

Τα *C.trachomatis* φαίνεται να συμμετέχουν στη χρόνια ή μη βακτηριακή προστατίτιδα. Οι καλλιέργειες στο προστατικό υγρό είναι αρνητικές για *C.trachomatis*, αλλά έχουν απομονωθεί με τις μοριακές μεθόδους και με τις μεθόδους ανίχνευσης αντιγόνου. Επίσης, έχουν απομονωθεί και σε υλικό βιοψίας (*Infectious Diseases, Vol. 2, 2004*).

Πρωκτίτιδα και πρωκτοκολίτιδα: Ασυμπτωματική φορεία του ορθού από *C.trachomatis* εμφανίζουν τα νεογνά και οι ενήλικες, αλλά αποτελούν συχνά αίτια πρωκτίτιδας και πρωκτοκολίτιδας σε ομοφυλόφιλους άνδρες.

Αρθρίτιδα: Τα *Chlamydiae* είναι γνωστό ότι πυροδοτούν εκδηλώσεις ενεργού αρθρίτιδας, η οποία ουσιαστικά γίνεται φανερή μετά από κάποιο επεισόδιο ουρηθρίτιδας στους άνδρες (*Reiter's syndrom*) – παρόμοια συσχέτιση στις γυναίκες δεν υπάρχει-, ή μετά από λοίμωξη του αναπνευστικού συστήματος από *C.pneumoniae* και *C.psittaci*. Περιστασιακά εμφανίζονται ασθενείς με HLA-B27 Ag και πλήρη εικόνα συνδρόμου Reiter που περιλαμβάνει αρθρίτιδα, ουρηθρίτιδα και επιπεφυκίτιδα.

Μολονότι οι καλλιέργειες είναι συνήθως αρνητικές, πρόσφατες μελέτες υποστήριξαν την παρουσία χλαμυδιακών σωματιδίων στο αρθρικό υγρό και στους αρθρικούς ιστούς (*Infectious Diseases, Vol. 2, 2004*). Αυτό μπορεί να εξηγήσει γιατί η παρατεταμένη αντιβιοτική θεραπεία είναι αποτελεσματική στην αρθρίτιδα από χλαμύδια (Lauhio et al., 1991) και όχι στην αρθρίτιδα από εντεροβακτηριακά.

Σε άνδρες με μη θεραπευμένο σύνδρομο Reiter που έχουν ουρηθρίτιδα, *C.trachomatis* έχουν εντοπισθεί στην ουρήθρα 69% αυτών κατά την έναρξη της οξείας αρθρίτιδας (Keat, 1992). Στους ασθενείς με σύνδρομο Reiter ανευρίσκονται αντισώματα έναντι των *C.trachomatis* στο αρθρικό υγρό και στον ορό. Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί ότι όταν οι ασθενείς με σύνδρομο Reiter έλαβαν αντιχλαμυδιακή θεραπεία οι υποτροπές αρθρίτιδας ήταν σημαντικά λιγότερες σε σχέση με τους ασθενείς που δεν πήραν θεραπεία ή θεραπεύτηκαν με πενικιλίνη (Bardin et al., 1992).

Τα *C. trachomatis* φαίνεται ότι είναι η πιο συχνή αιτία χλαμυδιακής αρθρίτιδας. Αδιευκρίνιστο παραμένει αν αυτό οφείλεται σε κάποιο ιδιαίτερο τροπισμό, των διαφόρων ειδών *Chlamydiae*, προς τους ιστούς (*Infectious Diseases, Vol. 2, 2004*).



6.1.2. ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ ΤΟΥ ΟΥΡΟΠΟΙΟΓΕΝΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΣΕ ΓΥΝΑΙΚΕΣ

Τραχηλίτιδα και ουρηθρίτιδα: Τα *C.trachomatis* είναι η πιο σημαντική αιτία βακτηριακής λοίμωξης του γεννητικού συστήματος στις γυναίκες. Οι ορότυποι B και E-K εμφανίζονται πιο συχνά.

Οι μολυσμένες γυναίκες συχνά είναι ασυμπτωματικές και μπορούν να μεταδίδουν τη νόσο (*Infectious Diseases, Vol. 2, 2004*). Έως και 70% των γυναικών με τραχηλίτιδα από *C.trachomatis* μπορεί να είναι ασυμπτωματικοί φορείς ή έχουν μόνο ήπια συμπτώματα, όπως αυξημένη κολπική έκκριση, αιμορραγία, ήπιο κοιλιακό άλγος ή δυσουρία λόγω συνύπαρξης ουρηθρίτιδας.

* Τα *C.trachomatis* δεν προκαλούν βλάβη στα πλακώδη επιθηλιακά κύτταρα του κόλπου των ενηλίκων γυναικών, αλλά μπορούν να προκαλέσουν κολπίτιδα πριν την εφηβεία όταν το επιθήλιο του κόλπου είναι μεταβατικό (Bump, 1985).

Ιδιαίτερα ευπαθείς στην εμφάνιση τραχηλίτιδας είναι οι γυναίκες ηλικίας 15-25 ετών. Κλινικά δεν μπορεί να διακριθεί από τις τραχηλίτιδες που οφείλονται σε άλλους παράγοντες, μολονότι οι βλεννοπυώδεις εκκρίσεις και οι υπερτροφικοί θυλακιδώδεις σχηματισμοί σε ένα οιδηματώδες και εύθριπτο επιθήλιο ("γενετικό τράχωμα"), είναι η τυπική εικόνα της νόσου (Brunham et al., 1984).

Τα *C.trachomatis* είναι μια από τις αιτίες άσηπτης κυστίτιδας στις γυναίκες. Επίσης, έχουν απομονωθεί με καλλιέργεια σε γυναίκες με βαρθολινίτιδα. Η εικόνα αυτή είναι πιο συχνή σε γυναίκες με ενδομητρίτιδα (Eckert et al., 2002).

Πυελική φλεγμονώδης νόσο (PID):

Η κύρια επιπλοκή της λοίμωξης από *C. trachomatis* στις γυναίκες είναι η επέκταση της λοίμωξης που οδηγεί σε πυελική φλεγμονώδη νόσο (*Pelvic Inflammatory Disease - PID*). Με τον όρο «πυελική φλεγμονή» υποδηλώνεται η οξεία, υποξεία, υποτροπιάζουσα και χρόνια φλεγμονή των σαλπίγγων, των ωοθηκών, των παραμητρίων και των λοιπών ανατομικών στοιχείων της ελάσσονος πυέλου, μεμονωμένα ή συνδυασμένα (Λώλης Δ., 1995). Η νόσος μπορεί να εκδηλωθεί οξέος με περιηπατίτιδα ή ασκίτη, αλλά και ασυμπτωματικά ή ως "σιωπηλή" σαλπιγγίτιδα (Raavonen, 1992).

Τα *C. trachomatis* δεν είναι ο μόνος οργανισμός που εμπλέκεται στην εμφάνιση PID. Είδη όπως η *Neisseria gonorrhoeae*, αερόβια και αναερόβια βακτήρια (συμπεριλαμβανομένων εκείνων που προκαλούν κολπίτιδα), είτε μόνα, είτε σε συνδυασμό, επίσης παίζουν ρόλο.

Οι αιτιολογικοί μικροβιακοί παράγοντες, ενώ δε φαίνεται να διαφέρουν από κοινωνία σε κοινωνία, έχουν διαφορετική συχνότητα εμφάνισης. Για παράδειγμα, στις ΗΠΑ, ο γονόκοκκος αποτελεί την πρώτη αιτία, ενώ στις Σκανδιναυϊκές χώρες τα *C. trachomatis*. Σχετικές αξιόπιστες μελέτες για τη χώρα μας δεν επιβεβαιώνουν τις παρατηρήσεις αυτές (Λώλης Δ., 1995). Στην πραγματικότητα πρόκειται για πολυμικροβιακές φλεγμονές, με επικράτηση των αεροβίων στρεπτοκόκκων και βακτηριδίων, ενώ στους αιτιολογικούς παράγοντες, αξιόλογη φαίνεται η συμμετοχή του μυκοπλάσματος. Ο επιπολασμός των γονοκοκκικών και χλάμυδιακών φλεγμονών των γεννητικών οργάνων, στον ελληνικό πληθυσμό, επί του παρόντος τουλάχιστον, φαίνεται περιορισμένος (Λώλης Δ., 1995).

Μελέτες που προσπαθούν να προσδιορίσουν ποιοί μικροοργανισμοί ενέχονται στην εμφάνιση PID αντιμετώπισαν δυσκολίες στον τρόπο διάγνωσης της PID. Οι περισσότερες μελέτες βασίστηκαν σε κλινικά σημεία και συμπτώματα της PID και λίγες έχουν επιβεβαιώσει τη διάγνωση λαπαροσκοπικά. Με τη λαπαροσκοπική εξέταση υπάρχει η δυνατότητα να γίνουν ορατοί οι μολυσμένοι και φλεγμαινόντες φαλλοπιανοί πόροι καθώς επίσης να ληφθούν δείγματα για



εργαστηριακό έλεγχο. Γι αυτούς τους λόγους η λαπαροσκοπική εξέταση θεωρείται το «gold standard» στη διάγνωση της PID.

Αρκετές μελέτες έχουν ασχοληθεί με τη σχέση των *C. trachomatis* και της λαπαροσκοπικά επιβεβαιωμένης PID. Σε μια μελέτη στη Μ.Βρετανία, *C. trachomatis* απομονώθηκαν από τον τράχηλο στο 48% των γυναικών (11/23), ενώ μόνο στο 23% αυτών των γυναικών απομονώθηκαν *C. trachomatis* από τους φαλλοπιανούς πόρους (Stacey et al., 1992). Σε μια άλλη μελέτη, όπου οξεία PID επιβεβαιώθηκε λαπαροσκοπικά και ιστολογικά σε 23 γυναίκες, το 61% αυτών είχαν θετική καλλιέργεια για *C. trachomatis*, ενισχύοντας τη σημασία των *C. trachomatis* ως αιτιολογικού παράγοντα στην οξεία PID (Wasserheit et al., 1986). Σε μια παρόμοια μελέτη βρέθηκε ότι τα *C. trachomatis* ήταν ο υπεύθυνος αιτιολογικός παράγων στο 44% των γυναικών στις οποίες είχε διαγνωσθεί PID λαπαροσκοπικά και ιστολογικά (Heinonen et al., 1994).

Τα *C. trachomatis* είναι επίσης πιθανόν ότι αποτελούν έναν σημαντικό αιτιολογικό παράγοντα στη χρόνια PID. Σε μια μελέτη σε γυναίκες που έκαναν σαλπιγγεκτομή, διαπιστώθηκε στο 12% αυτών των γυναικών (9/77), με ιστολογικά επιβεβαιωμένη σαλπιγγίτιδα, ότι είχαν *C. trachomatis*, συγκριτικά με γυναίκες με φυσιολογικούς φαλλοπιανούς πόρους, σε καμία από τις οποίες δεν βρέθηκαν *C. trachomatis* (Hinton et al., 2000).

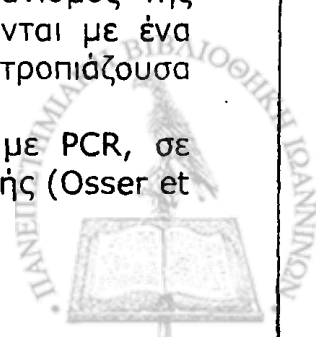
Στη Σουηδία, όπου έχει γίνει προσπάθεια για τη μείωση της συχνότητας των *C. trachomatis*, παρατηρήθηκε επίσης και μείωση στον ετήσιο αριθμό γυναικών που νοσηλεύτηκαν για PID (Kamwendo et al., 1996). Επιπλέον, προοδευτικά μειώθηκε και η αναλογία γυναικών με PID στις οποίες ανιχνεύθηκαν *C. trachomatis*, ανά πενταετία, δηλ. από την πενταετία 1980 - 1984, 1985 - 1989 έως 1990 - 1994. Συγκεκριμένα, κατά την πενταετία 1980 - 1984, απομονώθηκαν *C. trachomatis* στο 33% (38/117) των γυναικών, ηλικίας 20-24 χρονών στις οποίες διαγνώσθηκε PID, ενώ κατά την πενταετία 1990-1994 μόλις στο 17% (12/69) των γυναικών, ίδιας ηλικίας, με PID. Παρά το γεγονός ότι η διάγνωση PID τέθηκε με κριτήρια κλινικά και όχι λαπαροσκοπικά, η μελέτη αυτή δείχνει ότι, επιδημιολογικά, υπάρχει συσχέτιση μεταξύ PID και *C. Trachomatis*.

Σε μια ακόμη μελέτη των παραγόντων κινδύνου που σχετίζονται με PID (η οποία διαγνώσθηκε επίσης κατά την κλινική εξέταση) σε έφηβους, διαπιστώθηκε ότι η παρουσία πρόσφατης λοίμωξης από *C. trachomatis* ήταν ο μεγαλύτερος παράγοντας κινδύνου για την εμφάνιση PID (Suss et al., 2000).

Βέβαιο πάντως είναι ότι, η θεραπεία των ασυμπτωματικών λοιμώξεων από *C. trachomatis* μειώνει τον κίνδυνο εμφάνισης PID με κλινική συμπτωματολογία (Scholes et al., 1996). Αυτό προέκυψε από μια καλά σχεδιασμένη μελέτη στην οποία μελετήθηκαν δυο ομάδες γυναικών: η πρώτη ομάδα ελέγχθηκε για *C. trachomatis* και τους δόθηκε η κατάλληλη θεραπεία, ενώ η δεύτερη όχι. Όλες οι γυναίκες παρακολούθηθηκαν για εμφάνιση PID τους ακόλουθους 12 μήνες. Διαπιστώθηκε ότι ο σχετικός κίνδυνος εμφάνισης PID ήταν σημαντικά χαμηλότερος στην ομάδα που ελέγχθηκε για *C. trachomatis* από ότι στην άλλη ομάδα. Επομένως, ο έλεγχος ρουτίνας (screening) και η κατάλληλη θεραπεία για *C. trachomatis* μειώνει τον κίνδυνο PID.

Οι μακροπρόθεσμες επιπλοκές της PID περιλαμβάνουν στειρότητα και έκτοπη εγκυμοσύνη. Αν και δεν είναι πλήρως κατανοητός ο μηχανισμός της απόφραξης των σαλπίγγων, φαίνεται ότι τα *C. trachomatis* σχετίζονται με ένα συνδυασμό χρόνιας φλεγμονής και ουλοποίησης με επιμένουσα ή υποτροπιάζουσα χλαμυδιακή λοίμωξη.

Εντούτοις, μια προσπάθεια να ανιχνευθεί χλαμυδιακό DNA με PCR, σε σαλπιγγικό ιστό από γυναίκες με έκτοπες εγκυμοσύνες, ήταν ανεπιτυχής (Osser et al., 1992).



Ενδομητρίτιδα και σαλπγγίτιδα: Τα *C. trachomatis* έχουν συσχετισθεί με φλεγμονή του ενδομητρίου, παρουσία ή όχι σαλπγγίτιδας. Υπολογίζεται ότι το 8% των γυναικών με τραχηλίτιδα από *C. trachomatis* εμφανίζει οξεία σαλπγγίτιδα. Σε μια πρόσφατη μελέτη, ελέγχθηκαν λαπαροσκοπικά 152 γυναίκες επί υποψίας πυελικής φλεγμονώδους νόσου. Στο 55% των γυναικών διαπιστώθηκε σαλπγγίτιδα, στο 17% μόνο ενδομητρίτιδα και στο 28% τίποτε από τα ανωτέρω (Eckert et al., 2002). Η συχνότητα των *C. trachomatis* στις γυναίκες με σαλπγγίτιδα ήταν 43%, 23% στις γυναίκες με ενδομητρίτιδα και 9% στις υπόλοιπες.

Γενικότερα, το ποσοστό των γυναικών που θα εμφανίσει οξεία PID μετά από μια χλαμυδιακή λοίμωξη κυμαίνεται από 5 έως 51%, ανάλογα με τον πληθυσμό και τη μέθοδο που χρησιμοποιείται, αλλά τις περισσότερες φορές είναι περίπου 20% (Cates et al., 1991). Η εξέλιξη και πρόγνωση της ενδομητρίτιδας είναι άγνωστη, αλλά φαίνεται πιθανό ότι, τουλάχιστον σε μερικές γυναίκες, μπορεί προοδευτικά να οδηγήσει σε πυελική φλεγμονώδη νόσο με σοβαρές επιπλοκές.

Περιηπατίτιδα: Η περιηπατίτιδα (γνωστή και ως Fitz-Hugh-Curtis σύνδρομο) χαρακτηρίζεται κλινικά από πλευριτικό πόνο στο δεξιό άνω τεταρτημόριο της κοιλιάς και ευαισθησία στο ήπαρ, καθώς από συμπτώματα και κλινικά σημεία PID. Ορολογικά έχει διαπιστωθεί η παρουσία λοίμωξης από *C. trachomatis* στις περισσότερες γυναίκες που έχουν αυτήν την εικόνα (Wang et al., 1980). Ο Money και οι συνεργάτες του, μελέτησαν τα χαρακτηριστικά γυναικών με περιηπατίτιδα διαγνωσμένης λαπαροσκοπικά, όταν εξέτασαν μια σειρά γυναικών στις οποίες είχε τεθεί κλινικά η διάγνωση PID (Money et al., 1997). Περιηπατίτιδα βρέθηκε στο 37% (27/73) των γυναικών με λαπαροσκοπικά επιβεβαιωμένη PID.

Επιπλέον, παρατηρήθηκαν κλινικές και μικροβιολογικές διαφορές μεταξύ γυναικών με περιηπατίτιδα και σαλπγγίτιδα, από τις γυναίκες μόνο με σαλπγγίτιδα. Συγκεκριμένα οι πρώτες βρέθηκε να έχουν μεγαλύτερη συχνότητα ενδιάμεσης έως σοβαρής βαρύτητας πυελικές συμφύσεις, καθώς μεγαλύτερη συχνότητα και τίτλο αντισωμάτων έναντι της hsp60 των χλαμυδίων. Τα δεδομένα αυτά δείχνουν ότι οι γυναίκες με περιηπατίτιδα πιθανόν να εκδηλώνουν μια διαφορετική και πιο έντονη φλεγμονώδη αντίδραση στα χλαμυδιακά αντιγόνα, ή ότι συμμετέχουν διαφορετικοί ορότυποι των *C. trachomatis*. Η χρήση των από του στόματος αντισυλληπτικών φάνηκε ότι δρούσε προστατευτικά έναντι της περιηπατίτιδας, αλλά ο προστατευτικός μηχανισμός δεν είναι γνωστός.

Η λοίμωξη από *C. trachomatis* μπορεί να επεκταθεί και σε άλλα γειτονικά κοιλιακά όργανα. Βρέθηκε ότι 6% (7/112) των γυναικών με λαπαροσκοπικά επιβεβαιωμένη σαλπγγίτιδα, είχαν αναπτύξει περισκωληκοειδίτιδα, η οποία ήταν ορατή και ιστολογικά επιβεβαιωμένη. Όλες αυτές οι γυναίκες είχαν *C. trachomatis* στο γεννητικό τους σύστημα (Mardh et al., 1985). Περισπληνίτιδα έχει επίσης περιγραφεί (Infectious Diseases, Vol. 2, 2004).

Επιπλοκές της λοίμωξης από *C. trachomatis* κατά την εγκυμοσύνη:

Τα αποτελέσματα μελετών γύρω από αυτό το θέμα είναι αντιφατικά. Σε γυναίκες με "καθ' έξην" εκτρώσεις έχουν βρεθεί υψηλοί τίτλοι IgG αντισωμάτων και αρνητική καλλιέργεια τραχηλικού επιχρίσματος για *C. trachomatis*, κάνοντας έτσι πιθανό το γεγονός ότι προηγούμενη ή επιμένουσα λοίμωξη του ενδομητρίου από *C. trachomatis* μπορεί να σχετίζεται με κάποιες εκτρώσεις. Άλλες πάλι μελέτες δεν βρήκαν να σχετίζονται η δυσμενής έκβαση της εγκυμοσύνης με λοίμωξη από *C. trachomatis* (McGregor et al., 1991), παρότι μια ομάδα γυναικών με IgM αντισώματα έναντι των *C. trachomatis* απέκτησαν νεογνά με χαμηλό βάρος γέννησης, σε σχέση με τις γυναίκες χωρίς IgM αντισώματα (Berman et al., 1987).

Τέλος, άλλοι μελετητές βρήκαν ότι υπάρχει σχέση μεταξύ χλαμυδιακής λοίμωξης, προωρότητας και πρόωρης ρήξης των μεμβρανών.

Η έκβαση της εγκυμοσύνης μελετήθηκε σε 244 θεραπευμένες γυναίκες που έλαβαν θεραπεία για λοίμωξη από *C. trachomatis* και σε 79 θεραπευόμενες γυναίκες που είχαν υποτροπιάζουσα ή επιμένουσα λοίμωξη (Cohen et al., 1990). Η επιτυχής θεραπεία βρέθηκε ότι μειώνει τη συχνότητα πρόωρης ρήξης των μεμβρανών και των νεογνών με χαμηλό βάρος γέννησης (small-for-dates). Αυτές οι μελέτες προτείνουν ότι η θεραπεία της λοίμωξης κατά την εγκυμοσύνη βελτιώνει την πρόγνωση και έκβασή της, καθώς επίσης προλαμβάνει και τη νεογνική λοίμωξη.

Καρκίνος τραχήλου μήτρας: Πρόσφατες επιδημιολογικές μελέτες έχουν καταλήξει στο ότι η λοίμωξη από *C. trachomatis* είναι ένας ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου ανάπτυξης καρκίνου στον τράχηλο (Zenilman, 2001). Ο ακριβής βιολογικός μηχανισμός δεν είναι γνωστός, αλλά πιθανόν να σχετίζεται με φλεγμονή mucosal ή με τροποποίηση της φλεγμονώδους αντίδρασης του ξενιστή.

Επιπλέον, ειδικοί ορότυποι των *C. trachomatis* έχουν συνδεθεί με την εμφάνιση λοίμωξης από *C. trachomatis* σε μια μεγάλη μελέτη 530.000 γυναικών στη Σκανδιναβία (Anttila et al., 2001). Μελετήθηκαν γυναίκες με επιθετικό καρκίνο τραχήλου, στις οποίες είχε ληφθεί δείγμα αίματος 12 μήνες πριν τη διάγνωση, με σκοπό την αναζήτηση αντισωμάτων έναντι των *C. trachomatis* και προσδιορισμό του οροτύπου τους. Ο ορότυπος G των *C. trachomatis* συσχετίσθηκε περισσότερο με τον καρκίνο τραχήλου, καθώς και οι ορότυποι I και D, ενώ η παρουσία πολλαπλών οροτύπων αύξανε τον κίνδυνο. Πρόκειται για μια εντυπωσιακή μελέτη, όχι μόνο για το μέγεθός της, αλλά και γιατί η οροθετικότητα που διαπιστώθηκε πριν την εμφάνιση του καρκίνου έθεσε την υποψία σχέσης των *C. trachomatis* και του καρκίνου του τραχήλου. Ένα πιθανό μειονέκτημα της μελέτης ήταν οι λίγες πληροφορίες σχετικά με τη σεξουαλική συμπεριφορά των γυναικών και έτσι ήταν δύσκολο να ελεγχθούν και άλλοι παράγοντες κινδύνου. Και άλλες παλαιότερες μελέτες (Hare et al., 1982, Schachter et al., 1982) έχουν συσχετίσει τη λοίμωξη από *C. trachomatis* με τραχηλική δυσπλασία ή νεοπλασία.

Αντιθέτως, σε γυναίκες με HPV λοίμωξη, η ταυτόχρονη λοίμωξη από *C. trachomatis* δεν φάνηκε να επηρεάζει την εξέλιξη των τραχηλικών βλαβών (Yliskoski et al., 1992). Μια ακόμη μελέτη, δεν κατόρθωσε να συσχετίσει την ύπαρξη αντισωμάτων έναντι των *C. trachomatis* με τον τραχηλικό καρκίνο, υποστηρίζοντας ότι, ακόμα και αν τα *C. trachomatis* σχετίζονται με την εμφάνιση καρκίνου, δεν σχετίζονται με την εξέλιξή του (Reesink-Peters et al., 2001).



ΕΠΙΠΕΦΥΚΙΤΙΔΑ ΑΠΟ ΕΓΚΛΕΙΣΤΑ ΤΩΝ ΕΝΗΛΙΚΩΝ.

Στους ενήλικες, η οφθαλμική λοίμωξη από χλαμύδια εκδηλώνεται ως θυλακιδώδης επιπεφυκίτιδα (Εικόνα 8), συχνά με μια αίσθηση ξένου σώματος στα μάτια. Τα συμπτώματα είναι συνήθως ετερόπλευρα. Η κλινική εικόνα, τις δυο πρώτες εβδομάδες, χαρακτηρίζεται από υπεραίμια και ένα βλεννώδες έκκριμα που προοδευτικά γίνεται πυώδες (Schachter et al., 1978). Ακολουθεί ο σχηματισμός λεμφοειδών θυλάκων (συχνά με βλάβες στον κερατοειδή και επιθηλιακή κερατίτιδα (Dawson et al., 1967, Stenson et al., 1981) και νεοαγγείων στον κερατοειδή (πάννος), οπότε είναι δύσκολο να διακριθεί από το πρώιμο οφθαλμικό τραχώμα. Μπορεί να συνυπάρχει πρωταίτια λεμφαδενοπάθεια και μέση ωτίτιδα (Dawson et al., 1967). Μολονότι οι οφθαλμο-γεννητικές χλαμυδιακές λοιμώξεις συνήθως αυτοπεριορίζονται, είναι δυνατόν αν δεν θεραπευθούν ή αν θεραπευθούν ατελώς, η νόσος να επιμένει για μήνες και να οδηγήσει στο σχηματισμό ουλών παρόμοιων του οφθαλμικού τραχώματος (Ronnerstam et al., 1985).



Εικόνα 8. Επιπεφυκίτιδα από έγκλειστα των ενηλίκων.

Λίγοι περισσότεροι από τους μισούς ενήλικες με επιπεφυκίτιδα από έγκλειστα, εμφανίζουν ταυτόχρονα λοίμωξη του γεννητικού συστήματος από *C.trachomatis* (Ronnerstam et al., 1985, Stenberg et al., 1991). Σ' αυτά τα άτομα ο πιθανός τρόπος μετάδοσης της νόσου, είναι ο αυτοενοφθαλμισμός από τις μολυσμένες εκκρίσεις του γεννητικού συστήματος και σε μερικές περιπτώσεις ο άμεσος ενοφθαλμισμός από ένα μολυσμένο σύντροφο. Πιο δύσκολη είναι η εξήγηση της λοίμωξης σε άτομα που δεν έχουν ταυτόχρονη λοίμωξη του γεννητικού συστήματος. Η μετάδοση, από μάτι σε μάτι, με τη μεταφορά μολυσμένων εκκρίσεων, χωρίς να υπάρχει σεξουαλική επαφή, είναι πιθανόν πιο συχνή από ότι αναμένεται (Stenberg et al., 1991). Μολονότι, μόνο το 9% των ασθενών με κερατοεπιπεφυκίτιδα, ηλικίας 16-20 ετών, έχει οφθαλμική λοίμωξη από χλαμύδια, έχει βρεθεί ότι λιγότερο από 1% των ασθενών, με αποδεδειγμένη χλαμυδιακή γενετική λοίμωξη, εμφανίζουν προσβολή των ματιών (Ronnerstam et al., 1985, Stenberg et al., 1991).

Η διαφορική διάγνωση πρέπει να γίνεται από τις ιογενείς επιπεφυκίτιδες, κυρίως από αδενοϊούς (Stenson et al., 1981). Η οριστική διάγνωση τίθεται μόνο με την απομόνωση του αιτίου. Η νόσος ανταποκρίνεται ταχέως στη χορήγηση των κατάλληλων συστηματικών αντιβιοτικών, με μείωση του εκκρίματος, της υπεραιμίας και των συμπτωμάτων της κερατίτιδας, μέσα σε 48 ώρες (Schachter et al., 1978).



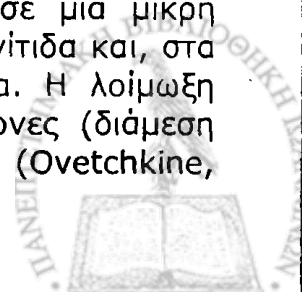
6.2. ΠΕΡΙΓΕΝΝΗΤΙΚΕΣ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ ΤΩΝ ΝΕΟΓΝΩΝ.

6.3.1. Νεογνική επιπεφυκίτιδα από έγκλειστα.

Λοίμωξη του επιπεφυκότα μπορεί να προκληθεί από διάφορα αίτια, όπως ιούς, βακτήρια και μύκητες, ή από τοξικούς παράγοντες, εξωγενείς ή ενδογενείς. Για μεγάλο χρονικό διάστημα θεωρούσαν ότι οι ιοί αποτελούσαν τον κύριο αιτιολογικό παράγοντα, μέχρι την μελέτη του Gigliotti και συν. (1981), που πραγματοποιήθηκε σε μικρά παιδιά με οξεία επιπεφυκίτιδα και η οποία έδειξε ότι το 65% των περιπτώσεων ήταν βακτηριακής αιτιολογίας και μόνο το 20% ιογενούς. Τα δεδομένα αυτά επιβεβαιώθηκαν από τη μελέτη των Weiss και συν. (1993). Η βακτηριακή επιπεφυκίτιδα συνδυάζεται συχνά με μέση ωτίτιδα, συσχέτιση που δείχθηκε από τους Coffey και συν. (1966) και επιβεβαιώθηκε από τον Bodor (1982), με την ονομασία «Σύνδρομο επιπεφυκίτιδας – μέσης ωτίτιδας». Η συχνότητα μιας τέτοιας συσχέτισης, επιπεφυκίτιδας με μέση ωτίτιδα, ποικίλει ανάλογα με τη μελέτη: από 20-36% (Gigliotti et al., 1981, Harrison et al., 1987, Weiss et al., 1993), έως 73% (Bodor, 1982). Η θέση της *Neisseria gonorrhoeae* στην αιτιολογία της βακτηριακής επιπεφυκίτιδας έχει σημαντικά μεταβληθεί κατά τα τελευταία 30 χρόνια, περνώντας από το 15% στο 0,3% (Whittington et al., 1988). Αντίθετα, τα *C. trachomatis* έχουν πάρει μια σημαντική θέση η οποία συχνά φτάνει από το 50% ως το 70% των περιπτώσεων νεογνικής επιπεφυκίτιδας (Yescas-Berendia et al., 1993, CDC, 1998) και ποικίλει ανάλογα με την μελέτη. Σήμερα πάντως, αποτελούν την πρώτη αιτία βακτηριακής επιπεφυκίτιδας στις ΗΠΑ (CDC, 1998).

Η επιπεφυκίτιδα από *C. trachomatis* μεταδίδεται συνήθως κατά τη διάρκεια του τοκετού. Εξαιρέσεις αποτελούν οι περιπτώσεις νεογνών που αποκτούν τη λοίμωξη περιγεννητικά, παρά το ότι η γέννηση έγινε με καισαρική τομή (Shariat et al., 1992), καθώς και νεογνά που μολύνονται μετά τη γέννηση από μολυσμένους φορείς κατά την επαφή με τα χέρια. Μεταξύ 22 και 44% των νεογνών που γεννιούνται από μητέρες μολυσμένες με *C. trachomatis* αναπτύσσουν νεογνική επιπεφυκίτιδα (Harrison et al., 1990). Η επιπεφυκίτιδα από *C. trachomatis* εκδηλώνεται πολύ συχνά μεταξύ 5^{ης} και 12^{ης} ημέρας μετά τη γέννηση, γεγονός που οφείλεται σε μια λανθάνουσα περίοδο, αναγκαία για τον ενδοκυττάριο πολλαπλασιασμό του μικροοργανισμού. Η λανθάνουσα περίοδος μπορεί να είναι μικρότερη σε περίπτωση πρόωρης ρήξης των μεμβρανών, ενώ μπορεί να είναι και πιο παρατεταμένη, μέχρι την 6^η εβδομάδα (Chandler et al., 1977) και κατ' άλλους μέχρι και την 20η εβδομάδα (Ovetchkine, 1999). Τα συμπτώματα, ετερόπλευρα ή αμφοτερόπλευρα, περιλαμβάνουν ένα υδαρές οφθαλμικό έκκριμα που προοδευτικά γίνεται πυώδες. Τα βλέφαρα πρήζονται και ο επιπεφυκότας εμφανίζει υπεραίμια και οίδημα. Κατά τη γέννηση ο επιπεφυκότας δεν έχει λεμφικό ιστό και γι' αυτό τα θυλάκια δεν εμφανίζονται αρχικά, αλλά 3 έως 6 εβδομάδες μετά.

Όσο προχωρά η νόσος μοιάζει με των ενηλίκων, έχοντας μια τάση αυτοπεριορισμού στα περισσότερα αθεράπευτα νεογνά μετά τους 3 ως 12 μήνες (Schachter et al., 1978). Εν τούτοις, οι ήπιες ή οι υποκλινικές λοιμώξεις μπορεί να επιμένουν για αρκετά χρόνια (Bell et al., 1992) και οι μακροπρόθεσμες επιπλοκές, όπως οι ουλές και οι βλάβες του κερατοειδούς, εμφανίζονται σε μια μικρή αναλογία περιστατικών (Persson et al., 1983). Η βλεννοπυώδης ρινίτιδα και, στα θήλα, η αιδοιοκολπίτιδα, σχετίζεται συχνά με την επιπεφυκίτιδα. Η λοίμωξη μπορεί να εξαπλωθεί στο αυτί (μέση ωτίτιδα) και στους πνεύμονες (διάμεση πνευμονία). 20,3% των νεογνών αυτών εμφανίζουν πνευμονία (Ovetchkine, 1999).



Η αρχική διαφορική διάγνωση στο νεογέννητο (Πίνακας: 1) είναι η γονοκοκκική οφθαλμία, η οποία είναι ασυνήθιστη στα νεογνά που παίρνουν οφθαλμική προφύλαξη κατά τη γέννηση, αλλά εξακολουθεί να εμφανίζεται (Hammerschlag et al., 1989). Η οφθαλμική προφύλαξη δεν φαίνεται να είναι αποτελεσματική έναντι των *C.trachomatis*, όταν χορηγούνται τοπικά ερυθρομυκίνη ή τετρακυκλίνες (Hammerschlag et al., 1989).

Τα συχνότερα αίτια νεογνικών επιπεφυκίτιδων και η κλινική τους εικόνα: (Πίνακας: 1)

Μικροοργανισμοί	Εμφάνιση	Κλινική εικόνα
Herpes virus	2-12 ημέρες	Περιοφθαλμικές φουσαλίδες, επιπεφυκίτιδα θυλάκων, κερατίτιδα
Staphylococcus aureus	2-5 ημέρες	Ετερόπλευρη με εφελκίδες, πυώδεις εκκρίσεις
Neisseria gonorrhoe	3 ημέρες ως 3 εβδομάδες	Αμφοτ/ρη υπεραίμια, εκχυμώσεις, λευκές παχύρρευστες εκκρίσεις
Chlamydia trachomatis	5 ημέρες ως 20 εβδομάδες	Επιπεφυκίτιδα ετερό/αμφοτερόπλευρη άφθονες πυώδεις εκκρίσεις
Επιπεφυκίτιδα χημική (από νιτρικό άργυρο)	6-12 ώρες	Υπεραίμια, επιπεφυκότα-δακρύρροια

6.3.2. Πνευμονία των νεογνών.

11-20% των νεογέννητων από μητέρες μολυσμένες με *C. trachomatis*, εμφανίζουν πνευμονία από *C. trachomatis* (Schachter et al., 1986). Τα συμπτώματα εμφανίζονται συνήθως πριν την 8^η εβδομάδα του νεογέννητου με ρινική απόφραξη και/ή εκκρίσεις, ταχύπνοια και βήχα (Tipple et al., 1979). Τα περισσότερα νεογνά έχουν μια ενδιάμεσης βαρύτητας νόσο και είναι απύρετα (Beem et al., 1977). Ιστορικό επιπεφυκίτιδας υπάρχει περίπου στα μισά νεογνά και προσβολή του αυτιού σε περισσότερα από τα μισά (Tipple et al., 1979). Μερικές φορές εμφανίζουν παροξυσμικό, ρυθμικό βήχα κατά τη διάρκεια του ύπνου ή του φαγητού. Κατά την ακρόαση μπορούν να γίνουν αντιληπτοί διάσπαρτοι τρίζοντες, αλλά η αναπνοή είναι συνήθως καλή και απουσιάζουν οι συρρίπτοντες. Η ακτινογραφία θώρακα δείχνει αμφοτερόπλευρη διάμεση διήθηση με εμφύσημα (Tipple et al., 1979). Χαρακτηριστική είναι η περιφερική ηωσινοφιλία, η αρτηριακή υποξαιμία και οι αυξημένοι τίτλοι IgM ανοσοσφαιρινών στον ορό (Beem et al., 1977, Harrison et al., 1978, Tipple et al., 1979). *C.trachomatis* μπορούν συνήθως να απομονωθούν από ρινοφαρυγγικά επιχρίσματα, ταυτόχρονα με τους αυξημένους τίτλους IgM αντιχλαμυδιακών αντισωμάτων (Schachter et al., 1986).

Αν η νόσος παραμένει αθεράπευτη διαρκεί εβδομάδες ή μήνες (Beem et al., 1977). Ειδικότερα, στα πολύ μικρά νεογνά με λοίμωξη από *C. trachomatis*, τα συμπτώματα από το αναπνευστικό σύστημα μπορεί να είναι πιο σοβαρά και να περιλαμβάνουν παρατεταμένες κρίσεις άπνοιας ή αναπνευστική ανεπάρκεια (Broadbent et al., 1988, Wheeler et al., 1990). Τα περισσότερα όμως νεογνά με πνευμονία από *C.trachomatis*, αντιμετωπίζονται ως εξωτερικοί ασθενείς, χωρίς συνήθως εργαστηριακή επιβεβαίωση της διάγνωσης. Εντούτοις, η παρακολούθηση των παιδιών, που είχαν χλαμυδιακή πνευμονία κατά τους 6 πρώτους μήνες της

ζωής τους, έδειξε ότι τα παιδιά αυτά έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα να εμφανίσουν αποφρακτική νόσο των αεροφόρων οδών και άσθμα (Weiss et al., 1986, Brasfield et al., 1987), Γι'αυτό οι μακροχρόνιες αναπνευστικές επιπλοκές μπορεί να είναι σημαντικές.

Η λοίμωξη από *C.trachomatis* που μεταδίδεται περιγεννητικά, μπορεί να επιμένει στο ρινοφάρυγγα, στο ουροποιογεννητικό σύστημα, ή στο ορθό για περισσότερο από δυο χρόνια (Bell et al., 1992), γεγονός που δυσκολεύει τον εντοπισμό των νεαρών παιδιών που έχουν υποστεί σεξουαλική κακοποίηση. Στα μεγαλύτερα παιδιά, η λοίμωξη από *C.trachomatis*, πρέπει να διαφοροδιαγνωσθεί από τις λοιμώξεις που προκαλούν τα *C. pneumoniae*. Γι'αυτό το λόγο, και λόγω των προβλημάτων ειδικότητας των μη-καλλιεργητικών τεχνικών, μόνο η κυτταροκαλλιέργεια, η οποία χρησιμοποιεί ειδικά φθορίζοντα αντισώματα έναντι των *C.trachomatis* για να ανιχνεύσει τα έγκλειστα, θα πρέπει να χρησιμοποιείται για την ανίχνευση των *C.trachomatis* στο γεννητικό σύστημα, στο ορθό, ή στον φάρυγγα των παιδιών (CDC, 1998).

6.4. ΟΦΘΑΛΜΙΚΟ ΤΡΑΧΩΜΑ

Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO), ορίζει την τύφλωση ως την απώλεια της οπτικής οξύτητας, στο πιο υγιές μάτι, σε λιγότερο από τα 3/60, με αποτέλεσμα ο ασθενής να μην μπορεί να περπατήσει ασφαλώς χωρίς βοήθεια.

5,9 εκατομμύρια άνθρωποι, παγκοσμίως, πληρούν αυτό το κριτήριο, εξαιτίας του τραχώματος, θεωρώντας έτσι το τράχωμα υπεύθυνο για το 15% όλων των περιπτώσεων τύφλωσης. 600 εκατομμύρια άνθρωποι ζουν σε περιοχές όπου ενδημεί το τράχωμα, όπως στη Β. Αφρική, Μέση και Άπω Ανατολή, Κεντρική και Νότια Αμερική, Ασία, Αυστραλία και στα νησιά του Ειρηνικού (Thylefors et al., 1998).

Στόχος του WHO είναι η εξάλειψη του τραχώματος ως το 2020 (Anonymous, 1997).

Η πρώτη μόλυνση εμφανίζεται συνήθως νωρίς κατά την παιδική ηλικία και η νόσος παραμένει ενεργής για αρκετά χρόνια. Οι νεαροί έφηβοι αποτελούν τη δεξαμενή της χλαμυδιακής λοίμωξης στις ενδημικές περιοχές. Μολονότι οι αρχικές λοιμώξεις τείνουν να υποχωρούν αυτόματα, συχνά επιπλέκονται με επαναμολύνσεις ή με άλλες βακτηριακές επιπεφυκίτιδες. Μικρόβια, όπως τα: *Haemophilus aegyptius*, *Moraxella lacunata*, ο γονόκοκκος ή ο σταφυλόκοκκος, διευκολύνουν την έναρξη του τραχώματος, συντομεύουν την εξέλιξη των σταδίων και καθυστερούν ή εμποδίζουν την επούλωση των βλαβών.

Κλινικά διακρίνεται σε οξύ και χρόνια τράχωμα, αλλά οι δυο κλινικές εικόνες μπορούν να εμφανιστούν ταυτόχρονα στον ίδιο ασθενή (Εικόνα 9).

Οι οφθαλμικές λοιμώξεις από *C.trachomatis* μπορεί να είναι από ήπιες έως πολύ σοβαρές. Αρκετές λοιμώξεις είναι ασυμπτωματικές. Σε άλλες περιπτώσεις, μετά από μια περίοδο επώασης 5-10 ημερών, η φλεγμονή του επιπεφυκότα εκδηλώνεται με ένα ερεθισμένο, κόκκινο μάτι και άφθονες βλενοπυώδεις εκκρίσεις. Η φλεγμονή του κερατοειδούς χιτώνα μπορεί να προκαλέσει πόνο και φωτοφοβία. Γενικά, τα συμπτώματα είναι ηπιότερα από την εικόνα που δείχνει ο οφθαλμός (Dawson et al., 1981).

Το πρώτο σημάδι της λοίμωξης είναι μια μη ειδική αγγειοδιαστολή των αιμοφόρων αγγείων του επιπεφυκότα. Μετά από μερικές εβδομάδες μπορεί να εκδηλωθούν οι ειδικές βλάβες που προκαλούνται από τη νόσο, τα θυλάκια του επιπεφυκότα. Τα θυλάκια είναι λεμφοειδή βλαστικά κέντρα, που βρίσκονται ακριβώς κάτω από το στρώμα των επιθηλιακών κυττάρων του επιπεφυκότα, με

διάμετρο 0,2 έως 3 mm. Στα νεογνά δεν μπορεί να εκδηλωθεί αυτή η θυλακιώδης αντίδραση της λοίμωξης των οφθαλμών από *C.trachomatis*, διότι, κατά τους 3 πρώτους μήνες της ζωής, τα ανώτερα στρώματα του επιπεφυκότα δεν διαθέτουν λεμφικό ιστό.

Στο αρχικό στάδιο μπορεί επίσης να εμφανιστούν θηλές, οι οποίες στις ήπιες περιπτώσεις τραχώματος εμφανίζονται, με γυμνό μάτι, σαν μικρά κόκκινα σημαδάκια. Με τη βοήθεια της σχισμοειδούς λυχνίας, οι θηλές φαίνονται σαν μικρά πρηξίματα του επιπεφυκότα, το καθένα με ένα μικρό αγγειακό πυρήνα.

Όταν υπάρχει σοβαρή φλεγμονή, η έντονη θηλοειδής αντίδραση του ταρσικού επιπεφυκότα, προκαλεί διάχυτη υπερτροφία του επιπεφυκότα και μερικές φορές οίδημα των βλεφάρων.

• Καθώς προχωρά η νόσος και ο κερατοειδής συμμετέχει στη φλεγμονή. Επιφανειακή στικτή κερατίτιδα εμφανίζεται μετά από έγχυση φλουορεσκεΐνης στον επιπεφυκότα. Επίσης, παρατηρούνται επιφανειακές διηθήσεις, ή σχηματισμός «πάννους» (ινώδεις διηθήσεις και σχηματισμός νέων αιμοφόρων αγγείων στον κερατοειδή χιτώνα).

Τα θυλάκια, οι θηλές και οι βλάβες του κερατοειδούς είναι τα χαρακτηριστικά της ενεργούς νόσου. Το «πάννους» μπορεί να επιμένει για αρκετό καιρό, μετά την υποχώρηση της ενεργούς νόσου (Dawson et al., 1985, Schachter et al., 1978).

Στον επιπεφυκότα εμφανίζονται ουλές μετά τη λύση των θυλακίων. Σε περιοχές όπου ενδημεί το τράχωμα, λόγω των επαναλαμβανόμενων επεισοδίων της λοίμωξης, οι ουλές γίνονται ορατές μακροσκοπικά στον ενώ ταρσικό επιπεφυκότα, μετά από εκστροφή του άνω βλεφάρου, σαν λευκές περιοχές στο ερυθματώδες περιβάλλον του επιπεφυκότα.

Στη στεφάνη (σκληροκερατοειδής ζώνη), η μετατροπή των θυλακίων σε ουλές, οδηγεί στο σχηματισμό ημιδιαυγών εντυπωμάτων, γνωστών ως «εντυπωμάτων του Herbert».

Καθώς το τράχωμα εξελίσσεται στο πέραςμα των χρόνων, οι ουλές συσσωρεύονται, αναγκάζοντας το άνω βλέφαρο να στραφεί προς τα μέσα και τις βλεφαρίδες να τρίβονται πάνω στον οφθαλμικό βολβό. Αυτή η κλινική εικόνα ονομάζεται τριχίαση και όταν όλο το άνω βλέφαρο στρέφεται προς τα μέσα ονομάζεται εντρόπιο. Η τριχίαση είναι ιδιαίτερα επώδυνη, τραυματίζοντας τον κερατοειδή. Ο κερατοειδής είναι ξηρός λόγω των βλαβών και υπάρχει μεγάλη πιθανότητα βακτηριακής ή μυκητιασικής επιμόλυνσης. Οι ουλές είναι αδιαφανείς και όταν καλύψουν το κεντρικό μέρος του κερατοειδή μειώνεται προοδευτικά η όραση.



Εικόνα 9. *C. trachomatis* σε οφθαλμό προκαλώντας τράχωμα. (Από το Dana Center Trachoma Study)



Διαφορική διάγνωση του τραχώματος

Τα θυλάκια δεν είναι παθογνωμονικά του τραχώματος. Σε περιοχές όμως που ενδημεί το τράχωμα, η παρουσία τους υποδηλώνει τη νόσο. Η διαφορική διάγνωση της θυλακιώδους επιπεφυκίτιδας περιλαμβάνει:

1. την επιπεφυκίτιδα από έγκλειστα των ενηλίκων (που οφείλεται σε στελέχη των *C. trachomatis* που προκαλούν ουροποιογεννητικές λοιμώξεις)
2. άλλες βακτηριακές λοιμώξεις, ιδιαίτερα από *Moraxella* spp. και *Streptococcus pneumoniae*
3. ιογενείς λοιμώξεις, κυρίως από αδενοϊούς και ερπητοϊούς
4. δευτεροπαθή τοξική επιπεφυκίτιδα, από φάρμακα ή καλλυντικά και
5. την εαρινή κερατοεπιπεφυκίτιδα (εαρινός κατάρρους).

Οι θηλές δεν είναι βλάβες ειδικές του τραχώματος, ιδιαίτερα όταν δεν συνοδεύονται από θυλάκια. Αποτελούν μέρος της αντίδρασης του επιπεφυκότα σε πολλές οξείες και χρόνιες φλεγμονώδεις καταστάσεις, όπως βακτηριακές, ιογενείς ή αλλεργικές επιπεφυκίτιδες.

Στις ενδημικές περιοχές, το «πάννους», οι ουλές του επιπεφυκότα και η τριχίαση αποτελούν, σχεδόν πάντα, χαρακτηριστικό γνώρισμα του τραχώματος. Τα «εντυπώματα του Herbert» είναι παθογνωμονικά παρελθούσας λοίμωξης.

Η θολερότητα του κερατοειδούς μπορεί να οφείλεται σε παλαιότερο τραυματισμό, ιογενή, βακτηριακή ή μυκητιασική λοίμωξη.

Ταξινόμηση του τραχώματος

Από το 1900, 10 διαφορετικά συστήματα ταξινόμησης του τραχώματος έχουν δημοσιευτεί.

Το 1987, ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO), προτείνει ένα απλό σύστημα σταδιοποίησης του τραχώματος (Thylefors et al., 1987) (πίνακας 2), το οποίο είχε ευρεία αποδοχή. Στην εποχή μας, εφαρμόζεται στην έρευνα και σε προγράμματα που συντονίζονται από οφθαλμιάτρους αλλά και μη ειδικούς που ασχολούνται με το τράχωμα:

1.Τραχωματώδης φλεγμονή-Θυλακιώδης (ΤΘ): Υπάρχουν 5 ή περισσότερα θυλάκια (λεμφοειδείς θύλακοι), στο μέσο του άνω ταρσικού επιπεφυκότα (τα θυλάκια θα πρέπει να έχουν τουλάχιστον 0,5 mm διάμετρο).

2.Τραχωματώδης φλεγμονή-Έντονη (ΤΕ): Έντονη φλεγμονώδη πάχυνση του άνω ταρσικού επιπεφυκότα, με εξαφάνιση των μισών, από τα φυσιολογικά, εν τω βάθει ταρσικών αγγείων.

3.Τραχωματώδης ουλοποίηση του επιπεφυκότα (ΤΟ): Παρουσία ορατών ουλών στον ταρσικό επιπεφυκότα.

4.Τραχωματώδης τριχίαση (ΤΤ): Τουλάχιστον μια βλεφαρίδα στρέφεται προς τα έσω επαπτόμενη στην επιφάνεια του βολβού του οφθαλμού.

5.Θολερότητα του κερατοειδούς (ΘΟ): Ορατή θολερότητα του κερατοειδούς, η οποία βρίσκεται πάνω από την κόρη του οφθαλμού και καλύπτει τουλάχιστον ένα μέρος αυτής.

Σύμφωνα με αυτήν την ταξινόμηση, το στάδιο 1 και 2 υποδηλώνουν ενεργή νόσο.



6.5. ΑΦΡΟΔΙΣΙΟ ΛΕΜΦΟΚΟΚΚΙΩΜΑ (*Lymphogranuloma venereum, LGV*)

Το αφροδίσιο λεμφοκοκκίωμα (LGV), γνωστό και ως «αφροδίσια λεμφοπάθεια», ή «Νόσος των Durand – Nicolas – Favre», είναι ένα σεξουαλικά μεταδιδόμενο νόσημα, που οφείλεται στους L1, L2 και L3 ορότυπους των *C.trachomatis* και εμφανίζουν τροπισμό για τα κύτταρα του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος. Το LGV πρωτοπεριγράφηκε από τον Wallace το 1833 και μετά από τους Durand, Nicolas και Favre το 1913.

Τα *C.trachomatis* δεν μπορούν να μολύνουν τα πλακώδη επιθηλιακά κύτταρα, και όταν η αρχική βλάβη εμφανίζεται στα έξω γεννητικά όργανα ή στον κόλπο, ο μικροοργανισμός εισέρχεται μέσα από μικρές σχισμές ή εκδορές του επιθηλιακού στρώματος των κυττάρων των βλεννωδών μεμβρανών. (Perine et al., 1990). Τα *C.trachomatis* από τη θέση του ενοφθαλμισμού εισέρχονται στο λεμφικό δίκτυο και φτάνουν στους λεμφαδένες όπου και πολλαπλασιάζονται στα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα.

Το LGV θεωρείται σπάνια νόσος στις ΗΠΑ, στην Ευρώπη, στην Αυστραλία και στις περισσότερες περιοχές της Ασίας και Νότιας Αμερικής. Εντούτοις, μια πρόσφατη έξαρση παρατηρήθηκε στην Ολλανδία μεταξύ ομοφυλόφιλων ανδρών που οδήγησε σε αύξηση των περιστατικών του αφροδίσιου λεμφοκοκκίωματος σε Ευρώπη και ΗΠΑ. Οι περισσότεροι από αυτούς τους ασθενείς είχαν συνλοίμωξη με τον ιό HIV. Έως το 2004, 341 περιστατικά αναφέρθηκαν στη Μ. Βρετανία και 80 στις ΗΠΑ, αλλά οι ειδικοί θεωρούν ότι ο πραγματικός αριθμός είναι σημαντικά μεγαλύτερος, διότι αυτός ο τύπος των χλαμυδίων δύσκολα διαγιγνώσκεται και πολλές εκδηλώσεις του δεν επιβεβαιώνονται.

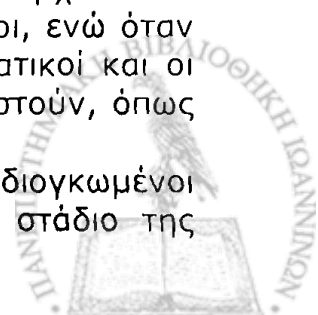
Κλινικά σημεία και συμπτώματα: Οι κλινικές εκδηλώσεις του LGV, εξαρτώνται από τη θέση εισόδου των χλαμυδίων και το στάδιο της νόσου. Ο ενοφθαλμισμός των χλαμυδίων στους βλεννογόνους των εξωτερικών οργάνων (πέους ή κόλπου) οδηγεί στο βουβωνικό σύνδρομο, δηλαδή στο σχηματισμό διογκώσεων (buboes), ή αποστημάτων στη βουβωνική περιοχή. Το ορθρικό σύνδρομο εμφανίζεται όταν τα χλαμύδια εισέρχονται μέσω του ορθρικού βλεννογόνου και χαρακτηρίζεται κυρίως ως πρωκτοκολίτιδα. Το φαρυγγικό σύνδρομο είναι σπάνιο και εμφανίζεται μετά από λοίμωξη των φαρυγγικών ιστών, οπότε διογκώσεις (bubo) μπορεί να εμφανιστούν στην περιοχή του λαιμού.

Πρώτο στάδιο της λοίμωξης: Το LGV μπορεί να ξεκινήσει ως αυτοπεριοριζόμενο ανώδυνο έλκος των γεννητικών οργάνων, το οποίο εμφανίζεται 3-12 μέρες ή και περισσότερο μετά τον ενοφθαλμισμό των χλαμυδίων. Σπανίως οι γυναίκες αναφέρουν το αρχικό έλκος, διότι εμφανίζεται σε κάποια θέση του κοιλιακού τοιχώματος που δεν είναι ορατή από τις ίδιες. Επίσης, λιγότεροι από το 1/3 των μολυσμένων ανδρών αναφέρουν το αρχικό έλκος του LGV. Το έλκος υποχωρεί μετά από μερικές ημέρες.

Δεύτερο στάδιο της λοίμωξης: Εμφανίζεται μετά από 10-30 ημέρες, αλλά έχει εμφανιστεί έως και 6 μήνες μετά. Στο στάδιο αυτό η λοίμωξη προχωρεί στους επιχώριους λεμφαδένες μέσω της λεμφικής οδού.

Όταν η αρχική φάση της νόσου εντοπίζεται στα γεννητικά όργανα, στα 2/3 των περιπτώσεων εμφανίζεται ετερόπλευρη λεμφαδενίτιδα και λεμφαγγειίτιδα των βουβωνικών και μηριαίων λεμφαδένων. Όταν η νόσος εμφανίζεται αρχικά στο ορθό, οι λεμφαδένες που προσβάλλονται είναι οι εν τω βάθει λαγόνιοι, ενώ όταν εμφανίζεται στον κόλπο ή στον τράχηλο, προσβάλλονται οι επιπωματικοί και οι λαγόνιοι λεμφαδένες. Επίσης, συστηματικά σημεία μπορεί να εμφανιστούν, όπως πυρετός, μειωμένη όρεξη και αδιαθεσία.

Κατά την πορεία της νόσου οι λεμφαδένες διογκώνονται. Οι διογκωμένοι λεμφαδένες ονομάζονται buboes και είναι επώδυνοι. Το επόμενο στάδιο της



φλεγμονής είναι πάχυνση και καθήλωση του υπερκείμενου δέρματος. Ακολουθεί νέκρωση, σχηματισμός αποστήματος, συρίγγια και σχηματισμός σηραγγώδους πόρου.

Τρίτο στάδιο της λοίμωξης: Εμφανίζεται ίνωση που μπορεί να οδηγήσει σε ποικίλου βαθμού λεμφική απόφραξη, χρόνιο οίδημα και συρίγγια. Το στάδιο αυτό είναι συνήθως μόνιμο.

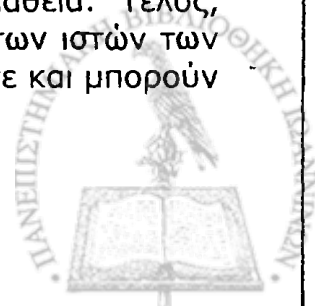
Πρόγνωση: Η πρόγνωση ποικίλει. Η αυτόματη ύφεση είναι συνηθισμένη. Πλήρης θεραπεία μπορεί να γίνει με την κατάλληλη αντιβιοτική αγωγή. Οι βακτηριακές επιμολύνσεις μπορεί να επιπλέξουν την πορεία της νόσου. Θάνατος μπορεί να προκληθεί από εντερική απόφραξη ή διάτρηση. Οι εκκρίσεις μπορεί να προκαλέσουν θυλακίωδη επιπεφυκίτιδα από ενοφθαλμισμό.

Μακροχρόνιες επιπλοκές: Η ελεφαντίαση των γεννητικών οργάνων ή "εσθιομένη" (esthiomene) είναι η δραματική κατάληξη της λεμφικής απόφραξης λόγω των στενώσεων ή των συριγγίων. Εμφανίζεται 1-20 χρόνια μετά την αρχική λοίμωξη, κυρίως στις γυναίκες και μπορεί να ελκοποιηθεί. Επίσης, μπορεί να εμφανιστούν συρίγγια και οίδημα των γεννητικών οργάνων και του ορθού, καθώς και ορθικές ή άλλες αποφράξεις και ουλές. Η συστηματική εξάπλωση μπορεί να οδηγήσει σε αρθρίτιδα, πνευμονίτιδα, ηπατίτιδα ή περιηπατίτιδα.

Διάγνωση: Η διάγνωση είναι συνήθως ορολογική (με σύνδεση του συμπληρώματος) και αποκλεισμό των άλλων αιτιών βουβωνικής λεμφαδενοπάθειας ή γεννητικών ελκών. Τα ορολογικά τεστ έχουν ευαισθησία 80% μετά τις 2 εβδομάδες. Οι ορολογικές μέθοδοι δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται για οροτυποποίηση λόγω των διασταυρούμενων αντιδράσεων με άλλα είδη χλαμυδίων. Για την ταυτοποίηση των οροτύπων γίνεται καλλιέργεια. Επίσης, εφαρμόζονται ο ανοσοφθορισμός και η PCR. Τα τελευταία χρόνια για τη διάγνωση του LGV εφαρμόζεται μια ταχεία, «πραγματικού χρόνου PCR» (realtime PCR, Taqman analysis).

Τέλος, στη διάγνωση βοηθά και η βιοψία των μολυσμένων ιστών. Η ιστολογική εξέταση των λεμφαδένων δείχνει μια χαρακτηριστική φλεγμονώδη αντίδραση με κεντρικά, αστεροειδώς συμφύομενα, αποστήματα τα οποία περιέχουν πολυμορφοπύρρηνα και νεκρωμένους ιστούς. Αυτά περιβάλλονται από μια ζώνη επιθηλιοειδών κυττάρων, μακροφάγων και περιστασιακά πολυπύρηνων γιγαντοκυττάρων. Γύρω από αυτά, υπάρχει ένα στρώμα λεμφοκυττάρων και πλασματοκυττάρων. Με τον καιρό οι οζώδεις σχηματισμοί εξαφανίζονται και αντικαθίστανται από ινώδη ιστό. Αυτή η ιστοπαθολογική εικόνα πιθανολογεί τη διάγνωση αφροδίσιου λεμφοκοκκιώματος ή νόσου από νύγμα γάτας, αλλά μπορεί να συναντηθεί και σε άλλες οντότητες.

Διαφοροδιάγνωση: Από τον έρπη των γεννητικών οργάνων, τη σύφιλη, το μαλακό έλκος και τη μικροβιακή λεμφαδενίτιδα. Η διαφορική διάγνωση της βουβωνικής λεμφαδενοπάθειας από τον έρπη των γεννητικών οργάνων, βασίζεται στην παρουσία πολλαπλών επώδυνων ελκών στη θέση της αρχικής ερπητικής λοίμωξης, σε αντίθεση με τις ανώδυνες αρχικές βλάβες και τη βουβωνική διόγκωση του LGV. Επίσης, η λεμφαδενοπάθεια είναι συχνά αμφοτερόπλευρη στον έρπη αντιθέτως προς το LGV. Η διάγνωση της σύφιλης πιθανολογείται όταν εμφανίζεται αρχικά το συφιλιδικό σκληρό έλκος και αμφοτερόπλευρη, ανώδυνη βουβωνική λεμφαδενοπάθεια. Το μαλακό έλκος πιθανολογείται όταν εμφανίζονται μεγάλα έλκη, πολλαπλά και ιδιαίτερα επώδυνα, μαζί με λεμφαδενοπάθεια. Τέλος, είναι πιθανή η μικροβιακή λεμφαδενίτιδα, όταν υπάρχει φλεγμονή των ιστών των μηρών, των γλουτών, των άκρων ή της περιγεννητικής χώρας, οπότε και μπορούν να μολυνθούν οι βουβωνικοί λεμφαδένες.



6.6. Εξέλιξη της λοίμωξης από *C. trachomatis*: αυτόματη ίαση ή επιμονή;

Η φυσική ιστορία των χλαμυδιακών λοιμώξεων δεν είναι γνωστή ή προβλέψιμη. Οι λοιμώξεις από *C. trachomatis*, είναι πιθανό ότι μπορούν να ιαθούν αυτόματα ακόμα και χωρίς θεραπεία. Από πειράματα σε ζώα, κυρίως σε ανώτερα πρῶτισσα, η εκδήλωση ανοσιακής απάντησης μετά τη λοίμωξη ή την επαναλοίμωξη από *C. trachomatis* μπορεί να προκαλέσει σταδιακή εκρίζωσή τους (Wolner-Hanssen et al., 1991). Μελέτες σε ποντίκια, στα οποία έχουν επιτυχώς ενοφθαλμισθεί *C. trachomatis*, δείχνουν ότι εμφανίζεται ίαση της λοίμωξης σε ανοσοεπαρκή ποντίκια 4-5 εβδομάδες μετά τον ενοφθαλμισμό, μια διαδικασία η οποία απαιτεί τα T κύτταρα MHC τάξεως II, να ανταποκρίνονται αποτελεσματικά (Morfison et al., 1995). Προφανώς, παρόμοιες μελέτες δεν μπορούν να γίνουν σε ανθρώπους. Μελέτες όμως σε ασθενείς οι οποίοι δεν πήραν θεραπεία για *C. trachomatis*, παρά το αρχικό θετικό αποτέλεσμα, και οι οποίοι συνέχιζαν να έχουν θετικά αποτελέσματα, δείχνουν ότι και οι άνθρωποι επίσης μπορούν να αναπτύξουν μια αποτελεσματική ανοσολογική αντίδραση έναντι των *C. trachomatis* και να ιαθούν αυτόματα. Σε μια έρευνα στην Αλαμπάμα, μελετήθηκαν ασθενείς που προσέρχονταν σε ουρολογική κλινική για συμπτώματα από κάποιο άλλο σεξουαλικά μεταδιδόμενο νόσημα. Ταυτόχρονα, ελέχθησαν και για *C. trachomatis* περισσότερες από μια φορές μέσα σε 45 ημέρες. Διαπιστώθηκε, λοιπόν, ότι το 28% (21/75) των ασθενών εμφάνισαν αυτόματη ίαση από τη λοίμωξη μέσα σε 45 ημέρες από το αρχικό θετικό αποτέλεσμα (Parks et al., 1997).

Σε μια πιο πρόσφατη μελέτη, όπου η λοίμωξη από *C. trachomatis* ανιχνεύθηκε μόνο με PCR, 22% των γυναικών (13/58) εμφάνισαν αυτόματη ίαση σε 10 ημέρες κατά μέσο όρο (από 2 έως 231 ημέρες) (Joyner et al., 2002).

Σε καμιά από αυτές τις μελέτες δεν ήταν δυνατό να προσδιορισθεί αν τα *C. trachomatis*, που ανιχνεύθηκαν για δεύτερη φορά στις γυναίκες, αποτελούσαν μια νέα λοίμωξη ή επιμονή της αρχικής. Γενικότερα, είναι φανερό ότι ακόμα και χωρίς θεραπεία, τουλάχιστον 20-30% των γυναικών ιάται αυτόματα, ενώ στις νεαρές γυναίκες, στις οποίες η συχνότητα χλαμυδιακής λοίμωξης είναι υψηλότερη, η πιθανότητα αυτόματης ίασης είναι πιο μικρή.

Άλλες μελέτες καταλήγουν ότι τα *C. trachomatis* μπορούν να παραμένουν για μεγάλο χρονικό διάστημα στο γεννητικό σύστημα των γυναικών. Όπως σε 14 γυναίκες που παρακολούθηθηκαν για τουλάχιστον 15 μήνες χωρίς ειδική θεραπεία, οι 7 παρέμειναν μολυσμένες (McCormack et al., 1979). Επίσης, το 80% (68/85) των εφήβων γυναικών που παρέμεναν ασυμπτωματικές, ήταν ακόμη μολυσμένες όταν επανεξετάστηκαν 2 μήνες ή και περισσότερο μετά την αρχική διάγνωση (Rahm et al., 1988). Παρόμοια περιστατικά επιμένουσας χλαμυδιακής λοίμωξης είναι η περίπτωση αφροδίσιου λεμφοκοκκιώματος στην οποία *C. trachomatis* ανιχνεύθηκαν 20 χρόνια μετά (Dan et al., 1980), η επιμονή της παρουσίας των *C. trachomatis* στο αρθρικό υγρό ασθενών με σύνδρομο Reiter (Rahman et al., 1992), η ανίχνευση χλαμυδιακού DNA σε βιοπτικό υλικό φαλλοπιανού πόρου από γυναίκες με στείρωση (Campbell et al., 1993), νεογνά με επιμένουσα λοίμωξη από *C. trachomatis* για περισσότερο από 28 μήνες (Bell et al., 1992), καθώς και η απομόνωση των *C. trachomatis* από τον φαλλοπιανό πόρο και το ενδομήτριο γυναικών με στείρωση για τις οποίες η πρόσφατη απόκτηση λοίμωξης δεν ήταν πιθανή (Shepard et al., 1989).



7. ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ.

Η διάγνωση λοίμωξης από *C. trachomatis* μπορεί να γίνει με διάφορες μεθόδους: με καλλιέργεια, με ανίχνευση των χλαμυδιακών αντιγόνων και με μοριακές μεθόδους ενίσχυσης του νουκλεϊνικού οξέος των *C. trachomatis*.

7.1. ΣΥΛΛΟΓΗ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ.

Ο σωστός τρόπος συλλογής και διατήρησης των δειγμάτων είναι απαραίτητος για την ακρίβεια και αποτελεσματικότητα των μεθόδων ανίχνευσης των *C. trachomatis*. Η ύπαρξη ακατάλληλων δειγμάτων είναι ένα από τα σοβαρότερα μειονεκτήματα σε ερευνητικές μελέτες και προγράμματα ελέγχου του πληθυσμού. Σε μια μελέτη που ασχολήθηκε με την καταλληλότητα των υπό εξέταση δειγμάτων (Kelllogg et al., 1995), μόλις το 25% αυτών κρίθηκαν κατόπιν μικροσκοπικής εξέτασης κατάλληλα, ενώ περισσότερες λοιμώξεις ανιχνεύθηκαν με PCR σε δείγματα που είχαν κριθεί προηγουμένως κατάλληλα προς εξέταση (Kelllogg et al., 1996).

Επειδή τα *C. trachomatis* είναι υποχρεωτικά ενδοκυττάριοι μικροοργανισμοί, ο απώτερος σκοπός είναι η συλλογή επιθηλιακών κυττάρων του ξενιστή που τα περικλείει. Δείγματα με βλέννη ή άφθονες εκκρίσεις και λίγα επιθηλιακά κύτταρα είναι ακατάλληλα. Ακόμα και οι μοριακές μέθοδοι που δεν προϋποθέτουν ακέραια στοιχειώδη σωμάτια των *C. trachomatis* εφόσον και λίγα αντίγραφα γενετικού υλικού είναι αρκετά για ένα θετικό αποτέλεσμα, φαίνεται ότι επηρεάζονται άμεσα από την καταλληλότητα του δείγματος (Kelllogg et al., 1995).

Υπάρχουν κάποιες διαφορές, στη συλλογή και μεταφορά των δειγμάτων, μεταξύ των μη καλλιεργητικών τεχνικών ανίχνευσης των *C. trachomatis* και της κυτταροκαλλιέργειας στην οποία μας ενδιαφέρει η βιωσιμότητα των *C. trachomatis*.

7.1.1. Συλλογή και μεταφορά κλινικών δειγμάτων για ανίχνευση *C. trachomatis* με καλλιέργεια

Δείγματα, όπως ρινοφαρυγγικά νεογνών και ουρηθρικά επιχρίσματα γυναικών και ασυμπτωματικών ανδρών έχει προταθεί από το CDC να ελέγχονται για *C. trachomatis* με καλλιέργεια και όχι με μη καλλιεργητικές μεθόδους (CDC, 1993). Επίσης, όταν υπάρχει υποψία σεξουαλικής κακοποίησης ή παρόμοια νομικά θέματα, επιβάλλεται να γίνεται καλλιέργεια ανεξάρτητα από το είδος και την προέλευση του δείγματος (CDC, 1993).

Το πιο συνηθισμένο είδος δείγματος στις γυναίκες για απομόνωση των *C. trachomatis* με καλλιέργεια είναι το **ενδοτραχηλικό** και η λήψη μπορεί να γίνει με στυλεό ή με κυτταρολογική βούρτσα. Ο τύπος του στυλεού είναι σημαντικός διότι κάποιος μπορεί να είναι τοξικοί για την κυτταροκαλλιέργεια ή να αναστέλλουν την ανάπτυξη των *C. trachomatis* μέσα στα κύτταρα (Mahony et al., 1985). Στυλεοί με dacron, rayon, αλγινικό ασβέστιο ή βαμβάκι μπορούν να χρησιμοποιούνται, ενώ στυλεοί με ξύλινη λαβή θα πρέπει να αποφεύγονται. Ο στυλεός εισέρχεται στον ενδοτραχηλο σε βάθος 1-2 cm, περιστρέφεται για 15 έως 30 sec και εξέρχεται αποφεύγοντας την επαφή με τη χλωρίδα του κόλπου. Οι κυτταρολογικές βούρτσες μπορούν να συλλέξουν περισσότερα κύτταρα από τους στυλεούς, γι' αυτό μερικοί ερευνητές υποστηρίζουν ότι η χρήση τους βοηθά στην απομόνωση περισσότερων *C. trachomatis* (Moncada et al., 1989). Εντούτοις, οι βούρτσες είναι πιο επεμβατικές και προκαλούν συχνά αιμορραγία που αποτελεί ανασταλτικό παράγοντα για μερικές μη καλλιεργητικές μεθόδους (Akane et al.,

1994). Από το 1993, το CDC προτείνει ότι το επιχρίσμα για τεστ Παπανικολάου θα πρέπει να προηγείται της λήψης ενδοτραχηλικού δείγματος για καλλιέργεια *C. trachomatis*. Η αιμορραγία όμως που ακολουθεί τη χρήση της κυταρολογικής βούρτσας είναι η αιτία που σε ορισμένα κέντρα η λήψη του επιχρίσματος για τεστ Παπανικολάου έπεται του δείγματος για καλλιέργεια.

Κατά τη λήψη **ουρηθρικού επιχρίσματος** από τις γυναίκες για καλλιέργεια, ο στυλεός εισάγεται 1cm στο έξω ουρηθρικό στόμιο, περιστρέφεται και εν συνεχεία τοποθετείται στο κατάλληλο υλικό μεταφοράς. Ο ενοφθαλμισμός του ουρηθρικού και ενδοτραχηλικού επιχρίσματος στο ίδιο υλικό μεταφοράς φαίνεται ότι αυξάνει την ευαισθησία της καλλιέργειας κατά 23% (Jones et al., 1986).

Η συλλογή ουρηθρικού επιχρίσματος στον άνδρα για καλλιέργεια γίνεται με την είσοδο του στυλεού 3-4cm από το έξω ουρηθρικό στόμιο, περιστροφή και αφαίρεση. Δεν θα πρέπει να έχει προηγηθεί ούρηση, διότι με το ξέπλυμα και την απομάκρυνση των μολυσμένων επιθηλιακών κυττάρων μειώνεται η ευαισθησία των περισσότερων τεχνικών.

Στα **οφθαλμικά επιχρίσματα**, όπως και στα ενδοτραχηλικά, πρέπει να προηγείται η απομάκρυνση εξιδρωμάτων και άλλων στοιχείων φλεγμονής και στη συνέχεια να τρίβεται ο στυλεός πάνω στον ανεστραμμένο βλεφαρικό επιπεφυκότα.

Σε υποψία αφροδίσιου λεμφοκοκκιώματος, συλλέγεται πύον από τους αδένες, λαμβάνεται δείγμα με στυλεό από το ορθό, ή βιοψία από τον κατώτερο εντερικό σωλήνα, ιδιαίτερα από υπερτροφικές ή ελκωτικές βλάβες.

Μετά τη συλλογή τους, τα δείγματα προς καλλιέργεια, τοποθετούνται στη συντήρηση του ψυγείου, δηλαδή στους 2-8 βαθμούς Κελσίου, μέχρι τη μεταφορά τους στο εργαστήριο. Ο ιδανικός χρόνος από τη συλλογή του δείγματος για καλλιέργεια μέχρι την επεξεργασία του θα πρέπει να είναι κάτω από 48 ώρες, ενώ διαφορετικά πρέπει να καταψύχονται στους -70 βαθμούς Κελσίου.

Υλικό μεταφοράς των δειγμάτων για καλλιέργεια είναι το 2SP (2-sucrose phosphate) ή το sucrose-glutamate phosphate. Η προσθήκη 2-5% ορού εμβρύου βοός υποστηρίζεται από μερικούς ερευνητές ότι βοηθά στη διατήρηση της βιωσιμότητας των χλαμυδίων σε δείγματα που πρέπει να καταψυχθούν. Στο υλικό μεταφοράς προστίθενται επίσης αντιμικροβιακοί παράγοντες, στους οποίους τα χλαμύδια είναι ανθεκτικά, για να αναστείλουν ή να προλάβουν την ανάπτυξη μυκήτων ή βακτηρίων που υπάρχουν στα κλινικά δείγματα. Ευρέως φάσματος αντιβιοτικά όπως τετρακυκλίνες, πενικιλίνες, ή μακρολίδες, πρέπει να αποφεύγονται. Συνήθως προστίθενται γενταμικίνη ή βανκομικίνη για τις επιμολύνσεις από βακτήρια και αμφοτερικίνη Β ή νυστατίνη για τις επιμολύνσεις από μύκητες. Το 2SP υλικό μεταφοράς είναι κατάλληλο και για την καλλιέργεια και για τις μοριακές τεχνικές έτσι ώστε σε ένα δείγμα να μπορούν να ανιχνευθούν χλαμύδια και με τις δυο τεχνικές (Salmon et al., 1994).

7.1.2. Συλλογή και μεταφορά δειγμάτων για ανίχνευση *C.trachomatis* με μη καλλιεργητικές μεθόδους

Στις μη καλλιεργητικές μεθόδους ακολουθούνται οι οδηγίες των κατασκευαστών, τόσο για το είδος του δείγματος, όσο και για τη συλλογή και μεταφορά τους, η οποία δεν διαφέρει από αυτή των δειγμάτων για καλλιέργεια.

Ενδοτραχηλικά δείγματα με βαμβακοφόρο στυλεό για την αναζήτηση *C. trachomatis*, θα πρέπει να λαμβάνονται από τις γυναίκες που έχουν ένδειξη πυελικής εξέτασης. Εάν λαμβάνεται και ουρηθρικό δείγμα με βαμβακοφόρο στυλεό, θα ανιχνευθεί επιπλέον ένα 15% των χλαμυδιακών λοιμώξεων. Μολονότι

δεν προτείνεται η χρήση των NAAT σε δείγματα από τον φάρυγγα ή το ορθό, κάτι τέτοιο θα μπορούσε να αυξήσει ακόμα περισσότερο την ευαισθησία των μοριακών μεθόδων.

Η δυνατότητα συλλογής **ούρων** για ανίχνευση *C.trachomatis*, είναι ένα μεγάλο πλεονέκτημα που προσφέρει η χρήση των μοριακών τεχνικών, διότι είναι εύκολη, μη επεμβατική, εφόσον δεν απαιτεί τη βοήθεια εξειδικευμένου προσωπικού και επιτρέπει τη μελέτη ασυμπτωματικού πληθυσμού, ιδιαίτερα των ασυμπτωματικών ανδρών. Αφετέρου, καλλιέργεια σε δείγματα ούρων δεν εφαρμόζεται, ενώ οι τεχνικές ανίχνευσης αντιγόνου στα ούρα δεν θεωρούνται ευαίσθητες συγκριτικά με τις μοριακές και περιορίζονται μόνο στην αναζήτηση *C.trachomatis* σε δείγματα ούρων συμπτωματικών ανδρών (Chernesky et al., 1990*, Chernesky et al., 1995).

Συλλέγονται 10-20 ml ούρων από το πρώτο ρεύμα της ούρησης, σε καθαρό ουροσυλλέκτη και διατηρούνται στους 2-8 βαθμούς Κελσίου έως και 4 ημέρες. Δεν θα πρέπει να έχει προηγηθεί ούρηση τουλάχιστον για 2 ώρες και οι γυναίκες δεν πρέπει να έχουν πλύνει την περινεϊκή περιοχή πριν την ούρηση.

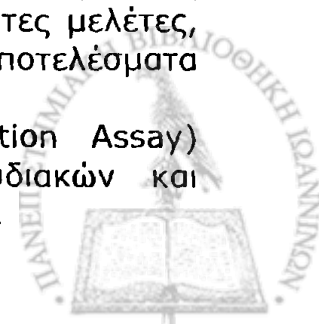
Μια νέα και υποσχόμενη προσπάθεια των μοριακών τεχνικών, είναι η ανίχνευση *C.trachomatis* σε **κολπικά ή αιδοϊκά επιχρίσματα**

Ειδικότερα, υπάρχουν πολλά πλεονεκτήματα από την ανίχνευση *C.trachomatis* σε μη επεμβατικά δείγματα (Cook et al., 2005):

1. Οι ασθενείς προτιμούν αυτόν τον τρόπο συλλογής των δειγμάτων (Pimenta et al., 2003).
2. Απαιτείται λιγότερο εξειδικευμένο προσωπικό και εξοπλισμός και μπορεί να γίνει από πληθυσμιακές ομάδες που συνήθως δεν συμμετέχουν σε προγράμματα με δείγματα από το ουροποιογεννητικό σύστημα, όπως: μαθητές, κέντρα νεότητας, ή κλινικές πρωτοβάθμιας περίθαλψης. Μια πρόσφατη κλινική μελέτη έδειξε ότι το ποσοστό των σεξουαλικά ενεργών έφηβων κοριτσιών που συμμετείχαν σε προγράμματα ελέγχου για *C.trachomatis*, αυξήθηκε από 8% έως και περισσότερο από 40%, όταν το πρόγραμμα περιλάμβανε συλλογή ούρων συγκριτικά με τη συλλογή τραχηλικού επιχρίσματος (Shafer et al., 2002).
3. Παρέχει τη δυνατότητα τα δείγματα να λαμβάνονται στο σπίτι και να αποστέλλονται ταχυδρομικώς απευθείας στο εργαστήριο (Ostergaard et al., 1996).
4. Η στρατηγική της λήψης του δείγματος από το σπίτι και όχι σε κάποιο οργανωμένο κέντρο, έχει βοηθήσει σημαντικά στην εξεύρεση νέων περιστατικών λοίμωξης (Andersen et al., 2002, Bloomfield et al., 2002). Τυχαίοποιημένες μελέτες έχουν δείξει ότι, δίνει τη δυνατότητα ανίχνευσης περισσότερων ασυμπτωματικών λοιμώξεων καθώς και εξέτασης των σεξουαλικών συντρόφων (Andersen et al., 1998, Ostergaard et al., 1998). Επίσης, μπορεί να οδηγήσει σε μείωση κατά 50% της συχνότητας της πυελικής φλεγμονώδους νόσου και κατά 50% μείωση της συχνότητας των χλαμυδιακών λοιμώξεων στην κοινότητα, μέσα σε ένα χρόνο (Ostergaard et al., 2000).

Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η ευαισθησία της PCR στα κολπικά επιχρίσματα που συλλέγονται από τον ίδιο τον ασθενή, είναι σχεδόν ίδια με την ευαισθησία της στα τραχηλικά επιχρίσματα (Black et al., 2002). Και άλλες πρόσφατες μελέτες, εφαρμόζοντας άλλες μοριακές μεθόδους κατέληξαν σε παρόμοια αποτελέσματα (Cosentino et al., 2003, Schachter et al., 2003).

• Η μοριακή μέθοδος TMA (Transcription Mediated Amplification Assay) πρόσφατα εγκρίθηκε από το FDA για την ανίχνευση χλαμυδιακών και γονοκοκκικών λοιμώξεων σε κολπικά επιχρίσματα (Cook et al., 2005).

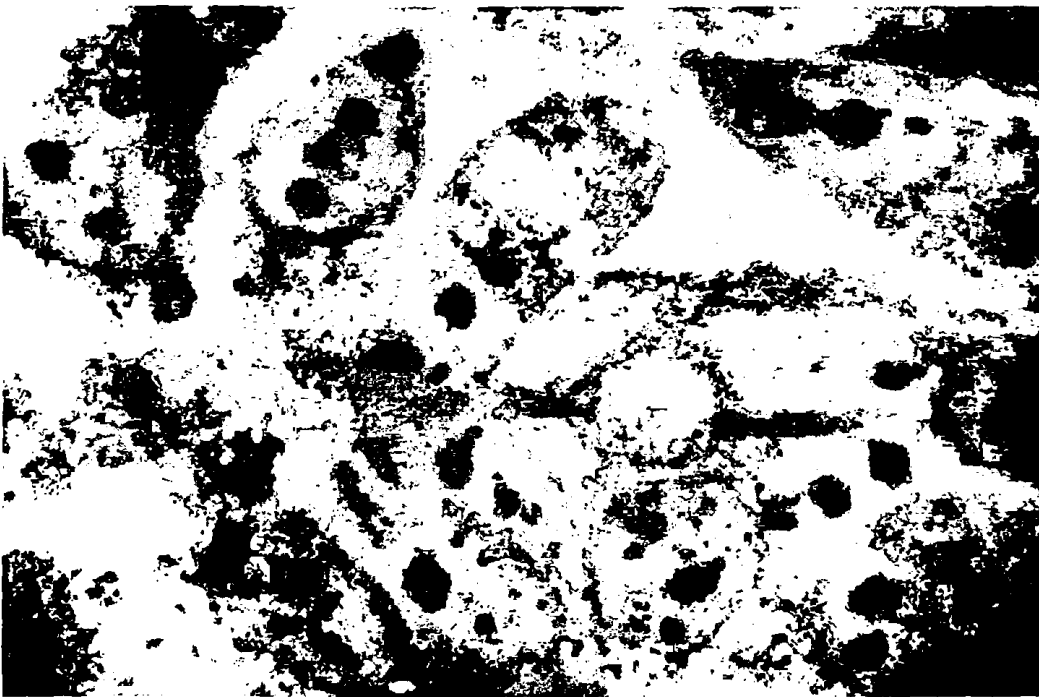


ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ - ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ.

Τα *Chlamydia* χρησιμοποιούν ATP και άλλους διατροφικούς παράγοντες από κύτταρο-ξενιστή. Ως εκ τούτου, μπορούν να αναπαραχθούν μόνο σε άλλα γαρά. Έτσι, το 1957 καλλιιεργήθηκαν επιτυχώς σε έμβρυο κότας (Tang et al., 7) και το 1977, οι Rira και Mardh ανέπτυξαν μια μέθοδο για την ττροκαλλιέργεια των *C. trachomatis* σε McCoy κύτταρα προσθέτοντας λοεξιμίδη κατά το στάδιο της επώασης (Rira et al., 1977). Η κυκλοεξιμίδη πτέλλει την πρωτεϊνοσύνθεση στο κύτταρο-ξενιστή, αφήνοντας περισσότερα πτικά συστατικά για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των χλαμυδίων.

Για τη διασφάλιση ενός σωστού αποτελέσματος απαιτείται γρήγορος θθαλισμός του δείγματος σε υλικό μεταφοράς εμπλουτισμένου με φωσφορική κρόζη και παραμονή σε ψυχρό περιβάλλον κατά τη διάρκεια της μεταφοράς. βασικές αρχές της καλλιέργειας περιλαμβάνουν φυγοκέντρηση του θθαλίσματος μαζί με το μονό στρώμα των κυττάρων, επώαση για 48-72 ώρες ρώση.

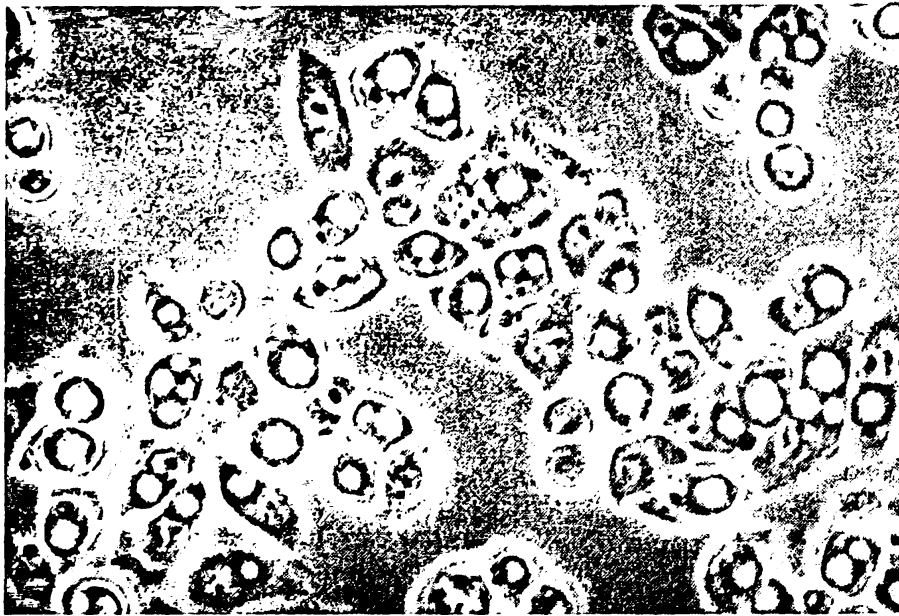
Τα έγκλειστα, περιέχουν χιλιάδες μικροοργανισμούς των *C. trachomatis*, τα α μπορούν να γίνουν ορατά με χρώση Gram, Giemsa (Εικόνα 10), ιωδίνη, με τη χρήση σημασμένων φθοριζόντων μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι από τα αντιγόνα της επιφάνειας των *C. trachomatis* (Steam ET al., 1983) προτίμηση του MOMP που είναι ειδικό του είδους. Η χρήση των φθοριζόντων κλωνικών αντισωμάτων αυξάνει την ευαισθησία της κυτταροκαλλιέργειας ριτικά με τη χρώση ιωδίνης (Phillips et al., 1990), η οποία είναι πιο ομική, αλλά και λιγότερο ευαίσθητη. Η ιωδίνη είναι ειδική χρώση για το γγόνο, το οποίο όμως υπάρχει σε ορισμένες μόνο φάσεις ανάπτυξης των *C. omatis*. Έτσι, η τεχνική της χρώσης με ιωδίνη έχει χαμηλή ευαισθησία, ενώ βοηθά σε ενδοτραχηλικά δείγματα γιατί τα φυσιολογικά κύτταρα του ήλου περιέχουν γλυκογόνο.



Εικόνα 10. Στο οπτικό μικροσκόπιο: κύτταρα Hella με *Chlamydia trachomatis* χρωματισμένα με χρώση Giemsa.

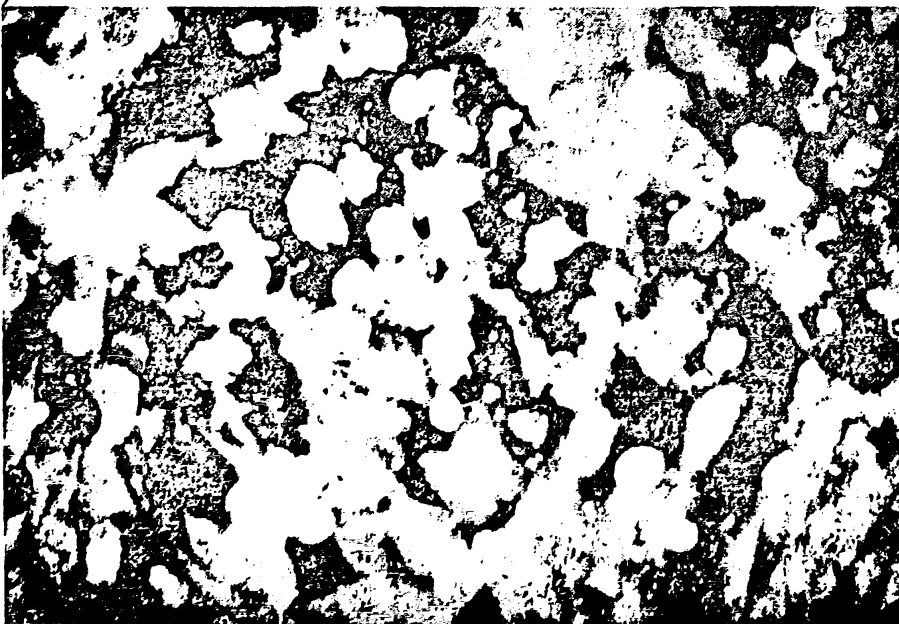


Οι κυτταρικές σειρές που έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανάπτυξη *Chlamydia trachomatis* είναι τα McCoy κύτταρα (Stamm et al., 1983), τα HeLa 2 al., 1972) (Εικόνα 11) και πιο πρόσφατα τα BGMK (Krech et al., 1989), οι ινοβλάστες ποντικού L434 (Ward, 2002).



Εικόνα 11. Στο οπτικό μικροσκόπιο: κύτταρα HeLa μολυσμένα με *Chlamydia trachomatis* 24 ώρες μετά τη λοίμωξη.

Μια τροποποιημένη τεχνική της κυτταροκαλλιέργειας είναι τα "s" (Εικόνα 12), η χρήση δηλαδή φιαλιδίων (διαμέτρου 15 mm) που γυάλινη καλυπτρίδα (διαμέτρου 13 mm) πάνω στην οποία έχουν το κύτταρα McCoy. Η καλλιέργεια που χρησιμοποιεί τα "shell vials" ευαίσθητη και πιο ειδική από μια άλλη τεχνική καλλιέργειας, την "microtiter plate", λόγω του μεγαλύτερου εναιωρήματος στο οποίο ενοφεί το δείγμα, καθώς και του μικρότερου κινδύνου επιμόλυνσης (Stamm 1983, CDC, 2002).



Εικόνα 12. *C. trachomatis* σε δείγμα από τραχηλικό επίχρισμα που καλλιεργήθηκαν σε κύτταρα Mc Coy, με την τεχνική των shell vials (Υλικό από το αρχείο της συγγραφέως)



Η τεχνική της κυτταροκαλλιέργειας είναι η ίδια για το τράχωμα, την επιπεφυκίτιδα από έγκλειστα, καθώς και για τις χλαμυδιακές λοιμώξεις του γεννητικού συστήματος.

Η ειδικότητα της καλλιέργειας φτάνει στο 100% λόγω της χαρακτηριστικής μορφολογίας των εγκλείστων, αλλά και της χρήσης φθοριζόντων μονοκλωνικών αντισωμάτων.

Η ευαισθησία της δεν είναι πολύ υψηλή (Schachter, 1998), διότι αρκετοί μικροοργανισμοί μπορεί να χάσουν τη δραστηριότητά τους κατά τη μεταφορά ή αποθήκευση, γεγονός που μειώνει την πιθανότητα πολλαπλασιασμού τους. Επιπλέον, το στρώμα των κυττάρων στην επιφάνεια της κυτταροκαλλιέργειας και/ή το ποσό του δείγματος/υλικού που ενοφθαλμίζεται μπορούν να επηρεάσουν την ευαισθησία της καλλιέργειας. Επίσης, η ανάπτυξη των χλαμυδίων στην καλλιέργεια μπορεί να ανασταλεί από κυτοκίνες ή αντισώματα που παράγουν οι μολυσμένοι ιστοί και ενοφθαλμίζονται στο καλλιεργητικό μέσο μαζί με το δείγμα (Rothermel et al., 1989).

Σε ενδοτραχηλικά δείγματα η ευαισθησία της καλλιέργειας δεν ξεπερνά το 70%, ενώ σε ουρηθρικά δείγματα ανδρών είναι αρκετά πιο χαμηλή.

Για να αυξηθεί η ευαισθησία της καλλιέργειας, ιδιαίτερα όταν υπάρχουν χαμηλά επίπεδα λοίμωξης, γίνονται ένα ή περισσότερα «τυφλά περάσματα» (blind passages) της καλλιέργειας. Συγκεκριμένα, οι αρνητικές καλλιέργειες ομογενοποιούνται και ενοφθαλμίζονται σε καινούργιο στρώμα κυττάρων. Η παρουσία ακόμα και ενός εγκλείστου είναι αρκετή για να χαρακτηριστεί η καλλιέργεια θετική (Solomon et al., 2004).

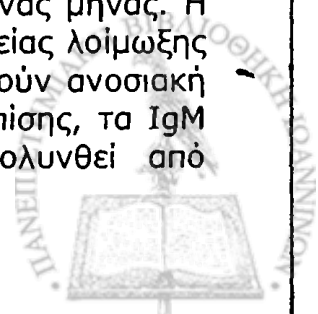
Η τεχνική της καλλιέργειας των *C. trachomatis* εφαρμόζεται μόνο σε λίγα εργαστηριακά κέντρα διότι είναι τεχνική υψηλού κόστους, επίπονη και χρονοβόρα εφόσον απαιτούνται 3-7 ημέρες για τη λήψη των αποτελεσμάτων.

Η κυτταροκαλλιέργεια είναι η μόνη μέθοδος που ανιχνεύει ζωντανά *C. trachomatis* και έχει υψηλή ειδικότητα ώστε να μπορεί να λαμβάνεται υπόψιν σε νομικά θέματα. Επίσης, στις κυτταροκαλλιέργειες μπορούν να διατηρηθούν τα *C. trachomatis* για περαιτέρω μελέτες, όπως για τυποποίηση του γένους τους ή για έλεγχο ευαισθησίας στα αντιβιοτικά. Επιπλέον, λόγω της υψηλής ειδικότητάς της, η καλλιέργεια θα πρέπει να περιλαμβάνεται στις μεθόδους αναφοράς σε συγκριτικές μελέτες που σκοπό έχουν να αξιολογήσουν μια νέα διαγνωστική τεχνική.

7.3. ΟΡΟΛΟΓΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ.

Οι ορολογικές μέθοδοι γενικά δεν βοηθούν στη διάγνωση λοίμωξης του γεννητικού συστήματος από *C. trachomatis*, καθώς και στη λήψη κλινικών αποφάσεων από τους γυναικολόγους και τους μαιευτήρες, διότι η θετική και αρνητική προγνωστική αξία της οροδιάγνωσης είναι χαμηλή. Αυτό συμβαίνει γιατί τα αντισώματα που εμφανίζονται μετά από μια χλαμυδιακή λοίμωξη ζουν επί μακρόν και ένας θετικός τίτλος αντισωμάτων δεν βοηθά στη διάκριση παλαιάς από πρόσφατη λοίμωξη (CDC, 2002).

Κατά την έναρξη της νόσου, η παρακολούθηση αύξησης του τίτλου των IgM αντισωμάτων, βοηθά στη διάγνωση, αλλά χρειάζεται έως και ένας μήνας. Η παρουσία στον ορό IgM αντισωμάτων, είναι αναξιόπιστος δείκτης οξείας λοίμωξης από *C. trachomatis*, σε ενήλικες ή εφήβους, διότι μπορεί να αποτελούν ανοσιακή απάντηση σε λοίμωξη από άλλο είδος, όπως τα *C. pneumoniae*. Επίσης, τα IgM αντισώματα απουσιάζουν σε άτομα που έχουν παλαιότερα μολυνθεί από *C. trachomatis* και είναι φορείς.



Οι ορολογικές μέθοδοι αναζήτησης IgM αντισωμάτων, έχουν διαγνωστική αξία στην χλαμυδιακή πνευμονία των νεογνών και στην διάγνωση ασθενών με αφροδίσιο λεμφοκοκκίωμα, στο οποίο επειδή αποτελεί και συστηματική νόσο, η παραγωγή αντισωμάτων είναι μεγαλύτερη και γρηγορότερη σε σχέση με τις εντοπισμένες λοιμώξεις του γεννητικού συστήματος.

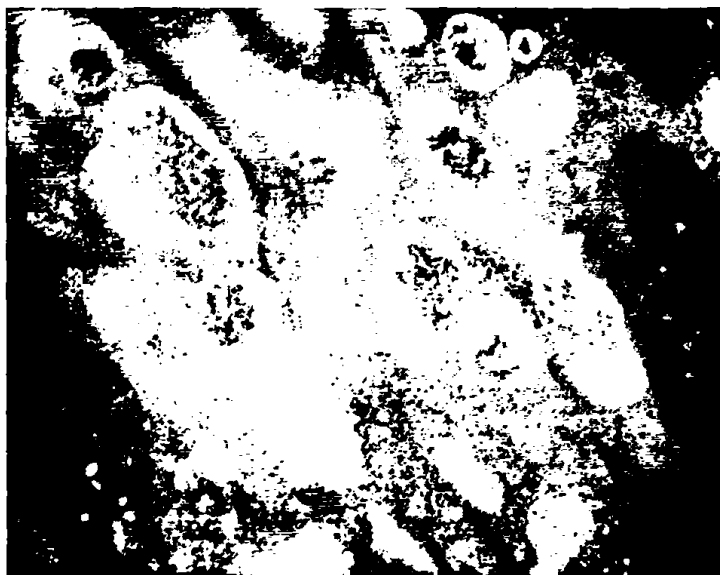
Οι ορολογικές μέθοδοι που έχουν εφαρμοσθεί για την ανίχνευση *C.trachomatis* είναι: η σύνδεση του συμπληρώματος (CF), ο ανοσοφθορισμός (MIF) και ανοσοενζυμικές μέθοδοι (EIA) :

Σύνδεση του συμπληρώματος (CF test):

Εφαρμόζεται κυρίως για τη διάγνωση της ψιττάκωσης και του αφροδίσιου λεμφοκοκκίωματος. Χρησιμοποιούνται αντισώματα που συνδέουν το συμπλήρωμα και το LPS αντιγόνο του γένους *Chlamydiae*. Επειδή το LPS αντιγόνο είναι κοινό για όλα τα είδη των χλαμυδίων, η ειδικότητα της μεθόδου είναι χαμηλή (Treharne et al., 1983).

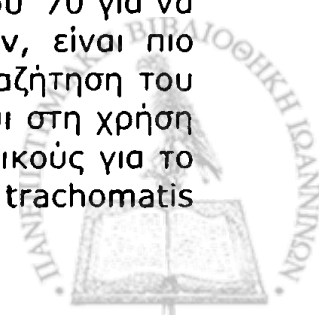
Ανοσοφθορισμός (MIF):

Ο ανοσοφθορισμός είναι μια τεχνική ανίχνευσης κυτταρικών μορίων. Το αντιδραστήριο είναι σηματοδοτημένο με μια φθορίζουσα χρωστική (Εικόνα 13 και 14) και συνδέεται ειδικά με την πρωτεΐνη-στόχο των κυττάρων. Διάφορες τεχνικές ανοσοφθορισμού έχουν αναπτυχθεί. Διαφέρουν στο μόριο-στόχο του δείγματος που μπορεί να είναι αντιγόνο ή αντίσωμα, καθώς και στο ότι η φθορίζουσα χρωστική μπορεί να είναι προσκολλημένη στο αντιδραστήριο που συνδέεται με το στόχο (άμεσος ανοσοφθορισμός) ή σ'ένα αντιδραστήριο που συνδέεται μ'ένα ενδιάμεσο αντιδραστήριο το οποίο προσκολλάται στο στόχο (έμμεσος ανοσοφθορισμός).



Εικόνα 13. Άμεσος ανοσοφθορισμός (DIF): Σηματοδοτημένα αντισώματα. Τα *C.trachomatis* παρουσιάζονται κόκκινα, ενώ τα κύτταρα Hella πράσινα.

Η τεχνική του ανοσοφθορισμού που αναπτύχθηκε στις αρχές του '70 για να βοηθήσει στην επιδημιολογική έρευνα των χλαμυδιακών λοιμώξεων, είναι πιο ευαίσθητη από τις ορολογικές μεθόδους και επιπλέον ειδική στην αναζήτηση του είδους και του ορότυπου των χλαμυδίων. Η ειδικότητα αυτή οφείλεται στη χρήση αντισωμάτων που συνδέονται με επιτόπους του MOMP αντιγόνου, ειδικούς για το είδος και τον ορότυπο των χλαμυδίων. Έτσι, οι 15 ορότυποι των *C. trachomatis*



που περιγράφηκαν αρχικά με την MIF τεχνική (Wang et al., 1970), επιβεβαιώθηκαν με πιο σύγχρονες μεθόδους οροτυποποίησης των στελεχών των *C. trachomatis*, οι οποίες κατέληξαν στην ύπαρξη και ορισμένων άλλων νέων οροτύπων (Lampe et al., 1993).

Ο ανοσοφθορισμός αποτελεί τη μέθοδο εκλογής για τη διάγνωση νεογνικής πνευμονίτιδας από χλαμύδια, ανιχνεύοντας IgM αντισώματα. Επίσης, είναι αξιόπιστη μέθοδος, σε όλες τις ηλικιακές ομάδες και πληθυσμούς, για την ανίχνευση παλαιότερης έκθεσης σε χλαμύδια, με την παρουσία των IgG αντισωμάτων στον ορό.

Τέλος, πρόκειται για μια αρκετά ευαίσθητη μέθοδο ανίχνευσης των IgM αντισωμάτων στον ορό ασθενών με πρόσφατη λοίμωξη του γεννητικού συστήματος από *C. trachomatis*.



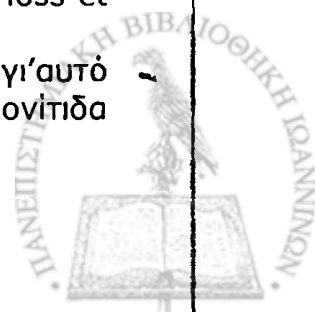
Εικόνα 14. Στοιχειώδη σωμάτια (EB) των *C. Trachomatis* προσκολλημένα σε ανθρώπινο σπερματοζώαριο. (Από το S. Hossenzadeh in *Microbiology Today*)

Ανοσοενζυμικές μέθοδοι (EIA) για την ανίχνευση αντισωμάτων αντι των χλαμυδίων:

Οι ανοσοενζυμικές μέθοδοι (EIA ή ELISA), ανιχνεύουν την παρουσία αντισωμάτων στον ορό έναντι του ειδικού του γένους αντιγόνου - LPS των χλαμυδίων. Όπως και στις άλλες ορολογικές μεθόδους, με την μέτρηση των αντισωμάτων σε ένα μόνο δείγμα ορού δεν μπορεί να γίνει διάκριση μεταξύ παλιάς ή πρόσφατης λοίμωξης. Επιπλέον, οι EIA ανιχνεύουν αντισώματα έναντι όλων των ειδών των χλαμυδίων και όχι ειδικά έναντι των *C. trachomatis*. Έτσι, ένα θετικό αποτέλεσμα με EIA, μπορεί να αντιπροσωπεύει διασταυρούμενη αντίδραση αντισωμάτων έναντι των *C. pneumoniae*.

Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό αν σκεφτούμε ότι στις ΗΠΑ στις ευνοϊκότερες ομάδες πληθυσμού, η συχνότητα των αντισωμάτων έναντι των *C. pneumoniae* είναι 50-70% (Grayston et al., 1992). Επίσης, σε μια μελέτη που έγινε στην Μ. Βρετανία, σε κλινική σεξουαλικά μεταδιδόμενων νοσημάτων, βρέθηκε ότι τα αντισώματα έναντι των *C. pneumoniae* και *C. psittaci* αντιπροσώπευαν πάνω από το 50% των IgG χλαμυδιακών αντισωμάτων (Moss et al., 1993).

Οι EIA είναι λιγότερο ευαίσθητες από τον ανοσοφθορισμό, γι' αυτό χρησιμοποιούνται για την αναζήτηση IgM αντισωμάτων σε νεογνά με πνευμονίτιδα ή χλαμύδια όταν δεν είναι διαθέσιμος ο ανοσοφθορισμός.



Η εταιρεία Boots CellTech (αργότερα ονομάστηκε DAKO) IDEIA (Boots CellTech, Slough, England) ανέπτυξε μια τεχνική που χρησιμοποιούσε μονοκλωνικά αντισώματα ποντικίου έναντι του LPS αντιγόνου, αντικαθιστώντας τα πολυκλωνικά αντισώματα των άλλων ανοσοενζυμικών τεχνικών. Δεν προέκυψαν όμως επαρκή στοιχεία ότι η τεχνική αυτή έχει καλύτερη ευαισθησία ή ειδικότητα από τις παλαιότερες τεχνικές (Kuipers et al., 1995)

7.4. ΟΠΤΙΚΟ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ.

Η παλαιότερη τεχνική για την ανίχνευση οφθαλμικής λοίμωξης από *C. trachomatis* ήταν η εξέταση χρωσμένων επιχρισμάτων του επιεφυκότα για την αναζήτηση των εγκλείστων. Τα *Chlamydiae* μελετήθηκαν για πρώτη φορά με οπτικό μικροσκόπιο το 1907, από τους Halberstaedter και von Prowazek, βάφοντας με χρώση Giemsa τα επιχρίσματα του επιεφυκότα από ουρακοτάγκο στον οποίο είχε ενοφθαλμισθεί υλικό ασθενών με τράχωμα.

Η χρώση Giemsa ήταν η πιο συχνά εφαρμοζόμενη χρωστική έως ότου το μικροσκόπιο αντικαταστήθηκε από άλλες πιο σύγχρονες τεχνικές. Τα χρωσμένα με Giemsa ώριμα εγκλείστα φαίνονται σαν σκουρόχρωμες μωβ μάζες στο κυτταρόπλασμα των επιθηλιακών κυττάρων.

Άλλες χρωστικές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η χρώση ακριδίνης και ιωδίνης.

Η διαγνωστική ευαισθησία και ειδικότητα του οπτικού μικροσκοπίου, εντούτοις, δεν είναι ικανοποιητική (Vnette-Leduc et al., 1997).

Η χρώση Giemsa έχει χρησιμοποιηθεί σε επιχρίσματα από τον επιεφυκότα και θεωρήθηκε γρήγορη και ευαίσθητη τεχνική (>90%) για τη διάγνωση επιεφυκίτιδας από χλαμύδια σε νεογνήνητα (Schachter et al., 1995).

Η τεχνική όμως αυτή δεν προτείνεται για τη διάγνωση επιεφυκίτιδας ή γεννητικών λοιμώξεων σε ενήλικες λόγω της έλλειψης ευαισθησίας (Fedorko et al., 1991). Επιπλέον, η αναγνώριση των χλαμυδιακών εγκλείστων απαιτεί ιδιαίτερη εμπειρία και είναι χρονοβόρα.

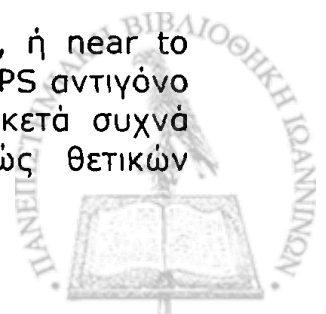
Οι Forster και συν. υποστηρίζουν τέλος ότι, η αναζήτηση χλαμυδίων σε ενδοτραχηλικά επιχρίσματα, χρωματισμένα με τη χρώση Παπανικολάου, δεν προτείνεται, καθώς πρόκειται για μια τεχνική με ιδιαίτερα χαμηλή ευαισθησία και μη ειδική (Forster et al., 1985).

7.5. ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΑΝΤΙΓΟΝΟΥ.

Οι μέθοδοι ανίχνευσης αντιγόνου περιλαμβάνουν:

- «rapid in-office tests»
- ανοσοενζυμικές μεθόδους (enzyme-linked immunosorbent assays: EIA / ELISA) και
- μεθόδους άμεσου ανοσοφθορισμού (direct immunofluorescence assays: DFA).

7.5.1. Τα «rapid in-office tests», γνωστά και ως point of care, ή near to patient tests, βασίζονται επίσης στην αντίδραση αντισωμάτων με το LPS αντιγόνο που βρίσκεται σ'όλα τα είδη των χλαμυδίων και εφαρμόζονται αρκετά συχνά (Suchland et al., 1997). Ενέχουν επίσης τον κίνδυνο ψευδώς θετικών



αποτελεσμάτων λόγω διασταυρούμενων αντιδράσεων με το LPS αντιγόνο άλλων μικροοργανισμών.

Αρκετές εταιρείες διαθέτουν τέτοια αντιδραστήρια: Clearview (Unipath Ltd., Bedford, United Kingdom), TestPack (Abbott) και SureCell (Johnson & Johnson, Rochester, N.Y.)

Μελέτες έδειξαν ότι τα rapid tests είναι σημαντικά λιγότερο ευαίσθητα και ειδικά από τις εργαστηριακές EIA (Thomas et al., 1993), και την PACE 2 DNA probe (Blanding et al., 1993). Η ευαισθησία τους ως προς την καλλιέργεια κυμαίνεται από 52 ως 85% για τα ενδοτραχηλικά δείγματα και από 65 ως 85% για τα ουρηθρικά επιχρίσματα ανδρών (Schubiner et al., 1992), ενώ η ειδικότητά τους είναι πάνω από 95%.

Είναι κατασκευασμένα ώστε να χρησιμοποιούνται από μη ειδικευμένο προσωπικό, δεν απαιτούν ειδικό εξοπλισμό και ολοκληρώνονται περίπου σε 30 λεπτά. Φαίνεται όμως ότι αυτά τα τεστ "θυσιάζουν" την ευαισθησία για την ταχύτητα (Rani et al., 2002).

Καλό είναι να μην χρησιμοποιούνται σε χαμηλής συχνότητας πληθυσμό ή σε ασυμπτωματικά άτομα λόγω της πιθανότητας ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων. Τα αποτελέσματα πρέπει να αντιμετωπίζονται με σκεπτικισμό και τα θετικά να επιβεβαιώνονται με μια εργαστηριακή μέθοδο.

7.5.2. Όλες οι πρόσφατες τεχνικές EIA που διατίθενται στο εμπόριο βασίζονται στην ανίχνευση του LPS αντιγόνου. Το LPS τμήμα των *Chlamydia* συνδέεται με τα ακινητοποιημένα αντι-LPS αντισώματα (MicroTrak, Chlamydiazyme, etc.). Έτσι, οι τεχνικές EIA είναι ειδικές του γένους και ανιχνεύουν όλα τα είδη *Chlamydia*. Στη συνέχεια, συνδέεται ένα δεύτερο αντίσωμα το οποίο είναι συνδεδεμένο με ένα ένζυμο που προκαλεί αλλαγή στο χρώμα, μετρούμενη ως οπτική πυκνότητα, όταν έρχεται σε επαφή με το υπόστρωμα.

Συχνά όμως οι τιμές μέτρησης της οπτικής πυκνότητας δεν επιτρέπουν ένα σαφή διαχωρισμό μεταξύ θετικού και αρνητικού αποτελέσματος. Δηλαδή, υπάρχει μια "γκρι ζώνη" των τιμών της οπτικής πυκνότητας και επομένως η ευαισθησία και η ειδικότητα της μεθόδου εξαρτώνται άμεσα από το επίπεδο του "cut-off" που επιλέγεται μεταξύ θετικού και αρνητικού αποτελέσματος (Ostergaard et al., 1995).

Επίσης, οι EIA τεχνικές είναι δυνατό να δώσουν θετικό αποτέλεσμα παρουσία άλλων μικροοργανισμών, όπως είναι η *Escherichia coli* και το *Bacteroides spp.* Ακόμη, ο *Staphylococcus aureus* μπορεί να συνδεθεί με το Fc τμήμα του με τα αντισώματα αντί των χλαμυδίων, δίνοντας έτσι ψευδώς θετικά αποτελέσματα (Kellogg et al., 1992). Η μειωμένη ειδικότητα των EIA όσο αυξάνει η ηλικία ίσως έχει να κάνει με αλλαγές στη χλωρίδα του κόλπου που δίνουν διασταυρούμενες αντιδράσεις (Ostergaard et al., 1995).

Η ειδικότητα της μεθόδου μπορεί να αυξηθεί εξετάζοντας τα θετικά και τα αμφίβολα δείγματα που είναι στην «γκρι ζώνη» με μια άλλη μέθοδο (επιβεβαιωτικό τεστ), όπως με την τεχνική DFA χρησιμοποιώντας μονοκλωνικά αντισώματα έναντι του MOMP αντιγόνου ή με τη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων ειδικών για το LPS αντιγόνο των χλαμυδίων (Moncada et al., 1990). Με τα επιβεβαιωτικά τεστ η ειδικότητα των EIA ξεπερνά το 99% και γι'αυτό πρέπει να εφαρμόζονται σε προγράμματα ελέγχου πληθυσμού με χαμηλή συχνότητα. Πρόβλημα παραμένει ο έλεγχος των αρνητικών αποτελεσμάτων λόγω της ύπαρξης ψευδώς αρνητικών που οδηγεί σε μειωμένη ευαισθησία των EIA.

Η ευαισθησία των EIA εξαρτάται από την ευαισθησία της μεθόδου που χρησιμοποιείται για την αξιολόγησή της. Έτσι, όταν συγκρίνεται με μεθόδους χαμηλής ευαισθησίας, η ευαισθησία της EIA είναι ψευδώς υψηλή. Ως εκ τούτου,

από μελέτες προέκυψε ότι η ευαισθησία κυμαίνεται από 62 έως 97%, σε δείγματα ανδρών και γυναικών, στις πιο ευρέως χρησιμοποιούμενων EIA: Chlamydiazyme (Abbott Diagnostics, Maidenhead, UK) και IDEIA (Dako Diagnostics, Ely, UK), ενώ η MicroTrak EIA (Syva) φάνηκε ότι έχει τη μεγαλύτερη ευαισθησία από όλες. Συμπερασματικά, η ευαισθησία της EIA δεν ξεπερνά την ευαισθησία της καλλιέργειας όταν αυτή πραγματοποιείται κάτω από ιδανικές συνθήκες (Moller et al., 1994).

Τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον στράφηκε γύρω από τη χρήση των EIA σε δείγματα ούρων. Τα ούρα φυγοκεντρώνονται και το ίζημα αραιώνεται με κατάλληλο διάλυμα πριν εξετασθούν. Από μελέτες προέκυψε ότι οι EIA δίνουν καλύτερα αποτελέσματα σε δείγματα ούρων συμπτωματικών ανδρών και είναι λιγότερο ευαίσθητες από τις μοριακές μεθόδους στα αντίστοιχα δείγματα (Domeika et al., 1994).

Οι διασταυρούμενες αντιδράσεις κάνουν τέλος τις EIA τεχνικές ακατάλληλες για δείγματα που έχουν ληφθεί από ανατομικές περιοχές εκτός της ουρήθρας και του ενδοτραχήλου, όπως για παράδειγμα από το φάρυγγα ή το ορθό (Hammerschlag et al., 1988). Πάντως το κόστος των EIA είναι χαμηλότερο των μοριακών τεχνικών και γι' αυτό χρησιμοποιούνται κυρίως όπου το υψηλό κόστος είναι απαγορευτικό.

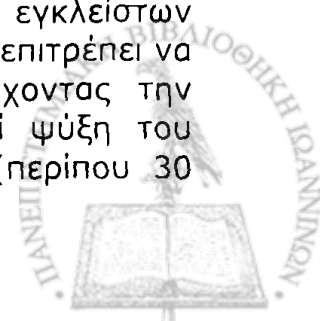
7.5.3. Στον άμεσο ανοσοφθορισμό (DFA) φθορίζοντα μονοκλωνικά αντισώματα συνδέονται είτε με τα LPS αντιγόνα, είτε με τα MOMP αντιγόνα της επιφάνειας των χλαμυδίων και εν συνεχεία η φθορίζουσα χρωστική μπορεί να γίνει ορατή με το μικροσκόπιο φθορισμού.

Το πρώτο διαγνωστικό αντιδραστήριο άμεσου ανοσοφθορισμού ήταν το Syva MicroTrak (Syva, Palo Alto, Calif.). Χρησιμοποιούσε μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του MOMP αντιγόνου των *C. trachomatis* και μ'αυτό ξεκίνησε η προσπάθεια απομάκρυνσης από την καλλιέργεια και αναζήτησης τεχνικών που δεν βασίζονται στη βιωσιμότητα του δείγματος (Ward, 2002).

Για την τεχνική αυτή, το δείγμα επιστρώνεται σε αντικειμενοφόρο πλάκα, ξηραίνεται και μονιμοποιείται. Η αντικειμενοφόρος πλάκα μπορεί να μεταφερθεί στο εργαστήριο μέχρι και 7 ημέρες, χωρίς να απαιτείται ψύξη, όπου και βάφεται. Η χρώση γίνεται με φθορίζοντα μονοκλωνικά αντισώματα, τα οποία προσκολλώνται στα στοιχειώδη σωμάτια των *C. trachomatis* και γίνονται ορατά με μικροσκόπιο ανοσοφθορισμού.

Η τεχνική MicroTrak παρουσιάζει πολύ καλή ευαισθησία και ειδικότητα (Uyeda et al., 1984). Με τη χρήση των μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι του MOMP αντιγόνου των *C. trachomatis*, η ευαισθησία του άμεσου ανοσοφθορισμού κυμαίνεται από 80 έως 90% και η ειδικότητα από 98 έως 99% συγκριτικά με την καλλιέργεια όταν και οι δυο πραγματοποιούνται κάτω από τις ιδανικότερες συνθήκες (Chernesky et al., 1986). Η ευαισθησία του ανοσοφθορισμού σε ουρηθρικά δείγματα ανδρών είναι μικρότερη των ενδοτραχηλικών (περίπου 70%) για άγνωστους λόγους, ακόμα και όταν υπάρχουν συμπτώματα ουρηθρίτιδας, σύμφωνα με την ανωτέρω μελέτη των Chernesky και συν., ενώ είναι ακόμη μικρότερη (<70%) σε δείγματα ούρων ανδρών (Stary et al., 1992).

Όπως και η καλλιέργεια, έτσι και ο ανοσοφθορισμός, έχουν πολύ υψηλή ειδικότητα λόγω της χαρακτηριστικής μορφολογίας και χρώσης των εγκλειστών και των στοιχειωδών σωματιδίων. Επιπλέον, είναι η μόνη τεχνική που επιτρέπει να ελέγχεται παράλληλα και η καταλληλότητα του δείγματος, ελέγχοντας την παρουσία κυλινδρικών επιθηλιακών κυττάρων. Τέλος, δεν απαιτεί ψύξη του δείγματος κατά τη μεταφορά και είναι σχετικά γρήγορη τεχνική (περίπου 30 λεπτά).



Αντιθέτως, επειδή το μέγεθος των εξωκυττάρων στοιχειωδών σωματιδίων είναι κοντά στη διακριτική ικανότητα του μικροσκοπίου, η μικροσκοπική αξιολόγηση του δείγματος είναι επίπονη, χρονοβόρα και απαιτεί καλά εκπαιδευμένο και έμπειρο προσωπικό που να μπορεί να διακρίνει τα *C. trachomatis* από άλλα φθορίζοντα σωματίδια. Για τους παραπάνω λόγους, ο ανοσοφθορισμός δεν προτείνεται ως μέθοδος ρουτίνας για την αρχική διάγνωση χλαμυδιακών λοιμώξεων, ιδιαίτερα σε μεγάλο αριθμό δειγμάτων.

Η υψηλή ειδικότητά του καθιστά τον ανοσοφθορισμό πολύ καλή μέθοδος για την επιβεβαίωση των θετικών αποτελεσμάτων άλλων μη καλλιεργητικών μεθόδων, αλλά και για την αξιολόγηση των αντιφατικών αποτελεσμάτων μεταξύ των μοριακών μεθόδων. Και στις δυο αυτές περιπτώσεις, ο αριθμός των σωματιδίων που πρέπει να γίνουν ορατά προκειμένου να δοθεί ένα θετικό αποτέλεσμα (δηλ. το επίπεδο του cut-off (Quinn et al., 1985, Thejls et al., 1994) είναι 2 στοιχειώδη σωματίδια.

Δεν πρέπει τέλος να ξεχνάμε ότι, η διαγνωστική ικανότητα του άμεσου ανοσοφθορισμού εξαρτάται από τον αριθμό των ορατών σωματιδίων που αποτελούν το cut-off, διότι όσο μικραίνει ο αριθμός αυτός τόσο αυξάνει η ευαισθησία, ενώ παράλληλα μικραίνει η ειδικότητα και η θετική προγνωστική αξία του ανοσοφθορισμού.

Ο ανοσοφθορισμός έχει χρησιμοποιηθεί για την αναζήτηση των *C. trachomatis* σε δείγματα από τον επιπεφυκότα (Bell et al., 1984, Rapoza et al., 1986), ουρηθρικά, ορθικά επιχρίσματα (Rompalo et al., 1987), σε δείγματα του αναπνευστικού από νεογνά (Paisley et al., 1986), κυρίως όμως σε ενδοτραχηλικά επιχρίσματα (Tam et al., 1984, Woods et al., 1994).

Σύμφωνα με το CDC (2002), ο ανοσοφθορισμός και η καλλιέργεια είναι οι μέθοδοι που προτείνονται για την αναζήτηση *C. trachomatis*, σε ορθικά και φαρυγγικά δείγματα. Και στις δυο περιπτώσεις προτείνεται η χρήση φθορίζοντων μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι του MOMP αντιγόνου.

Όπως και οι ΕΙΑ, έτσι και οι τεχνικές DFA, εφαρμόζονται κυρίως στις περιπτώσεις όπου το υψηλό κόστος είναι απαγορευτικό.

Το βασικό μειονέκτημα όλων των τεχνικών ανίχνευσης *C. trachomatis*, εκτός από την κυτταροκαλλιέργεια και τις μοριακές μεθόδους, είναι η αδυναμία τους να ανιχνεύσουν μικρά φορτία *C. trachomatis* (CDC, 2002).

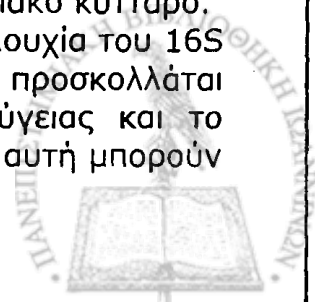
7.6. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ (DNA / RNA)

Διακρίνονται στις probe τεχνικές και στις τεχνικές ενίσχυσης του γενετικού υλικού (Nucleic Acid Amplification Techniques/ NAAT).

7.6.1. Στις **probe τεχνικές** ένα συνθετικό τμήμα/μόριο, μονής έλικας, ολιγονουκλεοτιδίων (το probe) υβριδοποιεί ένα τμήμα του DNA ή του RNA των *C. trachomatis*.

Η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη probe τεχνική, με έγκριση από το FDA, είναι η Gen-Probe PACE 2 (Gen-Probe, San Diego, Calif.) Το probe είναι ένα συνθετικό μόριο μονής έλικας DNA, συμπληρωματικό σε μια περιοχή του χλαμυδιακού rRNA. Το δείγμα θερμαίνεται, τα κύτταρα λύνονται και ελευθερώνεται το rRNA. Υπάρχουν περίπου 2.000 αντίγραφα rRNA σε κάθε χλαμυδιακό κύτταρο.

Το probe αντιδρά και υβριδοποιεί μια ειδική του είδους αλληλουχία του 16S rRNA των *C. trachomatis*. Το υβρίδιο DNA-rRNA που σχηματίζεται προσκολλάται σε μαγνητικά σφαιρίδια, ακολουθεί μια αντίδραση χημειοφωταύγειας και το αποτέλεσμα μετράται ποσοτικά με το λουμινόμετρο. Με την τεχνική αυτή μπορούν να ανιχνευθούν περίπου 10^3 στοιχειώδη σωματίδια ανά δείγμα.



Παρόμοια τεχνική, με έγκριση από το FDA, είναι η τεχνική Digene Hybrid Capture II. Στην τεχνική αυτή, το probe RNA είναι ειδικό για μια αλληλουχία DNA των *C. trachomatis*, που περιλαμβάνει και γενομικό DNA και DNA από το κρυπτικό πλασμίδιο (Modarress et al., 1999).

Ένα από τα πλεονεκτήματα των probe τεχνικών είναι η ικανότητα αποθήκευσης και μεταφοράς των δειγμάτων έως και 7 ημέρες, χωρίς ψύξη, μέχρι την εξέτάσή τους από το εργαστήριο.

Η διαγνωστική ικανότητα των μη-ενισχυτικών probe τεχνικών δεν διαφέρει ουσιαστικά από τη διαγνωστική ικανότητα των καλύτερων τεχνικών ΕΙΑ (Moller et al., 1994). Γι'αυτό, σύμφωνα με τις συστάσεις του CDC (2002), σε χαμηλής συχνότητας πληθυσμούς, θα πρέπει να επιβεβαιώνονται τα θετικά αποτελέσματα, όπως και τα αποτελέσματα κοντά στη «γκρι ζώνη», αυξάνοντας αναπόφευκτα το κόστος της μεθόδου.

7.6.2. Τεχνικές ενίσχυσης του νουκλεϊνικού οξέος (Nucleic Acid Amplification Tests-NAATs)

Το κοινό χαρακτηριστικό των NAATs είναι ότι ενισχύουν εκθετικά αλληλουχίες γενετικού υλικού, οι οποίες είναι ειδικές για τον οργανισμό που ανιχνεύεται.

Συγκεκριμένα, ειδικά probes υβριδοποιούν το DNA ή το RNA των *C. trachomatis* και το DNA/RNA που οριοθετείται από τους primers-εκκινητές (αλληλουχία-στόχος DNA) αντιγράφεται εκθετικά. Λόγω της φάσης ενίσχυσης, η διαγνωστική ευαισθησία των τεχνικών ενίσχυσης DNA/RNA είναι θεωρητικά πολύ υψηλότερη από τις τεχνικές ανίχνευσης αντιγόνου ή τις probe τεχνικές.

Επειδή το DNA είναι σταθερό όταν απουσιάζουν τα ένζυμα που διασπούν το DNA, οι μικροοργανισμοί των *C. trachomatis* που έχουν χάσει την δραστηριότητά τους κατά τη μεταφορά και αποθήκευσή τους μπορούν να ανιχνευθούν με τις ενισχυτικές τεχνικές, οι οποίες γι'αυτό το λόγο έχουν μεγαλύτερη ευαισθησία από την καλλιέργεια.

Επειδή τα τμήματα στα οποία προσκολλούνται οι primers είναι μοναδικά-ειδικά για τα *C. trachomatis*, οι μοριακές τεχνικές έχουν υψηλή ειδικότητα, καθώς και υψηλή ευαισθησία, λόγω της ικανότητάς τους να ανιχνεύουν ακόμα και μία αλληλουχία-στόχο.

Παράλληλα, υπάρχει κίνδυνος επιμόλυνσης των δειγμάτων είτε από το ενδογενές-φυσικό DNA, είτε από την ενισχυμένη αλληλουχία-στόχο DNA.

Οι NAATs, όπως και όλες οι άλλες μη καλλιεργητικές τεχνικές, δεν απαιτούν ζωντανούς μικροοργανισμούς.

Αλληλουχίες-στόχοι των NAATs :

Πολλές περιοχές του γενετικού υλικού έχουν επιλεγεί ως στόχοι-DNA με σκοπό την ενίσχυση του DNA των *C. trachomatis*: ως κύρια αλληλουχία στόχος έχει επιλεγεί το πλασμίδιο των *C. trachomatis* (Claas et al., 1990, Ostergaard et al., 1990, Naher et al., 1991, Ratti et al., 1991, Mahony et al., 1992, Ossewaarde et al., 1992), το MOMP γονίδιο (Bobo et al., 1990, Holland et al., 1990) και το γονίδιο που κωδικοποιεί το rRNA (Claas et al., 1990). Επιπλέον, τα μόρια rRNA έχουν χρησιμοποιηθεί ως στόχοι στην TMA μέθοδο (Mouton et al., 1997, Mahony et al., 1998), μια τεχνική ενίσχυσης του RNA.



α) Το πλασμίδιο :

Το πλασμίδιο βρίσκεται αποκλειστικά στα *C. trachomatis*, είναι δηλαδή χαρακτηριστικό του είδους και κάθε μικροοργανισμός *C. trachomatis* περιέχει περίπου 10 αντίγραφα (Palmer et al., 1986, Sriprakash et al., 1987). Χρησιμοποιώντας το πλασμίδιο ως στόχο-DNA, θεωρητικά μειώνουμε το όριο ανίχνευσης κατά 10 φορές συγκριτικά με τη χρήση μονών γονιδίων στο γενετικό υλικό, όπως για παράδειγμα το MOMP γονίδιο. Αυτό φάνηκε και σε «in vitro» μελέτες, στις οποίες χρησιμοποιώντας το πλασμίδιο ως στόχο-DNA συγκριτικά με το MOMP γονίδιο, μειώθηκε το όριο ανίχνευσης από 4 έως 100 φορές (Ossewaarde et al., 1992, Roosendaal et al., 1993, Martin et al., 1995). Επίσης, αυξημένη ευαισθησία με τη χρήση του πλασμιδίου ως αλληλουχία-στόχο DNA συγκριτικά με το MOMP γονίδιο, έχει επίσης φανεί και σε κλινικά δείγματα (Mahony et al., 1993).

Εντούτοις, μερικές μελέτες καταλήγουν στην υπόθεση ή αποδεικνύουν ότι, στελέχη των *C. trachomatis* που δεν περιέχουν πλασμίδιο μπορεί να υπάρχουν στα κλινικά δείγματα (An Q et al., 1992, Schachter et al., 1996) και μολονότι φαίνεται ότι το πλασμίδιο συμμετέχει στην αντιγραφή του DNA (Hatt et al., 1988, Fahr et al., 1992), είναι πιθανό να απομονωθούν με την καλλιέργεια στελέχη *C. trachomatis* που δεν διαθέτουν πλασμίδιο (Peterson et al., 1990). Δηλαδή, χλαμυδιακές λοιμώξεις που οφείλονται σε στελέχη *C. trachomatis* χωρίς πλασμίδιο, δεν ανιχνεύονται όταν χρησιμοποιείται ως στόχος-DNA το πλασμίδιο.

Τέτοιες μελέτες απομόνωσαν με κυτταροκαλλιέργεια τον ορότυπο L2 των *C. trachomatis*, από ασθενή με πρωκτοκολίτιδα (Peterson et al., 1990), τον ορότυπο B από άνδρα με ουρηθρίτιδα (Farencena et al., 1997) και τον ορότυπο E επίσης από άνδρα με ουρηθρίτιδα (Stothard et al., 1998).

Τα στελέχη των *C. trachomatis* που δεν διαθέτουν πλασμίδιο είναι σπάνια (Ward, 2002), ενώ δεν έχουν απομονωθεί έως σήμερα τέτοια στελέχη από τους οφθαλμούς.

Η συστηματική χρήση στο μέλλον μοριακών μεθόδων που έχουν ως αλληλουχία-στόχο το πλασμίδιο, θα μπορούσε να οδηγήσει σε μείωση της συχνότητας των λοιμώξεων που οφείλονται σε στελέχη *C. trachomatis* που διαθέτουν το πλασμίδιο και σε αύξηση της συχνότητας των χλαμυδιακών λοιμώξεων από στελέχη χωρίς πλασμίδιο. Ως εκ τούτου, σε μελλοντικά ερευνητικά προγράμματα, θα μπορούσε να εκτιμηθεί η συχνότητα των στελεχών *C. trachomatis* που δεν διαθέτουν πλασμίδιο.

β) Το γονίδιο *omp1*, το οποίο κωδικοποιεί την πρωτεΐνη MOMP:

Η οροτυποποίηση των *C. trachomatis* στηρίζεται σε ορολογικές αντιδράσεις μεταξύ τεχνικά παραγόμενων αντισωμάτων έναντι του MOMP αντιγόνου και σε καλλιέργειες κλινικών δειγμάτων για *C. trachomatis*. Επειδή η καλλιέργεια είναι απαραίτητη για την οροτυποποίηση, η αναλογία των διαφόρων οροτύπων εξαρτάται άμεσα από την βιωσιμότητα και ευαισθησία της καλλιέργειας.

Η εφαρμογή της PCR (MOMP-PCR) που χρησιμοποιεί εκκινητές (primers) για την οριοθέτηση διαφόρων τμημάτων του MOMP γονιδίου, είναι δυνατόν να οδηγήσει στον διαχωρισμό των διαφόρων οροτύπων των *C. trachomatis* σε κλινικά δείγματα χωρίς αυτά να χρειάζεται να καλλιεργηθούν. Αυτό επιτυγχάνεται είτε αναλύοντας το ενισχυμένο τμήμα MOMP DNA (genotyping), είτε με τη μέθοδο RFLP (restriction fragment length polymorphism) (Frost et al., 1991, Black et al., 1992), ή με direct sequencing (Poole et al., 1992, Quinn et al., 1996). Η τυποποίηση του γένους (genotyping) όταν βασίζεται στο MOMP γονίδιο, συσχετίζεται καλά με τους αντίστοιχους ορότυπους, μολονότι περιορισμοί στην τυποποίηση του γένους μπορεί να παρατηρηθούν όταν υπάρχει ταυτόχρονη

λοίμωξη με περισσότερους από ένα γονότυπους. Επειδή τυποποίηση του γένους με MOMP-PCR μπορεί να γίνει και σε ακατέργαστα δείγματα (Pedersen et al., 2000), η μέθοδος αποτελεί ένα ισχυρό μέσο σε επιδημιολογικές έρευνες και μελέτες που επιχειρούν να συσχετίσουν την παθογένεση της λοίμωξης με ορισμένους γενότυπους. Τέτοιες μελέτες έχουν δείξει ότι συμπτώματα δυσουρίας και ουρηθρικής διαταραχής συσχετιζόνταν πιο συχνά με τους γενότυπους H και J, ενώ ο κατώτερος κοιλιακός πόνος συσχετιζόταν πιο συχνά με τους γενότυπους F και G, παρά με τους γενότυπους των συμπλεγμάτων B ή C (van Duynhoven et al., 1998).

Η PCR που χρησιμοποιεί ως αλληλουχία-στόχο το γονίδιο MOMP, έχει επίσης ευρέως χρησιμοποιηθεί, ως επιβεβαιωτική μέθοδο, σε δείγματα θετικά με μοριακές μεθόδους και αρνητικά με κάποια άλλη συγκριτική μέθοδο, με σκοπό να αντιμετωπισθούν τέτοια αντιφατικά αποτελέσματα. Σε αυτές τις περιπτώσεις το αποτέλεσμα της MOMP PCR ήταν αποφασιστικό ή όχι της λοίμωξης.

γ) Το 16S-rRNA γονίδιο:

Χρησιμοποιώντας το 16S-rRNA γονίδιο, το οποίο βρίσκεται σε όλα τα βακτήρια και είναι το πιο γνωστό, καλά διατηρημένο, γονίδιο, όλα τα είδη των χλαμυδίων μπορούν να ανιχνευθούν χρησιμοποιώντας μόνο έναν εκκινητή. Αυτό γίνεται κατασκευάζοντας τους εκκινητές ώστε να προσκολλώνται στα ειδικά του γένους τμήματα του γονιδίου 16S-rRNA. Τα ειδικά του γένους τμήματα οριοθετούν συγκεκριμένες περιοχές ειδικές για κάθε είδος. Δηλαδή, τα ενισχυμένα προϊόντα περιλαμβάνουν τμήματα γενετικού υλικού οριοθετημένα από δυο, ειδικές του γένους, περιοχές. Το είδος μπορεί στη συνέχεια να προσδιορισθεί με ανάλυση του ενισχυμένου προϊόντος, είτε με υβριδισμό με ειδικά probes, με RFLP, ή με DNA sequencing. Λόγω της υψηλής ομολογίας του 16S-rRNA γονιδίου με άλλους μικροοργανισμούς, απαιτούνται ιδανικές συνθήκες αντίδρασης με σκοπό να αποφευχθεί η προσκόλληση των εκκινητών στα 16S-rRNA γονίδια άλλων μικροοργανισμών, τα οποία είναι παρόντα σε όλα τα μη-στείρα κλινικά δείγματα.

δ) Το ριβοσωμικό RNA:

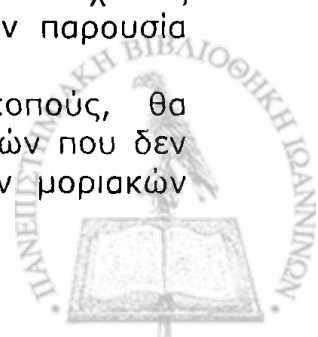
Η μέθοδος AMP-ct (TMA:transcription-mediated amplification) χρησιμοποιεί το rRNA ως μόριο-στόχο. Το rRNA βρίσκεται σε εκατοντάδες αντίγραφα σε κάθε μικροοργανισμό του γένους *Chlamydia*, γεγονός που θα μπορούσε να οδηγήσει σε ακόμη μεγαλύτερη ευαισθησία από τις άλλες μοριακές μεθόδους που έχουν ως στόχο το πλασμίδιο, το οποίο βρίσκεται μόνο σε 10 αντίγραφα. Εντούτοις, το rRNA ίσως είναι πιο ευπαθές στη διάσπαση από το DNA επηρεάζοντας την ευαισθησία της μεθόδου. Στην πράξη όμως η ευαισθησία της μεθόδου AMP-ct φαίνεται να μην διαφέρει σημαντικά από τις άλλες μοριακές τεχνικές ενίσχυσης του DNA.

Η επιλογή του στόχου

Ποια αλληλουχία-στόχος θα επιλεγεί τελικά για να ενισχυθεί εξαρτάται από το σκοπό της ανίχνευσης.

Ο Mahoney και συν. (1993), υποστηρίζουν ότι οι PCR που έχουν ως στόχο το πλασμίδιο είναι 10 έως 10,000 φορές πιο ευαίσθητες από τις PCR που έχει ως στόχο γονίδια του χρωμοσώματος. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στην παρουσία πολλαπλών αντιγράφων του πλασμιδίου σε κάθε χλαμυδιακό κύτταρο.

Έτσι, εάν απαιτείται υψηλή ευαισθησία, για διαγνωστικούς σκοπούς, θα πρέπει να επιλεγεί το πλασμίδιο ή το rRNA, αν και η ύπαρξη στελεχών που δεν διαθέτουν πλασμίδιο θα μπορούσε να μειώσει την ευαισθησία των μοριακών τεχνικών που βασίζονται στην ενίσχυση του πλασμιδίου.



Εάν ο σκοπός είναι η τυποποίηση του γένους (genotyping), θα πρέπει να επιλέγεται το MOMP γονίδιο, τεχνική με μικρότερη αναλυτική και κλινική ευαισθησία από την προηγούμενη.

Διαγνωστική αξία των τεχνικών ενίσχυσης του νουκλεϊνικού οξέος (NAAT).

Όταν εκτιμάται η διαγνωστική αξία οποιασδήποτε μεθόδου που ανιχνεύει *C. trachomatis*, είναι σημαντικό να τονισθεί ότι δεν υπάρχει μέθοδος αναφοράς ("gold standard"). Ως εκ τούτου, η εγκυρότητα μιας νέας διαγνωστικής μεθόδου θα αποτελεί μια «αντανάκλαση» εκείνων των μεθόδων που έχουν επιλεγεί για να συγκριθεί.

Η διαγνωστική ικανότητα των NAAT ποικίλλει ανάλογα με το είδος του δείγματος που εξετάζεται για *C. trachomatis* (Black, 1997, Ostergaard, 1999). Ενώ η ειδικότητα των μοριακών μεθόδων είναι πολύ υψηλή, φτάνοντας στο 96-100% σ' όλα τα είδη των δειγμάτων, η ευαισθησία τους διαφέρει σημαντικά ανάλογα με το είδος του δείγματος. Συγκεκριμένα, η ευαισθησία των μοριακών μεθόδων σε τραχηλικά επιχρίσματα κυμαίνεται από 64-100%, σε κολπικά από 90-97%, σε ουρηθρικά επιχρίσματα ανδρών από 92-96%, σε ούρα γυναικών από 49-100% και σε ούρα ανδρών από 64-98%.

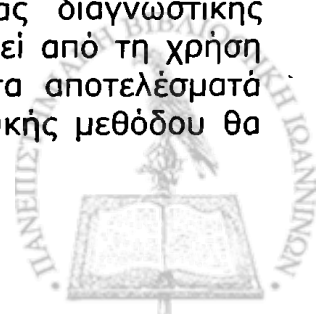
Επιπλέον, ενώ η αρνητική προγνωστική αξία (NPV) των μοριακών μεθόδων είναι πολύ υψηλή, φτάνοντας από 97-100% σ' όλα τα είδη των δειγμάτων, η θετική προγνωστική τους αξία (PPV) είναι αρκετά χαμηλότερη, ιδιαίτερα σε περιοχές με μικρή συχνότητα χλαμυδιακών λοιμώξεων (Πίνακας: 4). Αυτό πρακτικά σημαίνει ότι μπορούν να δώσουν μερικά ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Έτσι, η θετική προγνωστική αξία σε τραχηλικά επιχρίσματα είναι 73-100%, σε κολπικά 93-100%, σε ουρηθρικά επιχρίσματα ανδρών 82-99%, σε ούρα γυναικών 52-100% και σε ούρα ανδρών 80-100%.

Και οι νεώτερες μελέτες υποστηρίζουν ότι οι μοριακές τεχνικές έχουν το πλεονέκτημα ότι είναι σημαντικά πιο ευαίσθητες από όλες τις προγενέστερες μεθόδους (Chernesky, 2002), ενώ ταυτόχρονα έχουν και πολύ υψηλή ειδικότητα (Johnson et al., 2000).

Ο Kuiper και συν. (1995), για να συγκρίνουν τις ευαισθησίες διαφόρων τεχνικών ανίχνευσης των *C. trachomatis*, έκαναν διαδοχικές αραιώσεις των στοιχειωδών σωματιδίων σε δείγματα ούρων και διαπίστωσαν ότι το χαμηλότερο όριο ανίχνευσης ήταν 2 στοιχειώδη σωματίδια για την omp1 in-house PCR, 2×10^3 και για τον άμεσο ανοσοφθορισμό (MicroTrak) και για τις ανοσοενζυμικές τεχνικές (Chlamydia EIA, Syva, San Jose, Calif.) και 2×10^4 για τις PACE 2 hybridization probe και IDEIA.

Ο Shattock και συν. (1998), κάνοντας παρόμοιες διαδοχικές αραιώσεις και βασισμένοι στο ότι υπάρχουν 10 πλασμίδια σε κάθε στοιχειώδες σωματίδιο, διαπίστωσαν ότι το όριο ανίχνευσης των μοριακών μεθόδων: Cobas AmpliCor, AmpliCor plate kit και της LCx, ήταν 1 έως 2, 2 έως 4 και 2 στοιχειώδη σωματίδια, αντιστοίχως.

Ο Martin και συν. (2004), πρόσφατα χρησιμοποίησαν τα δεδομένα 1.412 γυναικών που συμμετείχαν σε μια μελέτη αξιολόγησης μιας διαγνωστικής μεθόδου, με σκοπό να ελέγξουν πώς αυτή μπορεί να επηρεασθεί από τη χρήση διαφορετικού συνδυασμού μεθόδου αναφοράς. Βασισμένοι στα αποτελέσματά τους, προτείνουν ότι στο μέλλον, η αξιολόγηση μιας διαγνωστικής μεθόδου θα πρέπει να γίνεται με μια μέθοδο αναφοράς που να περιλαμβάνει:



1. Δύο μοριακές μεθόδους, διαφορετικές όμως από την μέθοδο που αξιολογείται,
2. 3 διαφορετικά είδη δειγμάτων από κάθε συμμετέχοντα: συμπεριλαμβανομένου ούρα και τραχηλικό επίχρισμα από τις γυναίκες, ενώ από τους άνδρες ούρα και ουρηθρικό επίχρισμα, και
3. ασθενείς μολυσμένοι με *C.trachomatis* να θεωρούνται εκείνοι, στον οποίων ανιχνεύθηκαν *C.trachomatis*, σε 2 από τα 3 είδη δειγμάτων.

Οι πιο διαδεδομένες μοριακές τεχνικές που χρησιμοποιούνται στην ανίχνευση του γενετικού υλικού των *C. trachomatis* είναι οι εξής:

α) Polymerase Chain Reaction (PCR):

* Η PCR χρησιμοποιεί δύο συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια εκκινητών (primers) των οποίων η αλληλουχία είναι συμπληρωματική στην αλληλουχία-στόχο του DNA του μικροοργανισμού. Ανάλογα με την σύνθεση των εκκινητών, η PCR μπορεί να είναι ειδική για το είδος, το γένος, ή το μικροβιακό στέλεχος.

Η PCR που αναπτύχθηκε από τη Roche Diagnostics (Amplacor PCR) ήταν η πρώτη PCR που εγκρίθηκε από το FDA στις ΗΠΑ (Loeffelholz et al., 1992). Η τεχνική αυτή επιτρέπει την ενίσχυση του χλαμυδιακού DNA-στόχου.

Η PCR χρησιμοποιεί το ένζυμο DNA polymerase. Παραλλαγές του ενζύμου βρίσκονται στους πυρήνες όλων των πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων. In vivo, ο ρόλος της DNA polymerase είναι ο διπλασιασμός του DNA κατά τη διάρκεια της προετοιμασίας του κυττάρου για τη διαίρεσή του.

β) Ligase Chain Reaction (LCR):

Η LCR αναπτύχθηκε από την Abbott Laboratories (LCx *Chlamydia trachomatis* Assay) και εγκρίθηκε από το FDA στις ΗΠΑ στα τέλη του 1995. Το 2002, λόγω προβλημάτων επαναληψιμότητας, αποσύρθηκε και σταμάτησε να διατίθεται.

Η τεχνική LCx, χρησιμοποιούσε την LCR τεχνολογία ενίσχυσης του νουκλεϊνικού οξέος για την άμεση ποιοτική ανίχνευση της παρουσίας του πλασμιδιακού DNA των *C. trachomatis* και εφαρμόσθηκε ευρέως σε ουροποιογεννητικά και οφθαλμικά κλινικά δείγματα.

Τα 4 probes ολιγονουκλεοτιδίων αναγνώριζαν και υβριδοποιούσαν μια ειδική αλληλουχία-στόχο μέσα στο πλασμιδιακό DNA των *C. trachomatis*. Τα ολιγονουκλεοτίδια ήταν σχεδιασμένα να είναι συμπληρωματικά προς την αλληλουχία-στόχο ώστε, όταν υπάρχει αυτός ο στόχος, τα probes να συνδεθούν ακριβώς το ένα με το άλλο. Ακολούθως, αυτά μπορούν ενζυματικά να ενωθούν για να σχηματίσουν το ενισχυμένο προϊόν, το οποίο μεταγενέστερα χρησιμοποιείται ως μια επιπρόσθετη αλληλουχία-στόχο στη διάρκεια των περαιτέρω κύκλων της ενίσχυσης. Η εκθετική αναπαραγωγή των επιπρόσθετων στόχων από κάθε κύκλο, ήταν η αιτία που ταξινομούσε την LCx ως μια ενισχυτική τεχνική και ήταν η βάση της ευαισθησίας της μεθόδου. Το προϊόν της αντίδρασης LCR ανιχνευόταν στον αναλυτή Abbott LCx.

γ) Strand Displacement assay (SDA):

Η μοριακή τεχνική SDA αναπτύχθηκε ως μια εναλλακτική μέθοδος στην PCR και LCR για την ενίσχυση αλληλουχιών-στόχων DNA. Έτσι, η SDA είναι μια παραλλαγή της PCR.

Χρησιμοποιεί μια περιοριστική ενδονουκλεάση για να δημιουργήσει μια εγκοπή στη μια έλικα του δίκλωνου DNA και μια DNA πολυμεράση I, για να συμπληρωθεί ο στόχος και να επιμηκυνθεί (Walker et al., 1992).



Λόγω του ότι η μέθοδος δεν απαιτεί επαναλαμβανόμενη μετουσίωση, η αντίδραση μπορεί να προχωρήσει ισοθερμικά.

Η τεχνική SDA διατίθεται στο εμπόριο από την εταιρεία Becton Dickinson (B.D. Franklin Lakes, N.J.) με την ονομασία BDProbeTecET. Έχει ως στόχο το πλασμιδιακό DNA των *C. trachomatis* και έχει ενσωματωμένο ένα φθορίζων σύστημα ανίχνευσης πραγματικού χρόνου, το οποίο επιτρέπει να γίνεται η ενίσχυση και η ανίχνευση στο ίδιο σφραγισμένο φιαλίδιο (Little et al., 1999).

Οι τρεις ανωτέρω μοριακές τεχνικές ενισχύουν αλληλουχία του DNA των *C. trachomatis* που βρίσκεται στο κρυπτικό πλασμίδιο, το οποίο υπάρχει σε περισσότερα από το 99% των στελεχών των *C. trachomatis*.

δ) Transcription-Mediated Amplification (TMA):

Δυο τεχνικές TMA, που βασίζονται στην ενίσχυση του 23S ριβοσωμικού RNA, έχουν σχετικά πρόσφατα αναπτυχθεί για την ανίχνευση των *C. trachomatis*:

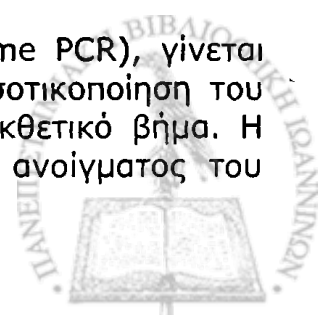
1. η τεχνική NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification) που χρησιμοποιεί τρία ξεχωριστά ένζυμα (τα: AMV ανάστροφη τρανσκριπτάση (RT), RNase H και T7 πολυμεράση). Η Organon Teknika, στην οποία ανήκουν τα αποκλειστικά δικαιώματα της τεχνικής NASBA, έχει αναπτύξει μια τεχνική "in-house" NASBA η οποία δεν έχει ακόμη δοκιμασθεί κλινικά.
2. η τεχνική TMA που χρησιμοποιεί δυο ένζυμα (την RT ανάστροφη τρανσκριπτάση και την T7 πολυμεράση) (Peeling et al., Methods in Molecular Medicine, Vol.20). Η GEN-PROBE (Gen-Probe, San Diego, California) ανέπτυξε την τεχνική TMA, ολοκλήρωσε τις κλινικές δοκιμασίες και έχει εγκριθεί από το FDA.

Η τεχνική TMA μιμείται τη διαδικασία αντιγραφής του RNA των ρετροϊών, παράγοντας ένα προϊόν (amplicon) RNA, με τη μεσολάβηση του cDNA (Guatelli et al., 1990).

Η τεχνική TMA ενισχύει την 16SrRNA αλληλουχία-στόχο με μια ισοθερμική αντίδραση ενίσχυσης. Αρχικά, το γενετικό υλικό διασπάται με θέρμανση στους 95 βαθμούς Κελσίου για 10 λεπτά και έπειτα, χαμηλώνοντας τη θερμοκρασία στους 42 βαθμούς Κελσίου και με τη δράση του ενζύμου RT για την ανάστροφη μεταγραφή, φτιάχνεται ένα cDNA αντίγραφο του στόχου-RNA χρησιμοποιώντας ένα «χιμαιρικό» primer, ο οποίος έχει μια αλληλουχία βάσεων συμπληρωματική προς το στόχο και μια αλληλουχία για τη σύνδεση με το ένζυμο T7 RNA polymerase. Ακολούθως, ένας δεύτερος primer προσκολλάται στο 3' τελικό άκρο του cDNA και με τη βοήθεια του ενζύμου RT και της DNA πολυμεράσης, σχηματίζεται η συμπληρωματική δεύτερη αλυσίδα του DNA οπότε και ολοκληρώνεται η παραγωγή της διπλής αλυσίδας DNA. Το προϊόν αυτό αντιγράφεται από την T7 polymerase αναπαράγοντας κατ'αυτόν τον τρόπο έως και 10^8 αντίγραφα της αλληλουχίας-στόχου του RNA. Η διαδικασία ανίχνευσης περιλαμβάνει υβριδοποίηση του ενισχυμένου προϊόντος με ένα μονής έλικας DNA probe και ανίχνευσή του ένα σημασμένο με ένζυμο αντίσωμα. Από την αντίδραση αυτή παράγεται χρώμα που μετράται με χημειοφωταύγεια.

ε) Ποσοτική PCR:

Η ποσοτική PCR, ή «πραγματικού χρόνου PCR» (real-time PCR), γίνεται μέσα σε κλειστά, γυάλινα φιαλίδια, όπου η ανίχνευση και ποσοτικοποίηση του αναπαραγώγιμου προϊόντος πραγματοποιείται μετά από κάθε εκθετικό βήμα. Η αυτοματοποίηση της μεθόδου περιορίζει την ανάγκη συχνού ανοίγματος του



φιαλιδίου αυξάνοντας την ακρίβειά της και μειώνει τον κίνδυνο επιμόλυνσης του δείγματος (Raeymaekers, 2000).

Ο Eastick και συν. (2000) ανέπτυξαν μια κινητική και ποσοτική PCR, έναντι της αλληλουχίας του *omp1* γονιδίου και του πλασμιδίου των *C.trachomatis*. Εξετάζοντας 501 δείγματα ούρων γυναικών, που προσήλθαν σε γυναικολογική και ουρολογική κλινική, διαπίστωσαν ότι η ποσοτική PCR ήταν περίπου το ίδιο ευαίσθητη με την Roche Cobas Amplicor PCR.

Πρόσφατα, ο Solomon και συν. (2003), εφάρμοσαν ποσοτική PCR, για την ποσοτική μέτρηση των *C.trachomatis* σε οφθαλμικά επιχρίσματα, σε όλα τα μέλη τριών κοινοτήτων στην Τανζανία, όπου το τράχωμα είναι ενδημικό, πριν και μετά τη χορήγηση θεραπείας σ'όλα τα μέλη των κοινοτήτων. Τέτοιες μελέτες μπορούν να οδηγήσουν σε περαιτέρω συμπεράσματα για την επιδημιολογία του τραχώματος και να βοηθήσουν στο σχεδιασμό εθνικών στρατηγικών για τον έλεγχο της νόσου.

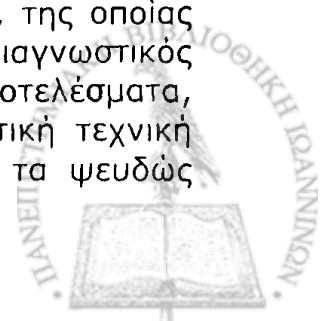
7.7. Η σημασία των «προγνωστικών αξιών» κατά την εφαρμογή μιας μεθόδου.

Η ευαισθησία (δηλ. η ικανότητα της μεθόδου να ανιχνεύει τα θετικά δείγματα) και η ειδικότητα (δηλ. η ικανότητα της μεθόδου να ανιχνεύει τα αρνητικά δείγματα), λαμβάνονται υπόψιν κατά την αξιολόγηση μιας μεθόδου. Επίσης σημαντική είναι η θετική προγνωστική αξία, PPV (δηλ. η πιθανότητα ένα θετικό αποτέλεσμα να είναι αληθώς θετικό), καθώς και η αρνητική προγνωστική αξία, NPV (δηλ. η πιθανότητα ένα αρνητικό αποτέλεσμα να είναι αληθώς αρνητικό). Διότι ένα ψευδώς θετικό αποτέλεσμα για ένα σεξουαλικό μεταδιδόμενο νόσημα, όπως και μια χλαμυδιακή λοίμωξη που παραβλέπεται και παραμένει αδιάγνωστη, μπορούν να έχουν σοβαρές επιπτώσεις.

Σε αντίθεση με την ευαισθησία και την ειδικότητα μιας μεθόδου, οι προγνωστικές αξίες εξαρτώνται άμεσα από τη συχνότητα της λοίμωξης στον υπό εξέταση πληθυσμό (Ostergaard, 1995) και παρά την αξιοπιστία μιας μεθόδου που διαθέτει υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα, θα πρέπει να γνωρίζουμε και τις προγνωστικές αξίες.

Στο παράδειγμα που ακολουθεί φαίνεται η διαφορά στις προγνωστικές αξίες που δίνει μια μέθοδος με ευαισθησία 95% και ειδικότητα 99%, όταν εφαρμόζεται σε 2000 νεαρές ασυμπτωματικές γυναίκες με συχνότητα λοίμωξης 10% (Πίνακας: 2) και όταν εφαρμόζεται σε 2000 ασυμπτωματικές έγκυες γυναίκες ηλικίας 35 χρονών, με συχνότητα 1% (Πίνακας: 3). Όπως προκύπτει, η θετική προγνωστική αξία (PPV) μειώνεται δραματικά με τη μείωση της συχνότητας της λοίμωξης σ'έναν πληθυσμό, έτσι ώστε όταν μελετάται πληθυσμός με συχνότητα 1%, η πιθανότητα ένα θετικό αποτέλεσμα να μην είναι σωστό είναι μεγαλύτερη από το να είναι σωστό (Ostergaard, 2002).

Σύμφωνα με τις οδηγίες του CDC, το 2002, σε πληθυσμούς με χαμηλή συχνότητα λοίμωξης, τα θετικά αποτελέσματα που δίνει ένα "screening test", θα πρέπει να επιβεβαιώνονται. Ειδικότερα, σε πληθυσμούς με χαμηλή συχνότητα λοίμωξης, όπου λαμβάνεται υπόψη και η PPV και το κόστος, προτείνει την εφαρμογή μιας μη μοριακής μεθόδου για το έλεγχο του πληθυσμού, της οποίας όμως η «γκρι ζώνη» θα είναι χαμηλότερα από αυτή που προτείνει ο διαγνωστικός οίκος. Με τη στρατηγική αυτή εξασφαλίζονται περισσότερα θετικά αποτελέσματα, με την προϋπόθεση ότι αυτά θα «φιλτράρονται» με μια επιβεβαιωτική τεχνική υψηλής ευαισθησίας, όπως είναι οι NAAT. Έτσι, θα αποφεύγονται τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα.



Πίνακας 2 : Προγνωστικές αξίες σε πληθυσμό με συχνότητα 10%

	Ασθενείς με λοίμωξη	Ασθενείς χωρίς λοίμωξη	Σύνολο
Θετικό αποτέλεσμα	190	18	208
Αρνητικό αποτέλεσμα	10	1782	1792
Σύνολο	200	1800	2000

Ευαισθησία: $190/200 = 95\%$

Ειδικότητα: $1782/1800 = 99\%$

Θετική προγνωστική αξία: $190/208 = 91\%$

Αρνητική προγνωστική αξία: $1782/1792 = 99\%$

Πίνακας 3 : Προγνωστικές αξίες σε πληθυσμό με συχνότητα 1%

	Ασθενείς με λοίμωξη	Ασθενείς χωρίς λοίμωξη	Σύνολο
Θετικό αποτέλεσμα	19	20	39
Αρνητικό αποτέλεσμα	1	1960	1961
Σύνολο	20	1980	2000

Ευαισθησία: $19/20 = 95\%$

Ειδικότητα: $1960/1980 = 99\%$

Θετική προγνωστική αξία: $19/39 = 49\%$

Αρνητική προγνωστική αξία: $1960/1961 = 99\%$



ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Για τη θεραπεία των **ουροποιογεννητικών λοιμώξεων** από *C. trachomatis* χορηγείται δοξυκυκλίνη (100 mgr. p.o. για 7 ημέρες), ή αζιθρομυκίνη (1,0 mgr p.o. εφάπαξ). Εναλλακτικά, χορηγείται ερυθρομυκίνη (500 mgr. p.o. για 7 ημέρες), ή οφλοξασίνη (300 mgr. p.o. 2 φορές/ημέρα για 7 ημέρες).

Στην εγκυμοσύνη χορηγείται ερυθρομυκίνη (500 mgr. p.o. για 7 ημέρες), ή αμοξικιλίνη (500 mgr. p.o. για 7 ημέρες). Εναλλακτικά, χορηγείται ερυθρομυκίνη (250 mgr. p.o. για 4 ημέρες), ή αζιθρομυκίνη (1,0 mgr p.o. εφάπαξ).

Στην **επιεφυκίτιδα των νεογνών** από *C. trachomatis*, αν και είναι μια εντοπισμένη νόσος, η συστηματική αντιβιοτική θεραπεία κρίνεται αναγκαία κάθε φορά που υπάρχει υποψία συνλοίμωξης με βακτηριακή, γιατί επιτρέπει τον περιορισμό της εξάπλωσης του μικροοργανισμού, αποτρέπει την πιθανότητα αποικισμού άλλων οργάνων από *C. trachomatis* και μειώνει τη διάρκεια της νόσου. Η τοπική θεραπεία για τα *C. trachomatis*, είναι αναποτελεσματική (Gigliotti et al., 1984, Brussieux et al., 1991, Mashauan et al., 1996), λόγω της δύσκολης εφαρμογής της και της αδυναμίας της να περιορίσει τη συνυπάρχουσα ρινοφαρυγγική φορεία (Heggie et al., 1985), η οποία μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα υποτροπιάζουσα επιεφυκίτιδα, ή πνευμονία από *C. trachomatis*, ή και τα δυο (Heggie et al., 1985).

Η συνιστώμενη θεραπεία είναι ερυθρομυκίνη (50mg/kg/ημερησίως, p.os.), διαιρεμένη σε τέσσερις δόσεις για 10 -14 ημέρες. Σε περιπτώσεις υποτροπών, που είναι συχνές, επιβάλλεται η ίδια αγωγή για ακόμη δυο εβδομάδες. Εναλλακτικά στην ερυθρομυκίνη δίνεται κορτιμοξαζόλη (80-150 mg/kg/ημερησίως), για δυο εβδομάδες. Μια πρόσφατη μελέτη με καλά αποτελέσματα και καλά ανεκτή, έγινε με αζιθρομυκίνη σε δόση 20mg/kg μια φορά την ημέρα, για τρεις ημέρες (Hammerschlag et al., 1998).

Η θεραπεία της πνευμονίας των νεογνών από *C. trachomatis* είναι η ίδια με της επιεφυκίτιδας και η αποτελεσματικότητά της είναι επίσης 80% περίπου. Επίσης θεραπεία πρέπει να λαμβάνουν και οι γονείς αυτών των νεογνών.

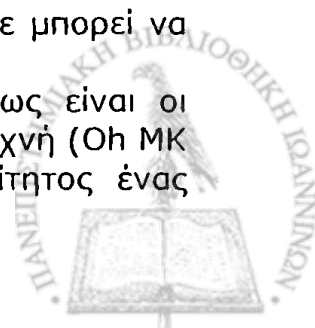
Κάθε χλαμυδιακή λοίμωξη σε νεογέννητο προέρχεται από λοίμωξη του γεννητικού συστήματος της μητέρας, άρα επιβάλλεται η θεραπεία της μητέρας και του συντρόφου της. Ο περιγεννητικός έλεγχος για χλαμύδια και η θεραπεία των μολυσμένων γυναικών είναι περίπου 90% αποτελεσματική στην πρόληψη της μετάδοσης της λοίμωξης στα νεογέννητα (Pereira et al., 1990).

Στην **επιεφυκίτιδα από έγκλειστα των ενηλίκων** δεν συνιστάται η τοπική θεραπεία λόγω της δύσκολης εφαρμογής της, αλλά και λόγω της αδυναμίας της να περιορίσει την ταυτόχρονη ρινοφαρυγγική φορεία (Heggie et al., 1985). Η παραμονή της ρινοφαρυγγικής φορείας μπορεί να οδηγήσει σε υποτροπιάζουσες επιεφυκίτιδες, πνευμονία, ή και στα δυο (Heggie et al., 1985).

Η προτεινόμενη θεραπεία είναι η από του στόματος χορήγηση τετρακυκλίνης (500 mg/8hs για 7 ημέρες), ή δοξυκυκλίνης (100 mg/12hs για 7 ημέρες), ή ερυθρομυκίνης (500 mg/6hs για 7 ημέρες), ή 1 gr αζιθρομυκίνης εφάπαξ.

Η αποτελεσματικότητα της θεραπείας είναι περίπου 80%, οπότε μπορεί να απαιτηθεί επανάληψη της θεραπείας.

Στους πληθυσμούς υψηλού κινδύνου για επαναλοίμωξη, όπως είναι οι έφηβοι, η επανεμφάνιση της λοίμωξης μετά το πρώτο τρίμηνο είναι συχνή (Oh MK et al., 1993). Γι'αυτό, σ'αυτόν τον πληθυσμό, ίσως είναι απαραίτητος ένας επαναλαμβανόμενος προγεννητικός έλεγχος.



Σε περιοχές όπου ενδημεί το **τράχωμα**, η κύρια δεξαμενή της νόσου, είναι τα παιδιά με οφθαλμική λοίμωξη. Η μετάδοση στα μάτια γίνεται μέσω των χεριών των παιδιών και των φορέων, ή μέσω των ποδιών εντόμων, όπως οι μύγες, όταν αυτά κάθονται πάνω στο οφθαλμικό έκκριμα των παιδιών με οξεία επιπεφυκίτιδα (Forsey et al., 1981, Taylor et al., 1992). Οι παράγοντες υγιεινής που φαίνεται να είναι ιδιαίτερα σημαντικοί για τον έλεγχο της νόσου, περιλαμβάνουν καθαριότητα του προσώπου και απομάκρυνση των εντόμων από τους οικιακούς χώρους. Η τοπική αντιβιοτική θεραπεία έχει περιορισμένο όφελος (Dawson et al., 1985), διότι εξω-οφθαλμικές θέσεις, όπως, ο ρινοφάρυγγας και το ορθό, είναι αποικισμένα στα παιδιά με τράχωμα (Malaty et al., 1981). Η συστηματική αντιβιοτική θεραπεία είναι αποτελεσματική στους ανθρώπους και ίσως και στις κοινότητες των οποίων η συχνότητα της νόσου παραμένει σχετικά χαμηλή (Dawson et al., 1985). Εντούτοις, η συμμόρφωση των ασθενών στην ερυθρομυκίνη είναι φτωχή και η δοξυκυκλίνη αντενδείκνυται στα μικρά παιδιά. Πρόσφατα αποτελέσματα δοκιμασιών μαζικής θεραπείας με αζιθρομυκίνη, σε χωριά με ενδημικό τράχωμα, δείχνουν ότι και η λοίμωξη και η κλινική νόσος μειώθηκαν σημαντικά 6-12 μήνες μετά τη θεραπεία (Dawson et al., 1998, Mabey et al., 1998, Schachter et al., 1998). Επίσης, προγράμματα που περιλαμβάνουν ομάδες χειρουργικής των βλεφάρων, για την πρόληψη της τύφλωσης λόγω των δυσμορφιών των βλεφάρων που προκαλεί η συνεχής καταστροφή του κερατοειδούς, είναι πολύτιμα (Dawson et al., 1985). Λόγω των παραγόντων υγιεινής, υπάρχει μια ισχυρή ιστορική σχέση μεταξύ της βελτίωσης των κοινωνικο-οικονομικών συνθηκών και της εξαφάνισης του ενδημικού τραχώματος.

Για τη θεραπεία του πρώτου και δεύτερου σταδίου του **LGV**, έχουν χρησιμοποιηθεί τετρακυκλίνη, δοξυκυκλίνη, μινοκυκλίνη, χλωραμφενικόλη, ερυθρομυκίνη και ριφαμπικίνη με καλά αποτελέσματα (Greenblatt, 1952, Greaves et al., 1957, Perine et al., 1990). Οι οδηγίες του CDC είναι 21 ημέρες δοξυκυκλίνη, 100mg δυο φορές ημερησίως και ερυθρομυκίνη ή σουλφοσοξαζόλη ως εναλλακτική θεραπευτική αγωγή (CDC, 1998). Επιπλέον, οι κλυνδάζουσες βουβωνικές μάζες θα πρέπει να αναρροφώνται, για να προληφθεί η ρήξη και ο σχηματισμός σηραγγωδών πόρων (Perine et al., 1990). Η αντιβιοτική θεραπεία έχει ως αποτέλεσμα τη γρήγορη ύφεση των γενικών συμπτωμάτων, αλλά έχει περιορισμένη δράση στην υποχώρηση της βουβωνικής μάζας. Πιθανές είναι οι απώτερες επιπλοκές, όπως οι ουλώδεις στενώσεις (Schachter et al., 1978, Perine et al., 1990).



8. ΠΡΟΛΗΨΗ

Τα τελευταία χρόνια γίνεται προσπάθεια για την κατασκευή εμβολίου έναντι των *Chlamydiae*, χωρίς όμως επιτυχία. Τα *C.trachomatis* έχουν διάφορους ορότυπους κάνοντας δύσκολη τη δημιουργία εμβολίου.

Οι Brunham και συν. (2005), υποστηρίζουν ότι τα αντιγόνα των *C.trachomatis* μπορούν να αποδειχθούν σημαντικά για τη δημιουργία εμβολίου. Όπως διαπιστώθηκε σε ποντίκια πειραματόζωα, τα αντιγόνα MOMP και OMP2 των *Chlamydia muridarum*, τα οποία προσβάλλουν τους ποντικούς, μπορούν να αποτελέσουν ένα προστατευτικό εμβόλιο διεγείροντας την τύπου T helper-1 ανοσιακή απάντηση, προστατεύοντας τα ποντίκια από τη λοίμωξη. (Τα περισσότερα γονίδια των *Chlamydia muridarum* και των *Chlamydia trachomatis* είναι κοινά).

Οι χλαμυδιακές λοιμώξεις του ουροποιογεννητικού συστήματος, είναι δυνατόν να αποφευχθούν αν προληφθούν έγκαιρα, γι' αυτό και το ενδιαφέρον της έρευνας και των συστημάτων υγείας πρέπει να εστιαστεί στην πρόληψη αυτών.

Οι βασικές στρατηγικές πρόληψης περιλαμβάνουν: 1) Προσπάθεια να επιτευχθούν αλλαγές στη σεξουαλική συμπεριφορά, τέτοιες που να μειώνουν τον κίνδυνο μετάδοσης της χλαμυδιακής λοίμωξης, όπως και των άλλων σεξουαλικά μεταδιδόμενων νοσημάτων. 2) Προσδιορισμό και θεραπεία των ατόμων με λοίμωξη του γεννητικού συστήματος, πριν αυτοί μεταδώσουν τη νόσο.

Οι συμπεριφορές που μπορεί να μειώσουν τον κίνδυνο μετάδοσης της νόσου, περιλαμβάνουν: καθυστέρηση έναρξης της σεξουαλικής ζωής, μείωση του αριθμού των σεξουαλικών συντρόφων, συστηματική χρήση του προφυλακτικού, συζήτηση με τους συντρόφους το σεξουαλικό τους ιστορικό, ενημέρωση των σεξουαλικά ενεργών ατόμων για τα σεξουαλικά μεταδιδόμενα νοσήματα και ανταλλαγή πληροφοριών με φίλους και τακτικός έλεγχος για φορεία των ασυμπτωματικών ατόμων. Οι νέοι, καλό είναι να έχουν υπόψιν τους ότι μόνο η αποχή εξασφαλίζει 100% σίγουρη προστασία από τα σεξουαλικά μεταδιδόμενα νοσήματα.

Επίσης, προγράμματα που φαίνεται να είναι αποτελεσματικά στη μείωση της μετάδοσης, περιλαμβάνουν έλεγχο του υψηλού κινδύνου πληθυσμού για ασυμπτωματικές λοιμώξεις, καθώς και εντοπισμό και θεραπεία των νοσούντων.

Λόγω του ότι οι χλαμυδιακές λοιμώξεις συχνά υποτροπιάζουν, μέσα στους πρώτους μήνες μετά τη θεραπεία της αρχικής λοίμωξης (Burstein et al., 1998, Katz et al., 1998), κρίνεται απαραίτητος, ο τακτικός έλεγχος (Orr et al., 1998) (π.χ. κάθε 6 μήνες), των ασυμπτωματικών σεξουαλικά ενεργών εφήβων. Τα τελευταία χρόνια, η εφαρμογή των μοριακών τεχνικών έδωσε τη δυνατότητα αξιόπιστου και μη επεμβατικού ελέγχου (με τον έλεγχο των ούρων), των σεξουαλικά ενεργών ανδρών και γυναικών, όπως σε γυμνάσια, ή σε κέντρα νεοσύλλεκτων στρατιωτών (Reitmeijer et al., 1997, Gaydos et al., 1998, Miller et al., 1998).

Ιδιαίτερα αποτελεσματικός, στη μείωση της συχνότητας της λοίμωξης, είναι ο εντοπισμός και η θεραπεία των σεξουαλικών συντρόφων. Ο έλεγχος αυτός έχει αποδειχθεί ότι μακροπρόθεσμα, είναι οικονομικά συμφέρον, παρά το κόστος που απαιτείται (Katz et al., 1988, Ripa, 1990).

Οι ενδείξεις που επιβάλλουν τον έλεγχο των γυναικών για λοίμωξη από *C.trachomatis*, σύμφωνα με τις οδηγίες του CDC (2002), συνοψίζονται στον πίνακα 4 :



Πίνακας 4 : Ενδείξεις για τον έλεγχο γυναικών από χλαμυδιακή λοίμωξη.

- Έλεγχος ρουτίνας όλων των σεξουαλικά ενεργών γυναικών, έως 25 ετών, εγκύων ή όχι. Γυναίκες και έφηβες έως 20 ετών είναι υψηλού κινδύνου για χλαμυδιακή λοίμωξη. Γυναίκες 20-25 ετών έχουν τη μεγαλύτερη πιθανότητα για χλαμυδιακή λοίμωξη.
- Έλεγχος ρουτίνας σε γυναίκες >25 ετών γίνεται όταν υπάρχουν παράγοντες κινδύνου.
- Η συχνότητα της λοίμωξης από *C. trachomatis* ποικίλει ευρέως ανάλογα τις κοινωνίες και τις πληθυσμιακές ομάδες. Ο καλύτερος οδηγός για την εφαρμογή ενός προγράμματος ελέγχου είναι η γνώση του υπό εξέταση πληθυσμού. Παράγοντες κινδύνου είναι:
 - Καινούργιος ή πολλοί σεξουαλικοί σύντροφοι, τις τελευταίες 90 ημέρες ή από τη τελευταία φορά που έγινε έλεγχος για *C. trachomatis*.
 - Ιστορικό σεξουαλικού μεταδιδόμενου νοσήματος.
 - Περιστασιακή και μη σωστή χρήση προφυλακτικού.
- Ο ιδανικός χρόνος για έλεγχο εγκύων γυναικών δεν είναι καθορισμένος:
 - Ο έλεγχος στην αρχή της εγκυμοσύνης μειώνει τον κίνδυνο επιπλοκών, όπως πρόωρος τοκετός και χαμηλό βάρος γέννησης.
 - Ο έλεγχος στο τρίτο τρίμηνο και θεραπεία μειώνει την πιθανότητα μετάδοσης των *C. trachomatis* στο νεογνό.
- Το χρονικό διάστημα για τον επενέλεγχο μιας γυναίκας με προηγούμενη αρνητική εξέταση, εξαρτάται από πιθανούς παράγοντες κινδύνου (ηλικία, σύντροφοι, κ.λ.π.). Γυναίκες με λοίμωξη από *C. trachomatis* θα πρέπει να ελέγχονται 3-4 μήνες μετά το πέρας της θεραπείας.

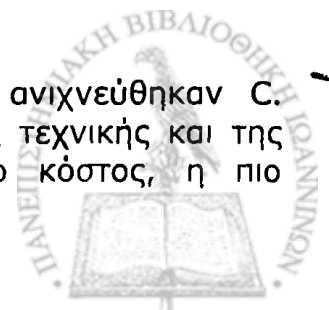
Στη Σουηδία, όπου έχει εφαρμοσθεί ένα εκτεταμένο πρόγραμμα εκπαίδευσης και ελέγχου των χλαμυδιακών λοιμώξεων, βασιζόμενο στα προαναφερθέντα επιδημιολογικά και στατιστικά δεδομένα, παρατηρήθηκε μια σημαντική μείωση των χλαμυδιακών λοιμώξεων την τελευταία δεκαετία (Ripa, 1990, Herrmann et al., 1991). Επίσης, σημαντική μείωση παρατηρήθηκε σε συγκεκριμένες περιοχές των ΗΠΑ, όπως στις πολιτείες Indianapolis (Jones et al., 1990), Washington (DeLisle et al., 1993), Wisconsin (Addiss et al., 1993) όπου εφαρμόστηκαν παρόμοια προγράμματα.

Πολλές μελέτες έγιναν γύρω από το κόστος και την αποτελεσματικότητα των μεθόδων ελέγχου και θεραπείας των λοιμώξεων από *C. trachomatis*. Μολονότι η εφαρμογή αυτών των προγραμμάτων σε κλινικές οικογενειακού προγραμματισμού οδήγησε στη μείωση της εμφάνισης των επιπλοκών, πολλά ερωτηματικά προέκυψαν γύρω από το ποια πρέπει να είναι η στρατηγική ελέγχου του πληθυσμού και ποιο το όφελος αυτών.

Μια μελέτη του American College of Physicians, το 1998, σε 7699 ασυμπτωματικές γυναίκες (Howell et al., 1998), επέτρεψε τη διερεύνηση των στρατηγικών αυτών. Οι συγγραφείς μελέτησαν τρία προγράμματα ελέγχου :

- α) Έλεγχος όλων των γυναικών, κάτω των 30 ετών.
- β) Γενικός έλεγχος των γυναικών, χωρίς επιλογή και
- γ) Έλεγχος σύμφωνα με τα κριτήρια του CDC (πίνακας 4)

Χρησιμοποιώντας την τεχνική PCR Amplicor Roche, ανιχνεύθηκαν *C. trachomatis* σε ποσοστό 6,6% και μελετήθηκε το κόστος της τεχνικής και της θεραπείας (φαρμακευτικής και χειρουργικής). Με βάση το κόστος, η πιο



συμφέρουσα στρατηγική ελέγχου αποδείχθηκε, ο έλεγχος σύμφωνα με τα κριτήρια του CDC, ενώ ακολουθεί η στρατηγική ελέγχου όλων των γυναικών ηλικίας <30 ετών. Ο γενικός, μαζικός έλεγχος, αποδείχθηκε ακατάλληλος λόγω του πολύ υψηλού κόστους.

Με βάση την αποτελεσματικότητα της κάθε στρατηγικής, αποδείχθηκε ότι, ο έλεγχος των γυναικών <30 ετών, επιτρέπει τον έλεγχο του 93,3% των μολυσμένων γυναικών μελετώντας το 71,4% του πληθυσμού, ο έλεγχος σύμφωνα με τα κριτήρια του CDC, ελέγχει το 70% των μολυσμένων γυναικών μελετώντας το 36,5% του πληθυσμού.

Όσον αφορά την πρόληψη των χλαμυδιακών νοσημάτων στα νεογέννητα, η εφαρμογή οφθαλμικών αλοιφών, έχει αποδειχθεί αναποτελεσματική, για τους προαναφερθέντες λόγους. Έτσι, ο μόνος τρόπος πρόληψης είναι ο έλεγχος των εγκύων και η θεραπεία αυτών και των σεξουαλικών τους συντρόφων. Τα χρησιμοποιούμενα φάρμακα είναι ερυθρομυκίνη, ενώ αζιθρομυκίνη και κινολόνες έχουν χρησιμοποιηθεί με καλά αποτελέσματα. Η δυνατότητα διάγνωσης της λοίμωξης σε εγκύους, με μη επεμβατικές μεθόδους, όπως είναι ο έλεγχος των ούρων με μοριακές τεχνικές, αποτελεί πρόσφατη πρόοδο, πολύ ενδιαφέρουσα για την επαγρύπνηση (Blake et al., 1998).

Συμπερασματικά, κάθε επιπεφυκίτιδα στα νεογέννητα, πρέπει να αποτελεί αντικείμενο ακριβούς αιτιολογικής διάγνωσης, για την αποφυγή άσκοπης χρήσης φαρμάκων, ή άσκοπων συνεχών κλινικών εξετάσεων και για να αποφευχθούν υποτροπές και αποικισμός άλλων οργάνων. Από τη στιγμή που είναι δύσκολο να ελεγχθούν όλες οι έγκυες γυναίκες, που μπορεί να είναι ασυμπτωματικοί φορείς, είναι υποχρεωτικό για τον παιδίατρο να ζητήσει μικροβιολογικό έλεγχο από τα πρώτα σημάδια επιπεφυκίτιδας, έχοντας υπόψιν του, μεταξύ των άλλων, την πιθανότητα λοίμωξης από *C. trachomatis* (Salpietro et al., 1999). Σε περίπτωση θετικού αποτελέσματος, πρέπει να γίνει έλεγχος των γονέων και να δίνεται θεραπεία.

Για την αντιμετώπιση του τραχώματος στις ενδημικές περιοχές, εφαρμόζονται στρατηγικές μαζικής φαρμακευτικής αγωγής σε όλο τον πληθυσμό (Schachter et al., 1999). Εντούτοις, καλύτερο και μακροπρόθεσμα αποτελεσματικότερο μέτρο πρόληψης είναι η βελτίωση των συνθηκών διαβίωσης. Πλύσιμο του προσώπου με καθαρό νερό κάθε 2^η μέρα και σκούπισμα με καθαρή πετσέτα η οποία δε θα μοιράζεται με άλλο άτομο, είναι αποτελεσματικά μέτρα (West et al., 1995). Οι συνθήκες υγιεινής στο σπίτι βοηθούν στην απομάκρυνση των μυγών που μεταδίδουν το τράχωμα. Επίσης, η χρήση μη κατεστραμένων προφυλακτικών προφυλάσσει από τη μετάδοση των γεννητικών-οφθαλμικών λοιμώξεων.



II. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



1. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός αυτής της μελέτης ήταν η ανίχνευση των *Chlamydia trachomatis* με μοριακές μεθόδους και με κυτταροκαλλιέργεια, σε δείγματα από το ουροποιογεννητικό σύστημα και από τους οφθαλμούς (επιπεφυκότες), παιδιών και ενηλίκων, με συμπτωματολογία ή όχι λοίμωξης.

Στόχος της μελέτης ήταν επίσης η πιθανή συσχέτιση των χλαμυδιακών λοιμώξεων με διάφορους παράγοντες (δημογραφικούς και παράγοντες σεξουαλικής συμπεριφοράς) με σκοπό να βρεθούν πιθανοί παράγοντες κινδύνου.



2. ΥΛΙΚΟ - ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Υλικό – Ασθενείς και δείγματα

Από τον Οκτώβριο του 1998 έως τον Μάιο του 2004 ελέγχθηκαν για *Chlamydia trachomatis* 3.340 σεξουαλικά ενεργά άτομα που επισκέφθηκαν Γυναικολόγους, Ουρολόγους, ή Δερματολόγους του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων για εξέταση ρουτίνας ή λόγω συμπτωμάτων. Όλοι οι ασθενείς που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη δεν είχαν λάβει αντιβιοτική θεραπεία τις τελευταίες 4 εβδομάδες και δεν είχαν ουρήσει τις τελευταίες 2 ώρες από τη συλλογή του δείγματος ούρων.

Συμπτωματικοί θεωρήθηκαν οι ασθενείς που παρουσίαζαν ένα ή περισσότερα από τα ακόλουθα κριτήρια: δυσουρία, αιμορραγία από το ουροποιητικό ή το γεννητικό σύστημα, πόνο στην πύελο ή στο γεννητικό σύστημα, κολπικό ή ουρηθρικό έκκριμα, ουρηθρίτιδα, αλλοιώσεις γεννητικών οργάνων ή κονδυλώματα, κνησμό ή εξάνθημα. Ασθενείς που δεν παρουσίαζαν κανένα από τα ανωτέρω σημεία ή συμπτώματα θεωρήθηκαν ασυμπτωματικοί.

Επίσης, κατά το ίδιο χρονικό διάστημα, ελέγχθηκαν για *C.trachomatis* 86 οφθαλμικά επιχρίσματα ασθενών με κλινική εικόνα ετερόπλευρης ή αμφοτερόπλευρης επιπεφυκίτιδας. Τα συμπτώματα που παρατηρήθηκαν ήταν: υδαρές οφθαλμικό έκκριμα έως και πυώδες, πρήξιμο των βλεφάρων, υπεραιμία των επιπεφυκότων ή οίδημα.

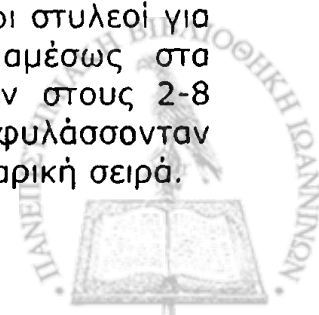
Συγχρόνως συλλέχθηκαν δημογραφικές πληροφορίες, καθώς και στοιχεία γύρω από τη σεξουαλική συμπεριφορά των εξεταζόμενων, χρησιμοποιώντας ένα ερωτηματολόγιο με το οποίο ζητήθηκαν πληροφορίες σχετικά με: την ηλικία, τον αριθμό των σεξουαλικών συντρόφων, την ύπαρξη νέου σεξουαλικού συντρόφου τον τελευταίο χρόνο, το ιστορικό σεξουαλικών μεταδιδόμενων νοσημάτων και τα κλινικά συμπτώματα (Πίνακας 5).

2.1.1. Συλλογή δειγμάτων

Από όλες τις γυναίκες λαμβάνονταν κολπικό και τραχηλικό επίχρισμα, καθώς και ούρα πρώτου ρεύματος, ενώ από όλους τους άνδρες ουρηθρικό επίχρισμα και ούρα πρώτου ρεύματος. Αναλυτικότερα:

α) Για το κολπικό επίχρισμα χρησιμοποιείτο ένας βαμβακοφόρος στυλεός για μικροσκοπική εξέταση (άμεσο παρασκεύασμα και Gram χρώση) και ένας για καλλιέργεια.

β) Για το τραχηλικό και ουρηθρικό επίχρισμα χρησιμοποιούντο τρεις βαμβακοφόροι στυλεοί: (i) ένας για την καλλιέργεια της *Neisseria gonorrhoeae*, για την οποία χρησιμοποιείτο ειδικό θρεπτικό υλικό Thayer-Martin agar ή το GC-Lect medium (BBL; Microbiology System), (ii) ένας για την αναζήτηση των *C. trachomatis* με PCR, για την οποία χρησιμοποιείτο το υλικό μεταφοράς του διαγνωστικού οίκου (AMPLICOR STD specimen collection kit), (iii) και ένας για την καλλιέργεια των *C. trachomatis*, για την οποία ο στυλεός ενοφθαλμιζόταν στο 2SP culture transport medium. Ακολούθως, οι στυλεοί μεταφέροντο στο εργαστήριο σε θερμοκρασία δωματίου. Τα κολπικά επιχρίσματα και οι στυλεοί για την καλλιέργεια της *Neisseria gonorrhoeae*, ενοφθαλμιζοντο αμέσως στα κατάλληλα θρεπτικά υλικά, οι στυλεοί για την PCR φυλάσσονταν στους 2-8 βαθμούς Κελσίου έως και 7 ημέρες, ενώ οι στυλεοί για καλλιέργεια φυλάσσονταν στους -70 βαθμούς Κελσίου έως του ενοφθαλμισμού τους στην κυτταρική σειρά.



Μετά τη συλλογή των επιχρισμάτων, 30 ml **πρώτου ρεύματος ούρων** συλλέγονταν από κάθε ασθενή, σε καθαρό ουροσυλλέκτη πολυπροπυλενίου, χωρίς προσθήκη συντηρητικών, αναγράφοντο τα στοιχεία του ασθενούς και η ημερομηνία και παρέμεναν στους 2-8 βαθμούς Κελσίου, έως και 7 ημέρες, μέχρι να εξετασθούν με την PCR.

Δύο κλάσματα από κάθε δείγμα, στυλεό και ούρα, φυλάσσονταν στους -70 βαθμούς Κελσίου για να χρησιμοποιηθούν σε περίπτωση αμφίβολων αποτελεσμάτων.

Για τους ασθενείς που ελέγχθηκαν για *C. trachomatis* περισσότερες από μια φορές, μόνο τα αποτελέσματα της αρχικής εξέτασης συμπεριλήφθηκαν σ'αυτή τη μελέτη (Black et al., 2002).

Ο σωστός τρόπος συλλογής και χειρισμού των δειγμάτων είναι ιδιαίτερα σημαντικός για την άριστη εφαρμογή των μεθόδων αναζήτησης *C. trachomatis*. Η παρουσία αυξημένου αριθμού κυλινδρικών επιθηλιακών κυττάρων στα ενδοτραχηλικά επιχρίσματα έχει συσχετισθεί με αυξημένη ευαισθησία των μοριακών μεθόδων.

Η λήψη και διαχείριση των δειγμάτων που ελέγχονται με μοριακές μεθόδους πρέπει να γίνεται όπως ορίζεται από τους κατασκευαστές των μεθόδων. Η συλλογή αυτών ακολουθούσε τη συλλογή των κολπικών επιχρισμάτων, καθώς και του επιχρίσματος για την αναζήτηση *N. gonorrhoeae* (CDC, 2002).

Για τη **συλλογή των ενδοτραχηλικών δειγμάτων** γινόταν καθαρισμός του έξω τραχηλικού στομίου από βλέννη και οι στυλεοί εισέρχοντο 1-2 cm στον ενδοτράχηλο (μετά το μεταβατικό επιθήλιο). Κατόπιν περιστροφής για 15 έως 30 δευτερόλεπτα οι στυλεοί απομακρύνονταν αποφεύγοντας την επαφή με το κολπικό τοίχωμα και τοποθετούνταν στο σωληνάριο μεταφοράς.

Για τη **συλλογή των ουρηθρικών δειγμάτων** των ανδρών εισέρχονταν ο λεπτός στυλεός 2-4cm στην ουρήθρα, όπου και περιστρεφόταν για 3 έως 5 δευτερόλεπτα και κατόπιν τοποθετούνταν στο σωληνάριο μεταφοράς.

Η λήψη των επιχρισμάτων που προοριζόταν για καλλιέργεια γινόταν με πλαστικό ή μεταλλικό στυλεό που στο άκρο του έφερε βαμβάκι, γαυον ή Dacron και όχι αλγινικό ασβέστιο. Ξύλινοι στυλεοί αποφεύγονταν γιατί μπορεί να περιείχαν ουσίες τοξικές για τα *C. trachomatis* ή την κυτταροκαλλιέργεια. Η βιωσιμότητα των *C. trachomatis* στα επιχρίσματα διασφαλιζόταν κατά τη μεταφορά στο εργαστήριο. Όταν ο ενοφθαλμισμός των δειγμάτων στην κυτταρική σειρά γινόταν εντός 24 ωρών, τα δείγματα μπορούσαν να διατηρηθούν στους 4 βαθμούς Κελσίου. Αν αυτό δεν ήταν εφικτό, τα δείγματα φυλάσσονταν στους -70 βαθμούς Κελσίου (CDC, 2002).

Οι στυλεοί για την PCR τοποθετούντο στο ειδικό σωληνάριο μεταφοράς (Amplacor STD Specimen Collection Kit), όπου αφού περιστρέφονταν για 15 δευτερόλεπτα αφαιρούνταν και απορρίπτονταν. Παραμονή του στυλεού στο σωληνάριο για περισσότερο χρόνο θεωρείται ανασταλτικός παράγοντας για την PCR.

Η συλλογή των **οφθαλμικών επιχρισμάτων** γινόταν από τον άνω και κάτω ταρσικό επιπεφυκότα, μετά την αφαίρεση τυχόν βλέννης ή πυώδους εκκρίματος. Χρησιμοποιούντο δυο λεπτοί βαμβακοφόροι στυλεοί, ένας για την PCR και ένας για την κυτταροκαλλιέργεια, με άμεση μεταφορά στο εργαστήριο, όπου και ακολουθούσαν η ίδια διαδικασία με τα επιχρίσματα από το ουροποιογεννητικό σύστημα.



Πίνακας 5:

ΕΡΩΤΗΜΑΤΟΛΟΓΙΟ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΖΗΤΗΣΗ
CHLAMYDIA TRACHOMATIS

Όνοματεπώνυμο:

Φύλο: Ηλικία:

Εθνικότητα:

Επάγγελμα:

Τηλέφωνο:

Αίτια προσέλευσης: α) Συμπτώματα

β) test Παπανικολάου

γ) Εγκυμοσύνη

εβδομάδα κύησης: ...

δ) Άλλη αιτία

Σεξουαλικό ιστορικό (τον τελευταίο χρόνο):

α) περισσότεροι από ένας / μια σεξουαλικοί σύντροφοι

β) καινούργιος σεξουαλικός σύντροφος

Προηγούμενο σεξουαλικά μεταδιδόμενο νόσημα:

α) κανένα

β) τριχομονάδες

γ) γονόρροια

δ) σύφιλη

Λήψη αντιβιοτικών τις δυο τελευταίες εβδομάδες: ΝΑΙ ... ΟΧΙ ...

Ευρήματα κλινικής εξέτασης:

.....

.....



2.2. Μέθοδοι

α) Όλα τα επιχρίσματα (τραχηλικά, ουρηθρικά, οφθαλμικά) ελέγχονταν για *C. trachomatis*:

- 1) με το σύστημα Cobas Amplicor CT (COBAS AMPLICOR TM, Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ USA) και
- 2) με κυτταροκαλλιέργεια

β) Όλα τα δείγματα ούρων ελέγχονταν για *C. trachomatis* με το σύστημα Cobas Amplicor CT.

2.2.1. Κυτταροκαλλιέργεια

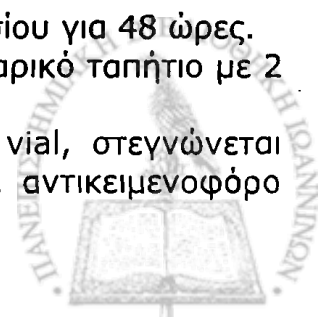
Για την καλλιέργεια των *C. trachomatis* χρησιμοποιήθηκε η τεχνική καλλιέργειας σε "shell vials" (Lennette et al., 1995). Τα "shell vial" είναι μια τροποποιημένη τεχνική της κυτταροκαλλιέργειας στην οποία χρησιμοποιούνται φιαλίδια (διαμέτρου 15 mm), στον πυθμένα των οποίων υπάρχει γυάλινη καλυπτρίδα (διαμέτρου 13 mm) πάνω στην οποία βρίσκεται το μονόστιχο ταπήτιο των κυττάρων McCoy (Εικόνα 15).

Τα κύτταρα McCoy, προέρχονται από μια κυτταρική σειρά ανθρώπινων κυττάρων παράγονται από την εταιρεία Vircell, S.L. (Granada, Spain) της οποίας όλες οι κυτταρικές σειρές προέρχονται από το ATCC (American Type Culture Collection).

Μετά τον ενοφθαλμισμό των δειγμάτων στα shell vials και την επώασή τους ακολούθησε η ανίχνευση των *Chlamydia trachomatis* με την τεχνική του έμμεσου ανοσοφθορισμού, κατά την οποία χρησιμοποιήθηκαν ειδικά μονοκλωνικά αντισώματα, σημασμένα με φλουορεσκεΐνη (Vircell, S.L., Granada, Spain).

Αναλυτικά, η μεθοδολογία της κυτταροκαλλιέργειας σε shell vials είχε ως εξής:

- αφαιρείται από τα shell vials το υγρό που περιέχουν, εκτός από 1ml. Το υγρό αυτό περιέχει αντιβιοτικά για την πρόληψη επιμολύνσεων των κυττάρων από μύκητες ή βακτήρια. Επιπλέον περιέχει ερυθρό της φαινόλης, ώστε το κόκκινο χρώμα να είναι ενδεικτικό pH από 7,2 έως 8,9, τα οποία είναι τα ιδανικά όρια για την καλλιέργεια. Κίτρινο χρώμα σημαίνει όξινο pH είτε λόγω επιμόλυνσης των κυττάρων, είτε λόγω υπερανάπτυξης της κυτταρικής σειράς. Βαθύ ροζ χρώμα δείχνει αλκαλικό pH πιθανόν λόγω της απώλειας CO₂.
- ακολούθως τα κύτταρα επωάζονται στους 37 βαθμούς Κελσίου, για τουλάχιστον 24 ώρες, πριν χρησιμοποιηθούν.
- αφαιρείται όλο το υγρό και ενοφθαλμίζονται στα shell vials 200μl δείγματος (ουρηθρικού, τραχηλικού και οφθαλμικού)
- φυγοκεντρώνονται στα 1500g για 60 λεπτά.
- επώαση στους 37 βαθμούς Κελσίου για 1 ώρα
- αφαιρείται το περιεχόμενο και προστίθεται 1ml βασικού θρεπτικού υλικού (minimum essential medium, MEM) εμπλουτισμένου με 2% ορού εμβρύου βοός (fetus beef serum, FBS).
- τα shell vials ακολούθως επωάζονται στους 37 βαθμούς Κελσίου για 48 ώρες.
- απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό και μονιμοποιείται το κυτταρικό ταπήτιο με 2 ml μεθανόλης για 10 λεπτά.
- απομακρύνεται η καλυπτρίδα από τον πυθμένα του shell vial, στεγνώνεται στον αέρα και σταθεροποιείται με ειδική κόλλα (DPX) σε αντικειμενοφόρο πλάκα με την επιφάνεια του ταπήτιου προς τα επάνω.

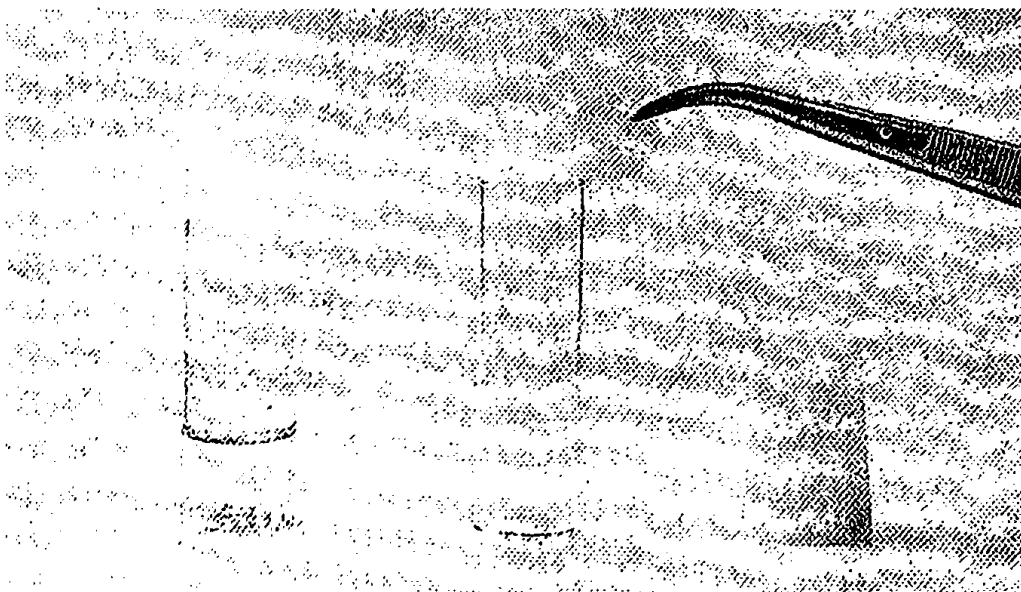


- επωάζεται το ταπήτιο με 25 μl μονοκλωνικού αντισώματος για 30 λεπτά στους 37 βαθμούς Κελσίου, σε σκοτεινό και υγρό περιβάλλον. Το μονοκλωνικό αντίσωμα είναι ειδικό για την κύρια πρωτεΐνη της εξωτερικής μεμβράνης (MOMP-protein) και είναι σημασμένο με τη φθορίζουσα χρωστική, φλουερεσκεΐνη.
- πλένεται η αντικειμενοφόρος πλάκα με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού άλατος (phosphate buffered saline, PBS) για 5 λεπτά και στεγνώνει στον αέρα.
- προστίθεται στο παρασκεύασμα μια σταγόνα γλυκερίνης και εξετάζεται στο ειδικό μικροσκόπιο ανοσοφθορισμού σε μεγέθυνση 400x.

Η παρουσία φθορίζοντων εγκλείστων επιβεβαιώναν την παρουσία των *Chlamydia trachomatis*.

Η μέθοδος διαθέτει θετικό και αρνητικό μάρτυρα, οι οποίοι αποτελούν συγκριτικό υπόβαθρο για τη διεξαγωγή των αποτελεσμάτων και μέσω των οποίων ελέγχεται η εγκυρότητα και η άψογη διεκπεραίωση της τεχνικής.

Ο συνολικός χρόνος για τη διενέργεια της κυτταροκαλλιέργειας σε shell vials ήταν περίπου 48-72 ώρες.



Εικόνα 15. Τεχνική κυτταροκαλλιέργειας σε σωληνάριο με καλυπτρίδα (shell vial).

Το γυάλινο σωληνάριο περιέχει θρεπτικό υλικό στον πυθμένα του οποίου υπάρχει γυάλινη καλυπτρίδα, πάνω στην οποία βρίσκεται το μονόστοιχο ταπήτιο των κυττάρων. Το κλινικό δείγμα εμβολιάζεται στο σωληνάριο και φυγοκεντρείται. Ακολουθεί επώαση, μετά την προσθήκη θρεπτικού υλικού, στους 37 °C για 48 ώρες. Στη συνέχεια απομακρύνεται η καλυπτρίδα από τον πυθμένα του shell vial και ακολουθεί η διαδικασία του έμμεσου ανασφθορισμού.

2.2.2. Μοριακές τεχνικές

PCR (Polymerase Chain Reaction (PCR): Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης).

Η μέθοδος περιλαμβάνει τέσσερα στάδια, τα οποία πραγματοποιούνται στο ίδιο φιαλίδιο, αλλά σε διαφορετικές θερμοκρασίες:

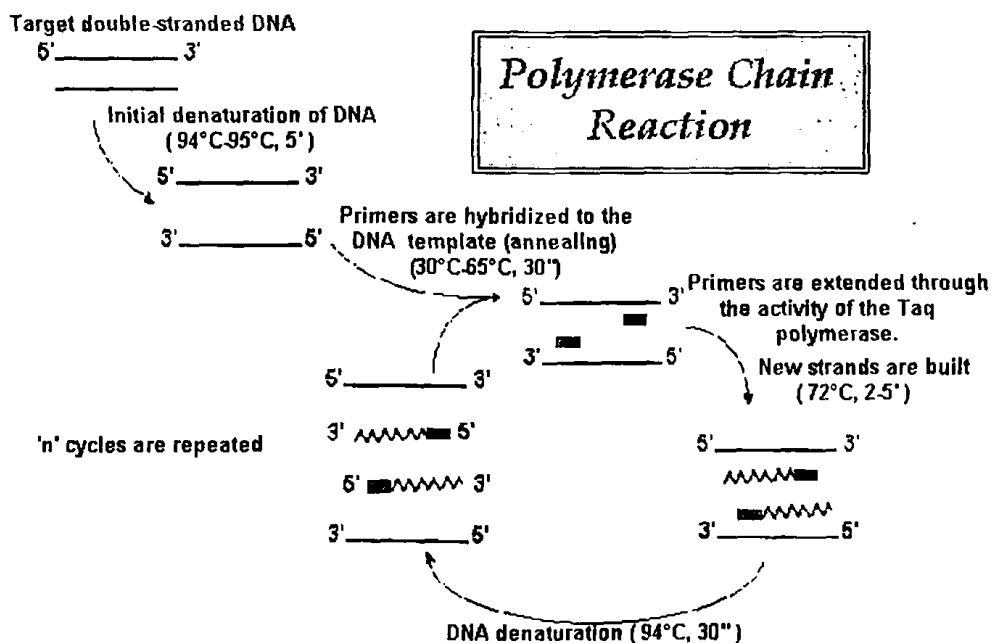
α) Προετοιμασία των δειγμάτων. Τα επιθηλιακά κύτταρα που έχουν συλλεγεί πάνω στους βαμβακοφόρους στυλεούς ή από το ίζημα των ούρων, επεξεργάζονται με απορρυπαντικό διάλυμα για ελευθερωθεί το χλαμυδιακό DNA που περιέχεται στα δικτυωτά σωμάτια των χλαμυδίων. Ένα δεύτερο απορρυπαντικό διάλυμα προστίθεται στη συνέχεια για να προετοιμάσει το δείγμα για την ενίσχυση.

β) PCR ενίσχυση: Περιλαμβάνει την ενίσχυση του DNA-στόχου και την παράλληλη ενίσχυση του εσωτερικού μάρτυρα (Internal Control) (Εικόνα 16).

Ενίσχυση του DNA-στόχου

Τα *C. trachomatis* περιέχουν, επιπλέον του χρωμοσωμιακού DNA και ένα κρυπτικό πλασμίδιο (περίπου 7.500 ζευγών βάσεων σε μέγεθος) το οποίο είναι κοινό σε όλους τους ορότυπους των *C. trachomatis*. Το Cobas AmpliCor CT test χρησιμοποιεί τους εκκινητές CP24 και CP27 για να προσδιορίσει μια αλληλουχία DNA περίπου 207 νουκλεοτιδίων μέσα από το κρυπτικό πλασμίδιο των *C. trachomatis*.

Τα επεξεργασμένα δείγματα προστίθενται στο μίγμα της ενίσχυσης που βρίσκεται στα A-tubes (Amplification tubes) όπου πραγματοποιείται η PCR. Το Cobas AmpliCor θερμαίνει το μίγμα της αντίδρασης στα A-tubes ώστε να μετουσιωθεί η διπλή έλικα του DNA και να γίνουν προσιτές οι αλληλουχίες-στόχοι στους εκκινητές. Καθώς το μίγμα ψύχεται, οι βιοτινυλιωμένοι εκκινητές CP24 και CP27 προσκολλώνται στην αλληλουχία-στόχο DNA. Η θερμοσταθερή DNA πολυμεράση, ταq polymerase, λόγω της ύπαρξης πλεονάσματος τριφωσφορικών δεοξυνουκλεοτιδίων (dNTPs) (δεοξυ-αδενοσίνη, δεοξυ-γουανοσίνη, δεοξυ-κυστιδίνη και δεοξυ-ουριδίνη, στη θέση της θυμιδίνης) επεκτείνει τους προσκολλημένους εκκινητές κατά μήκος του υποδοχέα-στόχου ώστε να παραχθεί μια αλληλουχία DNA που ονομάζεται amplicon. Αυτή η διαδικασία επαναλαμβάνεται αυτόματα από το Cobas AmpliCor για έναν αριθμό κύκλων και κάθε κύκλος διπλασιάζει το ποσό του amplicon DNA.



Εικόνα 16. Αρχή της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction - PCR).



Ενίσχυση του εσωτερικού μάρτυρα (Internal Control)

Η αποτελεσματικότητα μιας ένζυμο-εξαρτώμενης διαδικασίας ενίσχυσης, όπως η PCR, μπορεί να μειωθεί από ανασταλτικούς παράγοντες που ενδεχομένως υπάρχουν στο κλινικό δείγμα. Ο εσωτερικός μάρτυρας έχει προστεθεί για να προσδιορίσει τα δείγματα που περιέχουν ουσίες οι οποίες μπορεί να εμποδίσουν την PCR ενίσχυση. Ο εσωτερικός μάρτυρας εισάγεται μέσα σε κάθε αντίδραση ενίσχυσης και συν-ενισχύεται μαζί με το DNA-στόχο από το κλινικό δείγμα. Πρόκειται για μια αλληλουχία πλασμιδιακού DNA, το οποίο διαθέτει μια περιοχή σύνδεσης των εκκινήτων ταυτόσημη με εκείνη της αλληλουχίας-στόχου των *C. trachomatis*, μια τυχαία εσωτερική αλληλουχία παρόμοιου μήκους και σύνθεσης βάσεων με την αλληλουχία-στόχο των *C. trachomatis* και μια μοναδική περιοχή σύνδεσης του probe που διαφοροποιεί τον εσωτερικό μάρτυρα από τη αλληλουχία-στόχο. Αυτά τα χαρακτηριστικά επιλέχθηκαν για να εξασφαλίσουν μια ισότιμη ενίσχυση του εσωτερικού μάρτυρα και του DNA στόχου των *C. trachomatis*. Επιπλέον, ο εσωτερικός μάρτυρας αποτελεί έναν ασφαλή τρόπο ανίχνευσης των ψευδώς αρνητικών δειγμάτων.

Εκλεκτική ενίσχυση

Η εκλεκτική ενίσχυση του DNA-στόχου του κλινικού δείγματος με την τεχνική Cobas Amplicor CT επιτυγχάνεται με τη χρήση μιας «αμπεράσης», η οποία περιέχει το ένζυμο uracil-N glycosylase (UNG) 1S, το οποίο αναγνωρίζει και καταλύει την καταστροφή του DNA που περιέχει δεοξουριδίνη, αλλά όχι το DNA που περιέχει θυμιδίνη. Η δεοξουριδίνη δεν υπάρχει στο φυσικό-υπάρχων DNA, αλλά υπάρχει πάντα στο amplicon-DNA λόγω της χρήσης τριφωσφορικής δεοξουριδίνης στη θέση της τριφωσφορικής θυμιδίνης ως ένα από τα dNTPs στο αντιδραστήριο του Master Mix, δηλαδή μόνο το amplicon DNA περιέχει δεοξουριδίνη. Η παρουσία της δεοξουριδίνης καθιστά το επιμολυσμένο amplicon DNA ευαίσθητο στην καταστροφή του από την «αμπεράση», πριν την ενίσχυση του DNA-στόχου. Η «αμπεράση» καταλύει το σπάσιμο ενός ολιγονουκλεοτιδίου στα υπολείμματα της δεοξουριδίνης, ανοίγοντας την αλυσίδα της δεοξυριβόζης σε μια θέση. Όταν θερμαίνεται κατά τον πρώτο θερμικό κύκλο, μέσα στο αλκαλικό PH του Master Mix, η αλυσίδα του amplicon DNA σπάζει στη θέση της δεοξουριδίνης, καθιστώντας ως εκ τούτου το DNA ανίκανο να ενισχυθεί. Η «αμπεράση» είναι ανενεργής σε θερμοκρασία πάνω από 55 βαθμούς Κελσίου, δηλαδή καθ' όλη τη διάρκεια της θερμικής κυκλοποίησης και ως εκ τούτου δεν καταστρέφει το amplicon του στόχου. Στη διάρκεια της φάσης ενίσχυσης που ακολουθεί, το υπόλειμμα ενζύμου μετουσιώνεται με την προσθήκη ενός διαλύματος (denaturation solution), προλαμβάνοντας έτσι τη διάσπαση κάθε amplicon-στόχου. Η «αμπεράση» έχει σχεδιασθεί για να απενεργοποιεί 10^3 αντίγραφα amplicon που περιέχουν δεοξουριδίνη για κάθε PCR.

γ) Αντίδραση υβριδοποίησης: Ακολούθως της PCR ενίσχυσης, το Cobas Amplicor μετουσιώνει χημικά στα A-tubes το amplicon και προκύπτει έτσι μια μονή έλικα DNA. Κατόπιν κομμάτι του μίγματος μεταφέρεται στα D-cups (detection-cups). Ένα εναιώρημα μαγνητικών σωματιδίων καλυμμένων με ένα probe ολιγονουκλεοτιδίων ειδικών για *C. trachomatis* (ή για τον εσωτερικό μάρτυρα) προστίθεται σε κάθε μεμονωμένο D-cup. Το amplicon, το σεσημασμένο με βιοτίνη αιχμαλωτίζεται από τα μαγνητικά σωματίδια τα καλυμμένα με probe. Αυτή η υβριδοποίηση του amplicon με το ειδικό για το στόχο probe αυξάνει τη συνολική ειδικότητα της τεχνικής.



δ) Αντίδραση ανίχνευσης: Μετά το πλύσιμο των μαγνητικών σωματιδίων μέσα στο D-cup για να απομακρυνθούν τα μη συνδεδεμένα υλικά, προστίθεται αυτόματα το conjugate (Avidin-Horseradish Peroxidase: Av-HRP).

Το Av-HRP συνδέεται με το σημασμένο με βιοτίνη amplicon, το οποίο είναι αιχμαλωτισμένο από τα ειδικά για το στόχο probes, που είναι προσκολλημένα πάνω στα μαγνητικά σωματίδια. Ακολουθεί πλύσιμο για την απομάκρυνση του μη συνδεδεμένου conjugate και προσθήκη του υποστρώματος σε κάθε D-cup. Τα σωματίδια τα συνδεδεμένα με το conjugate καταλύουν την οξειδωση της 3,3',5,5'-τετραμεθυλβενζιδίνης (TMB) παρουσία H₂O₂, οπότε σχηματίζεται ένα έγχρωμο σύμπλοκο, η ένταση του οποίου μετράται από το Cobas Amplicor σε ένα μήκος κύματος 660nm.

Ερμηνεία των αποτελεσμάτων της PCR

Χωρίς τη χρήση του Internal Control (IC):

- Όταν η τιμή της απορρόφησης του δείγματος (σε μήκος κύματος A 660) είναι <0,2, το αποτέλεσμα θεωρείται αρνητικό.
- Όταν η τιμή της είναι >ή = 0,8 το αποτέλεσμα θεωρείται θετικό.
- Τιμές απορρόφησης μεγαλύτερες ή ίσες του 0,2 και μικρότερες του 0,8 είναι η "γκρι ζώνη" και το αποτέλεσμα είναι αμφίβολο. Σ'αυτήν την περίπτωση συνιστάται επανάληψη του ίδιου δείγματος τουλάχιστον μια φορά. Όταν το αρχικό δείγμα και τουλάχιστον μια από τις επαναλήψεις του έχει τιμή μεγαλύτερη ή ίση από 0,2 θεωρείται θετικό για C. trachomatis.

Με την ταυτόχρονη ενίσχυση του Internal Control (IC):

- Όταν η τιμή της απορρόφησης του δείγματος (A 660) είναι <0,2 και το IC ενισχύεται επιτυχώς (A 660 μεγαλύτερη ή ίση του 0,2) το αποτέλεσμα θεωρείται αρνητικό.
- Όταν η τιμή της απορρόφησης του δείγματος (σε μήκος κύματος A 660) είναι <0,2 και το IC δεν ενισχύεται επιτυχώς (A 660 <0,2) το αποτέλεσμα θεωρείται αμφίβολο και συνιστάται επανάληψη του ίδιου ή ενός καινούργιου δείγματος.
- Όταν η τιμή της απορρόφησης του δείγματος (A 660) είναι μεγαλύτερη ή ίση του 0,8 το αποτέλεσμα θεωρείται θετικό, ανεξάρτητα από το αποτέλεσμα του IC.
- Όταν η τιμή της απορρόφησης του δείγματος (A 660) είναι στη "γκρι ζώνη" συνιστάται επανάληψη του δείγματος 2 φορές. Για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων αυτών ορίζεται ως τιμή του cut-off το 0,2. Οπότε αν τα 2/3 των αποτελεσμάτων του συγκεκριμένου δείγματος έχουν τιμή μεγαλύτερη ή ίση του 0,2, το δείγμα θεωρείται θετικό για C.trachomatis, ανεξάρτητα από την επιτυχή ή όχι ενίσχυση του IC. Αν τα 2/3 των αποτελεσμάτων του συγκεκριμένου δείγματος έχουν τιμή απορρόφησης μικρότερη του 0,2 και το IC ενισχύεται επιτυχώς, το δείγμα θεωρείται αρνητικό, ενώ αν το IC δεν ενισχύεται επιτυχώς, το αποτέλεσμα θεωρείται αναξιόπιστο.



Για την πρόληψη των επιμολύνσεων των δειγμάτων, ιδίως από αέρος, ακολουθήθηκαν αυστηρά οι εξής διαδικασίες:

- Η προετοιμασία/επεξεργασία των δειγμάτων γινόταν σε διαφορετική περιοχή (Area 1: Laminar flow) από την περιοχή όπου γινόταν η ενίσχυση του DNA (Area 2), ενώ η φάση ανίχνευσης, ειδικά για την PCR, πραγματοποιούνταν σε διαφορετικό δωμάτιο (Area 3).
- Οι πιπέτες και τα ρύγχη διέθεταν ειδικά φίλτρα (aerosol barriers) για να αποφευχθούν οι από αέρος επιμολύνσεις. Στις περιοχές 1 και 2 χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές πιπέτες και ρύγχη και αποφεύγονταν η μεταφορά υλικών και εξοπλισμού μεταξύ αυτών των περιοχών.
- Όλες οι περιοχές και τα υλικά που χρησιμοποιούνταν απολυμαίνονταν με χλωρίνη μετά την ολοκλήρωση της επεξεργασίας και ακολούθως με οινόπνευμα 70%, μέχρι που τα υπολείμματα της χλωρίνης να μην ήταν πλέον ορατά.

2.3. Εξωτερικός ποιοτικός έλεγχος

Ο έλεγχος της ευαισθησίας και της ειδικότητας της τεχνικής PCR Cobas Amplicor στην ανίχνευση των *C. trachomatis* επιτεύχθηκε με τη συμμετοχή μας σε ένα κοινό αποδεκτό πρόγραμμα της Ευρωπαϊκής Ένωσης για τον ποιοτικό έλεγχο των εφαρμοζόμενων μεθόδων πολλαπλασιασμού του νουκλεϊκού οξέος στη Διαγνωστική Ιολογία (European Union Quality Concerted Action of Nucleic Acid Amplification in Diagnostic Virology, EU - QCCA).

Σκοπός αυτής της Ευρωπαϊκής Επιτροπής ήταν να εκτιμήσει την ικανότητα των εργαστηρίων που συμμετείχαν, να ανιχνεύουν *C. trachomatis* με μοριακές μεθόδους.

Στο πρόγραμμα αυτό, που πραγματοποιήθηκε τον Αύγουστο του 2000, συμμετείχαν 105 εργαστήρια από 22 χώρες, από όλον τον κόσμο.

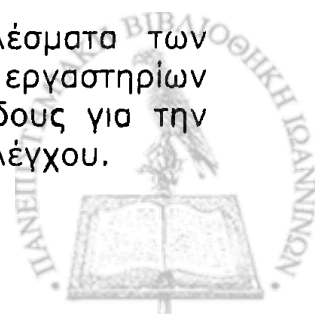
Καθώς οι μοριακές μέθοδοι απαιτούν ειδικό υλικό μεταφοράς ο έλεγχος έγινε σε 10 κωδικοποιημένα δείγματα λυοφιλοποιημένων ούρων, θετικών και αρνητικών για *C. trachomatis*, σε συνδυασμό με ένα ερωτηματολόγιο σχετικό με τις διαγνωστικές μεθόδους που εφαρμόστηκαν. Η σύνθεση των δειγμάτων ήταν τέτοια ώστε να αντιπροσωπεύονται κλινικά δείγματα από συμπτωματικούς και ασυμπτωματικούς μολυσμένους ασθενείς. (Πίνακας: 6)

Μεταξύ των δειγμάτων ήταν 3 αρνητικά δείγματα, 2 ισχυρώς θετικά για *C. trachomatis* και 5 δείγματα ασθενώς θετικά για *C. trachomatis*. Η συγκέντρωση των *C. trachomatis* στα ασθενώς θετικά δείγματα αντιπροσώπευε δείγματα ασυμπτωματικών ασθενών. Η συγκέντρωση των *C. trachomatis* σ'αυτά ήταν περίπου 10 φορές το όριο ανίχνευσης των πιο συνηθισμένων μοριακών μεθόδων που εφαρμόζονται σήμερα για την ανίχνευση των *C. trachomatis*.

Ισχυρώς θετικά θεωρήθηκαν τα θετικά δείγματα ούρων μετά από αραιώση 1:100. Ασθενώς θετικά θεωρήθηκαν τα θετικά δείγματα ούρων μετά από αραιώση με τα αρνητικά δείγματα ούρων.

Μεταξύ των 105 εργαστηρίων που συμμετείχαν, το 43,1% εφάρμοσε την Cobas Amplicor PCR, το 30,4% την LCx, 8,8% την Amplicor PCR, 8,8% in-house PCR, 4,9% BD Probe Tec ET και 3,9% την TMA.

Η μελέτη των δειγμάτων ήταν «τυφλή» και τα αποτελέσματα των εργαστηρίων που συμμετείχαν συγκρίθηκαν με τα αποτελέσματα εργαστηρίων αναφοράς, τα οποία χρησιμοποίησαν διαφορετικές μοριακές μεθόδους για την εξαγωγή των αποτελεσμάτων, πριν τη διανομή των προγραμμάτων ελέγχου.



Αναλύοντας τα αποτελέσματα συνολικά από όλα τα εργαστήρια που συμμετείχαν, υψηλότερη ευαισθησία έδωσε η BD Probe Tec ET (98% σωστά αποτελέσματα) παρότι ο αριθμός των εργαστηρίων που την εφάρμοζε ήταν πολύ μικρός.

Οι δυο μοριακές τεχνικές της Roche (Amplacor PCR – 95,6% σωστά αποτελέσματα και Cobas Amplacor PCR – 97% σωστά αποτελέσματα) και η Abbott LCx (94,8%) έδωσαν παρόμοια αποτελέσματα ($p = 0,48$)

Η μοριακή τεχνική GenProbe TMA έδωσε 92,5% σωστά αποτελέσματα, διότι μόνο το 85% των αποτελεσμάτων των ασθενώς θετικών δειγμάτων είχαν απαντηθεί σωστά.

Τα εργαστήρια που εφάρμοζαν την "in-house" PCR είχαν τα χαμηλότερα ποσοστά σωστών αποτελεσμάτων (88,6%).

Τα δείγματα ελέγχθηκαν στο εργαστήριό μας με την τεχνική Cobas Amplacor PCR. Από την επεξεργασία των αποτελεσμάτων διαπιστώθηκε ότι όλα τα αποτελέσματα ήταν σωστά και δεν ανιχνεύθηκαν αναστολείς με την PCR.

Πίνακας 6: Συγκριτικά αποτελέσματα ποιοτικού ελέγχου της EU - QCCA για *C.trachomatis*.

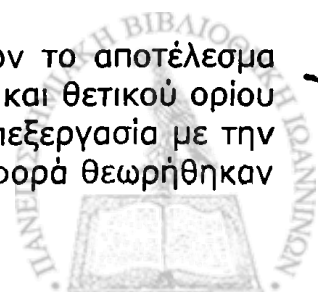
A/ α δείγματος	Περιεχόμενο δείγματος	Αναμενόμενο αποτέλεσμα	Αποτέλεσμα με την PCR
1	Ισχυρώς θετικό	Θετικό	Θετικό
2	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό
3	Ασθενώς θετικό	Θετικό	Θετικό
4	Ισχυρώς θετικό	Θετικό	Θετικό
5	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό
6	Ασθενώς θετικό	Θετικό	Θετικό
7	Ασθενώς θετικό	Θετικό	Θετικό
8	Ασθενώς θετικό	Θετικό	Θετικό
9	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό
10	Ασθενώς θετικό	Θετικό	Θετικό

2.4. Επεξεργασία δεδομένων

Τα αποτελέσματα της PCR συγκρίνονταν με αυτά της κυτταροκαλλιέργειας. Ένας ασθενής θεωρήθηκε μολυσμένος εάν τουλάχιστον ένα είδος δείγματος, επίχρισμα ή ούρα, έδωσε θετικό αποτέλεσμα με μια από τις ανωτέρω μεθόδους. Ειδικότερα, λοίμωξη από *C. trachomatis* θεωρήθηκε ότι έχουν οι ασθενείς στις εξής περιπτώσεις:

- Όταν η καλλιέργεια ήταν θετική.
- Όταν η καλλιέργεια ήταν αρνητική και η PCR σε ένα τουλάχιστον είδος δείγματος, ούρα ή επίχρισμα, ήταν θετική.

Αμφίβολα με την PCR θεωρήθηκαν τα δείγματα των οποίων το αποτέλεσμα ήταν στην «γκρι ζώνη» της PCR, δηλαδή μεταξύ του αρνητικού και θετικού ορίου της. Αυτά τα δείγματα επιβεβαιώθηκαν μετά από μια δεύτερη επεξεργασία με την PCR: αμφίβολα δείγματα τα οποία βρέθηκαν θετικά τη δεύτερη φορά θεωρήθηκαν «αληθώς θετικά».



Με βάση τα παραπάνω κριτήρια υπολογίσθηκε η ευαισθησία και η ειδικότητα των μεθόδων.

Έγινε επίσης μια πολυπαραγοντική ανάλυση των παραγόντων κινδύνου που θα μπορούσαν να συσχετίζονται με χλαμυδιακή λοίμωξη.

Επιπρόσθετα, προσδιορίσθηκε η στατιστική σημαντικότητα με βάση το χ^2 και τη διόρθωση κατά Yates. Τιμές $P < 0.05$ θεωρήθηκαν ως στατιστικά σημαντικές.



3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Πληθυσμός ασθενών.

Συνολικά ελέγχθηκαν για *C.trachomatis* 3,340 ασθενείς, σε δείγματα από το ουροποιογεννητικό σύστημα, από τον Οκτώβριο του 1998 ως το Μάιο του 2004. Από αυτούς 3,098 ήταν γυναίκες ηλικίας 18 έως 55 ετών και 242 άνδρες ηλικίας 18 έως 65 ετών. Αυτός ο αριθμός ασθενών ήταν ο τελικός, μετά τον αποκλεισμό 50 ασθενών (47 γυναικών και 3 ανδρών) οι οποίοι δεν πληρούσαν τα απαραίτητα κριτήρια για να συμπεριληφθούν στην παρούσα μελέτη.

Επιπλέον, σε 86 παιδιά και ενήλικες με εικόνα επιπεφυκίτιδας, αναζητήθηκαν *C.trachomatis*.

3.2. Αποτελέσματα της αναζήτησης *C.trachomatis* στις γυναίκες.

Συνολικά, σε 62 (2%) από τις 3,098 γυναίκες ανιχνεύθηκαν *C.trachomatis*. 40 συμπτωματικές (4,3%) και 22 ασυμπτωματικές (1,0%) γυναίκες βρέθηκαν να είναι μολυσμένες με *C.trachomatis* (Πίνακας 7).

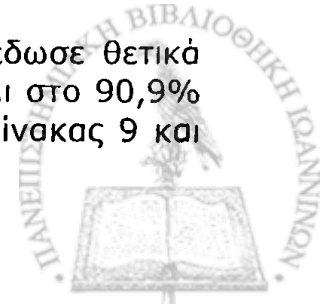
Συνολικά, σε 53 από τις 62 (85,5%) μολυσμένες γυναίκες ανιχνεύθηκαν *C.trachomatis* και στο ενδοτραχηλικό επίχρισμα και στα ούρα. Σε 5 από τις 62 (8%) μολυσμένες γυναίκες ανιχνεύθηκαν *C.trachomatis* μόνο στο τραχηλικό επίχρισμα και σε 4 από τις 62 (6,5%) μολυσμένες γυναίκες ανιχνεύθηκαν *C.trachomatis* μόνο στα ούρα (Πίνακας 8).

Επιπλέον, *C.trachomatis* ανιχνεύθηκαν και στα δυο είδη δειγμάτων σε 35 από τις 40 συμπτωματικές γυναίκες με λοίμωξη, μόνο στο τραχηλικό επίχρισμα σε 3 από τις 40 συμπτωματικές γυναίκες και σε 2 από τις 40 μόνο στο δείγμα ούρων (Πίνακας 9).

Από 22 ασυμπτωματικές γυναίκες με λοίμωξη, *C.trachomatis* ανιχνεύθηκαν και στα δυο είδη δειγμάτων σε 18, μόνο στο τραχηλικό επίχρισμα σε 2 γυναίκες και μόνο στο δείγμα ούρων σε 2 (Πίνακας 10).

Και τα δύο είδη δειγμάτων ήταν αρνητικά για τις 889 από τις 929 συμπτωματικές, μη μολυσμένες γυναίκες, καθώς και για τις 2.147 από τις 2.169 ασυμπτωματικές, μη μολυσμένες γυναίκες.

- 1. Ενδοτραχηλικά επιχρίσματα.** Συνολικά, με την PCR ανιχνεύθηκαν *C.trachomatis* στο τραχηλικό επίχρισμα 58/62 (93,5%) γυναικών με λοίμωξη και σε δείγματα ούρων 57/62 (91,9%) γυναικών με λοίμωξη. Ειδικότερα, η εφαρμογή της PCR στα τραχηλικά επιχρίσματα έδωσε θετικά αποτελέσματα στο 95% (38 από τα 40) των συμπτωματικών και στο 90,9% (20 από τα 22) των ασυμπτωματικών, μολυσμένων γυναικών (Πίνακας 9 και 10). Η εφαρμογή της PCR στα τραχηλικά επιχρίσματα είχε ελαφρώς μεγαλύτερη ευαισθησία στις συμπτωματικές από τις ασυμπτωματικές γυναίκες. Από τις 40 συμπτωματικές γυναίκες με *C.trachomatis*, οι 26 βρέθηκαν θετικές με καλλιέργεια (65%), ενώ από τις 22 ασυμπτωματικές οι 12 βρέθηκαν θετικές με καλλιέργεια (55%). Επί του συνόλου των γυναικών, η καλλιέργεια είχε ευαισθησία 61%, ανιχνεύοντας 38 από τις 62 μολυσμένες γυναίκες (Πίνακας 7).
- 2. Δείγματα ούρων.** Η εφαρμογή της PCR στα δείγματα ούρων έδωσε θετικά αποτελέσματα στο 92,5% (37 από τα 40) των συμπτωματικών και στο 90,9% (20 από τις 22) των ασυμπτωματικών, μολυσμένων γυναικών (Πίνακας 9 και



10). Η εφαρμογή της PCR στα δείγματα ούρων είχε ελαφρώς μεγαλύτερη ευαισθησία στις συμπτωματικές από τις ασυμπτωματικές γυναίκες.

Δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των αποτελεσμάτων των ενδοτραχηλικών επιχρισμάτων και των δειγμάτων ούρων για την ανίχνευση των *C.trachomatis* τόσο σε συμπτωματικές, όσο και σε ασυμπτωματικές, μολυσμένες γυναίκες ($P > 0,1$ με chi-square test).

3.3. Αποτελέσματα της αναζήτησης *C.trachomatis* στους άνδρες.

Χλαμυδιακή λοίμωξη ανιχνεύθηκε σε 13 από τους 207 συμπτωματικούς άνδρες (6,3%), ενώ δεν ανιχνεύθηκε σε κανέναν από τους 35 ασυμπτωματικούς άνδρες (Πίνακας 7).

C. trachomatis ανιχνεύθηκαν μόνο στο ουρηθρικό επίχρισμα σε έναν από τους 13 συμπτωματικούς μολυσμένους άνδρες. Στους υπόλοιπους 12 συμπτωματικούς μολυσμένους άνδρες *C. trachomatis* ανιχνεύθηκαν και στο ουρηθρικό επίχρισμα και στο δείγμα ούρων (Πίνακας 11).

Και τα δύο είδη δειγμάτων ήταν αρνητικά στους 194 από τους 207 συμπτωματικούς άνδρες, καθώς και σε όλους τους ασυμπτωματικούς, μη μολυσμένους άνδρες.

- 1) **Ουρηθρικά επιχρίσματα:** Η εφαρμογή της PCR στα ουρηθρικά επιχρίσματα έδωσε θετικά αποτελέσματα στο 100% (13 από τα 13) των συμπτωματικών, μολυσμένων ανδρών, ενώ η καλλιέργεια ήταν θετική σε 9 από τα 13 δείγματα (71%).
- 2) **Δείγματα ούρων.** Η εφαρμογή της PCR στα δείγματα ούρων έδωσε θετικά αποτελέσματα στο 92,3% (12 από τα 13) των συμπτωματικών, μολυσμένων ανδρών.

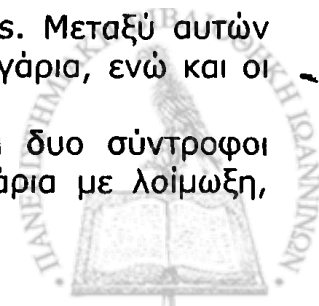
Δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των αποτελεσμάτων των ουρηθρικών επιχρισμάτων και των δειγμάτων ούρων για την ανίχνευση των *C.trachomatis* σε συμπτωματικές, μολυσμένους άνδρες. ($P > 0,05$ με chi-square test).

Από την παρούσα μελέτη δεν προέκυψαν ψευδώς θετικά αποτελέσματα με τη PCR. Μ' άλλα λόγια, δεν βρέθηκαν επιχρίσματα στα οποία να απομονώθηκαν *C.trachomatis* με την καλλιέργεια και στα οποία η PCR να έδωσε αρνητικό αποτέλεσμα.

3.4. Αποτελέσματα της αναζήτησης *C.trachomatis* σε σεξουαλικούς συντρόφους.

Στη μελέτη μας ελέγχθηκαν 145 ζευγάρια για *C.trachomatis*. Μεταξύ αυτών ένας τουλάχιστον σύντροφος βρέθηκε θετικός σε 7 (4,8%) ζευγάρια, ενώ και οι δύο σύντροφοι βρέθηκαν θετικοί σε 2 (1,4%) ζευγάρια.

Από τα 7 ζευγάρια με λοίμωξη από *C.trachomatis* και οι δύο σύντροφοι βρέθηκαν θετικοί σε 2 (28,5%). Σε 4 από τα 7 (57%) ζευγάρια με λοίμωξη,



C.trachomatis ανιχνεύθηκαν μόνο στους άνδρες, ενώ σε 1 (14%) ζευγάρι ανιχνεύθηκαν μόνο στη γυναίκα (Πίνακας 12).

Συνολικά, από τα 7 ζευγάρια με λοίμωξη, *C.trachomatis* ανιχνεύθηκαν σε 6 από τους 7 (85%) άνδρες και σε 3 από τις 7 (43%) γυναίκες. Υπάρχει επομένως μια σημαντική στατιστική διαφορά μεταξύ των ζευγαριών στα οποία οι άνδρες βρέθηκαν θετικοί έναντι των ζευγαριών στα οποία οι γυναίκες ήταν θετικές ($P < 0.05$).

Όλοι οι άνδρες και οι γυναίκες των ζευγαριών με *C.trachomatis* είχαν θετικά δείγματα ούρων και επιχρίσματα.

3.5. Δημογραφικές πληροφορίες και παράγοντες κινδύνου συμπεριφοράς των ασθενών με *C. trachomatis*.

Οι περισσότεροι μεταξύ των ασθενών με *C.trachomatis* (88%) ήταν νεαροί (κάτω των 30 ετών) (66 από τους 75) (Πίνακας 13). Μελετώντας τους παράγοντες κινδύνου συμπεριφοράς, το 24% των εξετασθέντων ανέφερε καινούργιο σεξουαλικό σύντροφο τον τελευταίο χρόνο (802 από τους 3,340) ενώ στο 15% από αυτούς ανιχνεύθηκαν *C.trachomatis* (120 από τους 802). Επίσης, το 20% των εξετασθέντων ανέφερε περισσότερους από έναν σεξουαλικούς συντρόφους τον τελευταίο χρόνο (668 από τους 3,340), ενώ στο 14% από αυτούς ανιχνεύθηκαν *C.trachomatis* (94 από τους 668). Η χλαμυδιακή λοίμωξη συσχετίστηκε με υποκειμενικά συμπτώματα πιο συχνά στους άνδρες (11,6%) από ότι στις γυναίκες (4,1%).

Στις γυναίκες *C.trachomatis*, *Gardnerella vaginalis* ανιχνεύθηκε στο 63% αυτών, *Candida* στο 9,7% και *Trichomonas vaginalis* στο 1,6%. Καμία γυναίκα δεν βρέθηκε να έχει συν-λοίμωξη από *C.trachomatis* και *Neisseria gonorrhoeae*, ή και HPV. Στο 25,7% των μολυσμένων γυναικών τα *C.trachomatis* ήταν ο μόνος λοιμογόνος παράγοντας που ανιχνεύθηκε.

Neisseria gonorrhoeae ανιχνεύθηκε σε έναν συμπτωματικό άνδρα με *C.trachomatis* (7,7%). Στο 92,3% των μολυσμένων ανδρών τα *C.trachomatis* ήταν ο μόνος λοιμογόνος παράγοντας που ανιχνεύθηκε. 2 συμπτωματικοί άνδρες με *C.trachomatis* βρέθηκε να έχουν σύνδρομο Reiter.

3.5. Αποτελέσματα της αναζήτησης *C.trachomatis* στα οφθαλμικά επιχρίσματα.

C.trachomatis ανιχνεύθηκαν σε 3 (3,5%) από τους 86 ασθενείς (70 ενήλικες και 16 παιδιά) με επιπεφυκίτιδα. Πρόκειται για ένα παιδί ηλικίας 1,5 ετών, που προσήλθε στα εξωτερικά ιατρεία της Οφθαλμολογικής Κλινικής και για δυο άνδρες, ηλικίας 20 - 30 ετών, με πλήρη εικόνα συνδρόμου Reiter: επιπεφυκίτιδα, αρθρίτιδα και ουρηθρίτιδα, που παραπέμφθηκαν από άλλο νοσοκομείο.

Η ανίχνευση των *C.trachomatis* έγινε με την PCR, ενώ η καλλιέργεια ήταν αρνητική σε όλες τις περιπτώσεις.



4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Οι περισσότερες από τις χλαμυδιακές λοιμώξεις είναι ασυμπτωματικές, με αποτέλεσμα να παραμένουν αδιάγνωστες και ως εκ τούτου αθεράπευτες. Αυτό μπορεί να οδηγήσει αφενός σε σοβαρές επιπλοκές και αφετέρου το «ρεζερβουάρ» της νόσου αποτελεί παράγοντα κινδύνου για την εξάπλωση των *Chlamydia trachomatis*, απειλώντας τη δημόσια υγεία. Έτσι η διάγνωση των *C. trachomatis* παραμένει "πρόκληση". Ένα από τα σημαντικότερα βήματα για την πρόληψη των χλαμυδιακών λοιμώξεων είναι η διάγνωση τους με αξιόπιστες εργαστηριακές μεθόδους.

Η καλλιέργεια έχει σχετικά χαμηλή ευαισθησία, δεν μπορεί να εφαρμοσθεί σε δείγματα ούρων, είναι εξαιρετικά επίπονη, τεχνικά δύσκολη και χρονοβόρα και απαιτεί ζωντανά κύτταρα με μεγάλο φορτίο *C. trachomatis* (Black, 1997). Επίσης, οι ανοσοενζυμικές μέθοδοι έχουν χαμηλές ευαισθησίες και ειδικότητες και ιδίως σε δείγματα ούρων (Black, 1997). Η ευαισθησία των μη μοριακών μεθόδων, όπως είναι οι ανοσοενζυμικές, ο ανοσοφθορισμός και οι probe τεχνικές, σε ενδοτραχηλικά επιχρίσματα, έχοντας την καλλιέργεια ως μέθοδο αναφοράς, κυμαίνεται μεταξύ 62% - 75% (Newhall et al., 1999).

Η εφαρμογή των μοριακών μεθόδων βελτίωσε σημαντικά την ικανότητα ανίχνευσης των *C. trachomatis* λόγω της υψηλής ευαισθησίας και ειδικότητάς τους, αλλά και λόγω της δυνατότητάς τους να εφαρμόζονται εξίσου καλά και σε μη επεμβατικά δείγματα, όπως τα ούρα, αλλά και σε κολπικά επιχρίσματα που μπορούν να συλλεχθούν από την ίδια την ασθενή. Ως εκ τούτου, θεωρούνται χρήσιμα μέσα για την εφαρμογή προγραμμάτων ελέγχου σε μεγάλες πληθυσμιακές ομάδες, στις οποίες η γυναικολογική εξέταση δεν είναι εφικτή (όπως: σχολεία, ιδρύματα, φυλακές), αλλά και για επιδημιολογικές έρευνες (CDC, 2002).

Οι μοριακές μέθοδοι κατά την ανίχνευση *C. trachomatis*, σε κάθε είδος δείγματος, έχουν μεγαλύτερη ευαισθησία από κάθε άλλη μη μοριακή μέθοδο (Black, 1997, Watson et al., 2002).

Επιπλέον, πολλές μελέτες και βιβλιογραφικές ανασκοπήσεις έχουν υποστηρίξει ότι οι μοριακές μέθοδοι είναι καλύτερες από τις άλλες εργαστηριακές μεθόδους για τη διάγνωση των συμπτωματικών και ασυμπτωματικών λοιμώξεων από *Chlamydia trachomatis* (Black, 1997, Stary, 1999, CDC, 2002, Watson et al., 2002).

Η παρούσα ερευνητική μελέτη εφάρμοσε τη **μοριακή μέθοδο PCR** και την **κυτταροκαλλιέργεια** για τη διάγνωση λοίμωξης από *C. trachomatis* σε άνδρες και γυναίκες, με ή χωρίς συμπτώματα, με σκοπό να προσδιοριστεί η συχνότητα των χλαμυδιακών λοιμώξεων στη Βορειοδυτική Ελλάδα.

Εφαρμόζοντας την **κυτταροκαλλιέργεια** για την ανίχνευση *C. trachomatis* σε επιχρίσματα από το ουροποιογεννητικό σύστημα, ανδρών και γυναικών, της περιοχής μας, διαπιστώσαμε τη χαμηλή ευαισθησία της, καθώς και την υψηλή ειδικότητά της. Η ευαισθησία της κυτταροκαλλιέργειας ήταν 61% για τα ενδοτραχηλικά επιχρίσματα συμπτωματικών και ασυμπτωματικών γυναικών και 71% για τα ουρηθρικά επιχρίσματα συμπτωματικών ανδρών. Αυτό παρατηρείται διότι, η κυτταροκαλλιέργεια των *C. trachomatis* είναι δύσκολη κατά την εκτέλεσή της και εξαρτάται άμεσα από την εμπειρία και την επιδεξιότητα του εργαστηρίου, γεγονός που της προσδίδει σχετικά χαμηλή ευαισθησία (50-80%) (Black, 1997).

Σε παρόμοια αποτελέσματα κατέληξαν και άλλες μεταγενέστερες μελέτες, σχετικά με τις χαμηλές ευαισθησίες της κυτταροκαλλιέργειας (40-80%) (Goessens et al., 1997, Pasternack et al., 1977, Schepetiuk et al., 1997, Gaydos et al., 1998, Puolakkainen et al., 1998, Vincelette et al., 1999) συγκριτικά με τις

υψηλές της Cobas Amplicor PCR σε τραχηλικά και ουρηθρικά επιχρίσματα (80-100%) (Chernesky et al., 1997, Pasternack et al., 1977, Beck-Safue et al., 1998, Steingrimsson et al., 1998).

Άλλες μελέτες, λιγότερες όμως σε αριθμό, υποστηρίζουν ότι η καλλιέργεια έχει την ίδια ευαισθησία με την PCR, σε επιχρίσματα ανδρών και γυναικών (87,5% και 93,3% αντιστοίχως), σε πληθυσμό υψηλού κινδύνου (Jensen et al., 2003). Σε όλες όμως τις περιπτώσεις διαπιστώνουμε ότι η ευαισθησία της καλλιέργειας επηρεάζεται εύκολα από παράγοντες που σχετίζονται άμεσα με την τεχνική (συλλογή, μεταφορά και επεξεργασία των δειγμάτων), αλλά και από εξωγενείς παράγοντες (χειριστές, είδος δείγματος, πληθυσμιακή ομάδα). Επιπλέον, δεν υπήρξαν μελέτες που να διαπίστωναν υπεροχή της ευαισθησίας της κυτταροκαλλιέργειας ως προς τις μοριακές μεθόδους.

Πρόσφατη ανασκοπική μελέτη (Fredlund et al., 2004) υποστηρίζει ότι η παράλληλη εφαρμογή δυο τεχνικών με διαφορετικούς ρυθμούς ταχύτητας και ευελιξίας, όπως η καλλιέργεια και οι μοριακές μέθοδοι (NAAT), παρουσιάζει δυσκολίες. Γι'αυτό, όταν πρόκειται να ελεγχθεί μεγάλος αριθμός δειγμάτων, είναι δυνατόν να εφαρμόζονται οι NAAT σε δείγματα ασθενών τοξικά στην κυτταροκαλλιέργεια, και η καλλιέργεια όταν κάποια επιχρίσματα είναι ανασταλτικά με τις μοριακές μεθόδους. Η κυτταροκαλλιέργεια μπορεί επίσης, να βοηθήσει μελλοντικά αν παρουσιαστεί ανάγκη, στον έλεγχο της αντίστασης των *C.trachomatis* στα αντιβιοτικά.

Η παράλληλη εφαρμογή δυο τεχνικών με διαφορετικές ευαισθησίες (καλλιέργεια - PCR) παρουσιάζει δυσκολίες ως προς την ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα των μοριακών τεχνικών με αυτά της καλλιέργειας, υπάρχει μεγάλη πιθανότητα να προκύψουν ψευδώς θετικά αποτελέσματα, λόγω της χαμηλής ευαισθησίας της καλλιέργειας και της υψηλής ευαισθησίας των μοριακών τεχνικών (CDC, 2002). Σ'αυτές τις περιπτώσεις τα αντιφατικά αποτελέσματα ελέγχονται με μια μοριακή μέθοδο με υψηλή ευαισθησία και με μια διαφορετική αλληλουχία-στόχο.

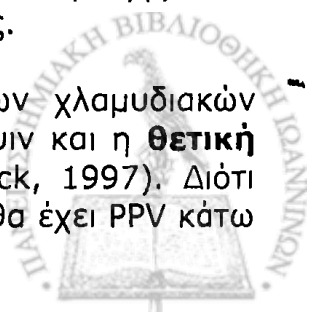
Στη μελέτη μας υπήρχε συμφωνία στα αποτελέσματα της καλλιέργειας και της PCR στα τραχηλικά και ουρηθρικά επιχρίσματα και δεν προέκυψαν αντιφατικά αποτελέσματα.

Οι Watson και συν. (2002), σε μια ανασκοπική μελέτη ασχολήθηκαν με την ακρίβεια και αποτελεσματικότητα των **μοριακών μεθόδων** ως 'screening-tests' για την ανίχνευση *C.trachomatis*. Αναλύοντας τα αποτελέσματα 30 μελετών από το 1990-1999, σε ασυμπτωματικούς, χαμηλού κινδύνου, σεξουαλικά ενεργούς νέους, διαπιστώθηκε ότι οι μοριακές μέθοδοι παρουσιάζουν υψηλές ειδικότητες και ευαισθησίες, που ποικίλλουν ανάλογα με τη μέθοδο και το είδος του δείγματος. Η PCR παρουσίαζε τη μεγαλύτερη ευαισθησία σε δείγματα ούρων και σε τραχηλικά επιχρίσματα (85,6% και 88,6% αντίστοιχα).

Από τη μελέτη αυτή προέκυψε ότι, οι λοιμώξεις από *C.trachomatis* είναι χαμηλής συχνότητας (<5%), ο πληθυσμός είναι κυρίως ασυμπτωματικός (66%) και νεαρής ηλικίας (88% <30 ετών).

Ειδικότερα, βρέθηκε ότι η συνολική συχνότητα της λοίμωξης από *C.trachomatis* ήταν 2% για τις γυναίκες και 5,4% για τους άνδρες.

Επειδή στον πληθυσμό μας η συχνότητα εμφάνισης των χλαμυδιακών λοιμώξεων είναι αρκετά χαμηλή, καλό είναι να λαμβάνεται υπόψιν και η **θετική προγνωστική αξία** (PPV) της μεθόδου που εφαρμόζουμε (Black, 1997). Διότι ακόμη και μια μέθοδο με ευαισθησία 95% και-ειδικότητα 99,5%, θα έχει PPV κάτω



από 90% όταν εφαρμόζεται σε πληθυσμό με συχνότητα εμφάνισης λοίμωξης κάτω του 4,5% (Vincelette et al., 1999).

Και άλλες πρόσφατες μελέτες ασχολήθηκαν με το πώς επηρεάζει τη διαγνωστική ικανότητα μιας μοριακής μεθόδου, η συχνότητα εμφάνισης των χλαμυδιακών λοιμώξεων. Κατέληξαν λοιπόν στο εξής: Ο αριθμός των ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων που μπορεί προκύψει από τη μελέτη ενός πληθυσμού χαμηλής συχνότητας με μια μοριακή μέθοδο, εξαρτάται από την **ειδικότητα** της μεθόδου. Συγκεκριμένα, πάνω από το 1/3 των θετικών αποτελεσμάτων θα είναι ψευδώς θετικά, αν η ειδικότητα της μεθόδου είναι κοντά στο 98%, και εφαρμοστεί σ'ένα πληθυσμό με χαμηλή συχνότητα εμφάνισης λοίμωξης (π.χ. 4%) (Johnson et al., 2002, Zenilman et al., 2003). Σε αυτές τις περιπτώσεις το CDC προτείνει την εφαρμογή μιας μεθόδου που να μπορεί να επιβεβαιώνει τα θετικά αποτελέσματα (Johnson et al., 2002).

Νεώτερα δεδομένα υποστηρίζουν ότι η επιβεβαιωτική μέθοδος πιθανόν δεν είναι απαραίτητη όταν η ειδικότητα μιας μεθόδου προσεγγίζει το 99,9% (Golden et al., 2004). Σύμφωνα με το CDC (2002), η ειδικότητα των NAATs κυμαίνεται από 99,0% - 99,5%, ενώ των μη μοριακών μεθόδων, όπως των ΕΙΑ, του DFA και των probe τεχνικών, κυμαίνεται από 94,1% - 99,5%.

Στα ανωτέρω έρχεται να προστεθεί η ανασκοπική μελέτη των Cook και συν., (2005). Αναλύοντας 14 μελέτες με PCR, μεταξύ 1994-2004, διαπιστώθηκε ότι η συνολική ευαισθησία και ειδικότητα της PCR ήταν 83,3% και 99,5% σε δείγματα ούρων γυναικών και 85,5% και 99,6% σε τραχηλικά επιχρίσματα, αντιστοίχως. Από τις 14 μελέτες, οι 12 μελέτησαν και ανδρικό πληθυσμό: η συνολική ευαισθησία και ειδικότητα της PCR ήταν 84% και 99,3% σε δείγματα ούρων ανδρών και 87,5% και 99,2% σε ουρηθρικά επιχρίσματα, αντιστοίχως.

Η συχνότητα της λοίμωξης εξαρτάται άμεσα από τον πληθυσμό που ελέγχεται, έτσι ώστε, δεν είναι δυνατό να γίνουν συγκρίσεις της συχνότητας των πληθυσμών, εκτός και αν εφαρμοσθούν κάποια κοινά κριτήρια-«standards» στον πληθυσμό που ελέγχεται.

Στις **γυναίκες**, η συχνότητα της λοίμωξης κυμαίνεται από 3% σε μια μελέτη στη Μεγάλη Βρετανία όπου συμμετείχαν γυναίκες στα πλαίσια μια εθνικής έρευνας, έως και 35% των γυναικών που προσέρχονταν σε κλινική οικογενειακού προγραμματισμού στην Τζαμάικα στις Δυτικές Ινδίες (Norman, 2002).

Στη χώρα μας, η συχνότητα των χλαμυδιακών λοιμώξεων στο γυναικείο πληθυσμό είναι σχετικά χαμηλή, ακόμα και ομάδες υψηλού κινδύνου. Από τη μελέτη 510 ασυμπτωματικών ιερόδουλων γυναικών που προσήλθαν στο νοσοκομείο «Α Συγγρός» για γυναικολογική εξέταση ρουτίνας, ανιχνεύθηκαν *C. trachomatis* στο 5,3%, ενώ όλες οι γυναίκες ήταν αρνητικές για άλλα σεξουαλικά μεταδιδόμενα νοσήματα και HIV.

Αντιθέτως, στον αναπτυσσόμενο κόσμο, η συχνότητα των *C. trachomatis* σε παρόμοια πληθυσμιακή ομάδα είναι αρκετά υψηλή. Από τη μελέτη 722 ιερόδουλων στη Σενεγάλη ανιχνεύθηκαν *C. trachomatis* στο 28,5% των γυναικών (Sturm-Ramirez et al., 2000). Τα αποτελέσματα αυτά ήταν αναμενόμενα διότι οι γυναίκες αυτές είχαν διάφορους παράγοντες κινδύνου για χλαμυδιακή λοίμωξη, όπως, μεγάλο αριθμό σεξουαλικών συντρόφων, συνυπάρχουσα σύφιλη ή γονοκοκκική λοίμωξη και HIV οροθετικότητα ή ορομετατροπή.



Σε **ανδρικό πληθυσμό υψηλού κινδύνου** (Vincelette et al., 1999, Van Doornum et al., 2001, Jensen et al., 2003), η συχνότητα των λοιμώξεων από *C. trachomatis* κυμαινόταν από 10% σε άνδρες που προσέρχονταν σε κλινική σεξουαλικών μεταδιδόμενων νοσημάτων στο Άμστερνταμ (Van Doornum et al., 2001), έως 14% σε άνδρες που επισκέπτονταν κλινική αφροδισίων και δερματολογικών νοσημάτων στην Κοπεγχάγη (Jensen et al., 2003).

Στην παρούσα μελέτη ο αριθμός των **ασυμπτωματικών ανδρών** που ελέγχθηκε για *C. trachomatis* ήταν πολύ μικρός, με αποτέλεσμα να μην έχουμε καμία πληροφορία σχετικά με τη συχνότητα της νόσου σ' αυτήν την πληθυσμιακή ομάδα. Η άρνηση των ανδρών να συμμετέχουν σε προγράμματα ελέγχου, καθώς και η μη τακτική επίσκεψη στο γιατρό για έλεγχο ρουτίνας, παρά μόνο όταν υπάρχουν υποκειμενικά συμπτώματα, είναι οι κυριότεροι λόγοι. Παρόμοιες προσπάθειες για 'screening' ασυμπτωματικών ανδρών έχουν συμπεριλάβει επίσης μικρό αριθμό εξεταζομένων (LaMontagne et al., 2003). Γι' αυτό η οι πληροφορίες σχετικά για την επιδημιολογία αυτής της ομάδας είναι περιορισμένες (Braverman et al., 1990, Domeika et al., 1994).

Η αδυναμία ανίχνευσης των ασυμπτωματικών χλαμυδιακών λοιμώξεων στους άνδρες, ιδιαίτερα σε πληθυσμούς με υψηλή συχνότητα, μπορεί να εμποδίσει τις προσπάθειες για τον περιορισμό των χλαμυδιακών λοιμώξεων στις γυναίκες, διότι αποτελούν το "ρεζερβουάρ" της νόσου (Marazzo et al., 1998).

Προηγούμενες μελέτες σε ασυμπτωματικούς άνδρες, στην Ευρώπη, έχουν δείξει ότι η συχνότητα της νόσου κυμαινόταν από 2,8% σε ασυμπτωματικούς νέους 19-21 χρονών στο Όσλο της Νορβηγίας, το 1994 (Anestad et al., 1995), μέχρι και 18,5% σε ασυμπτωματικούς άνδρες στη Σουηδία, το 1990 (Domeika et al., 1994).

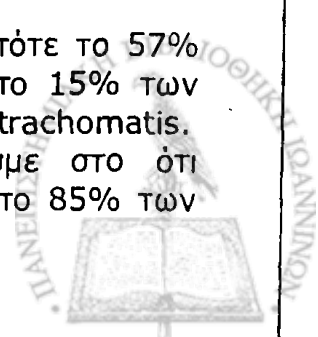
Στις ΗΠΑ, η συχνότητα των χλαμυδιακών λοιμώξεων στους ασυμπτωματικούς άνδρες κυμαινόταν από 4%, το 1997, σε κλινική σεξουαλικών μεταδιδόμενων νοσημάτων στο Σαν Φρανζίσκο (Ciernins et al., 2000), έως 6% σε νεαρούς άνδρες στο Σιατλ, το 1997 (Marrazzo et al., 1997). Πρόσφατες μελέτες καταλήγουν στο ίδιο συμπέρασμα: η συχνότητα των *C. trachomatis* σε ασυμπτωματικούς νεαρούς άνδρες κυμαίνεται από 3-5% (Kohl et al., 2004, Miller et al., 2004).

Σε μια πρόσφατη πολυκεντρική μελέτη στις ΗΠΑ (LaMontagne et al., 2003), στην οποία συμμετείχαν 103 κλινικές σεξουαλικών μεταδιδόμενων νοσημάτων, ελέγχθηκαν από το 1997 έως το 1999, 43.094 άνδρες. Από αυτούς, οι 24.337 ήταν ασυμπτωματικοί άνδρες, δηλαδή δεν ανέφεραν συμπτώματα ή σεξουαλική επαφή με υψηλού κινδύνου άτομο στο πρόσφατο παρελθόν, με συχνότητα ανίχνευσης *C. trachomatis* 3,4%. Από τους συμπτωματικούς άνδρες που είχαν και επαφή με υψηλού κινδύνου άτομο, *C. trachomatis* ανιχνεύθηκαν στο 50,8%, ενώ 21% των ανδρών που είχαν έναν από τους δυο παράγοντες κινδύνου (ή συμπτώματα, ή σεξουαλική επαφή) εμφάνισαν *C. trachomatis*.

Από τη μελέτη των **σεξουαλικών συντρόφων** προκύπτει ότι και οι δυο σύντροφοι είχαν λοίμωξη στο 28,5% (2 από τα 7 ζευγάρια). Σε παρόμοια αποτελέσματα καταλήγουν ο Clad και συν. (2001), διαπιστώνοντας λοίμωξη και στους δυο συντρόφους στο 35% των ζευγαριών με νόσο.

Αν η μελέτη μας περιοριζόταν μόνο σε δείγματα γυναικών, τότε το 57% των ζευγαριών με λοίμωξη θα παρέμενε αδιάγνωστο, ενώ μόλις το 15% των ζευγαριών θα ήταν αδιάγνωστο αν ελέγχονταν μόνο οι άνδρες για *C. trachomatis*.

Θέτοντας την παρατήρηση αυτή διαφορετικά, καταλήγουμε στο ότι ελέγχοντας τον ανδρικό πληθυσμό για *C. trachomatis* ανιχνεύουμε το 85% των



μολυσμένων ζευγαριών, ενώ ελέγχοντας το γυναικείο πληθυσμό ανιχνεύουμε μόλις το 43% των ζευγαριών με *C.trachomatis* (85% προς 43%, $p < 0.05$).

Σύμφωνα με τα παραπάνω, και οι άνδρες και οι γυναίκες σεξουαλικοί σύντροφοι θα πρέπει να ελέγχονται για *C.trachomatis* με τις μοριακές μεθόδους και με δείγματα ούρων και με επιχρίσματα.

Στην παρούσα μελέτη, διάφορα επιδημιολογικά στοιχεία, καθώς και αρκετά χαρακτηριστικά συμπεριφοράς συσχετίστηκαν με χλαμυδιακή λοίμωξη. Το ερωτηματολόγιο (Πίνακας 6) ήταν έτσι δομημένο ώστε αυτοί οι παράγοντες να προσεγγισθούν με τη μεγαλύτερη δυνατή συντομία και ακρίβεια.

Η **ηλικία** ήταν ένας σημαντικός παράγοντας, καθώς η πλειοψηφία των ανδρών και γυναικών με λοίμωξη από *C. trachomatis* (88%), συμπτωματικών και ασυμπτωματικών, ήταν νεαροί (κάτω των 30 ετών). Αυτή η παρατήρηση ήταν σε συμφωνία με τα συμπεράσματα άλλων μελετών που συσχέτισαν τη συχνότητα των χλαμυδιακών λοιμώξεων με την ηλικία (Morre et al., 1999, Mehta et al., 2001, Norman, 2002, LaMontagne et al., 2003, Westh et al., 2003). Η πιθανότητα εμφάνισης λοίμωξης στις νεαρές ηλικιακές ομάδες (κάτω των 25 ετών) είναι 5 έως 8 φορές μεγαλύτερη από τις μεγαλύτερες ηλικιακές ομάδες (άνω των 30-35 ετών) (Grun et al., 1997).

Παρόλα αυτά, το 12% των ασθενών μας με *C. trachomatis* ήταν άνω των 30 ετών. Αυτό κάνει φανερό ότι, εάν κατά τον έλεγχο του πληθυσμού λαμβάνεται υπόψιν ως το μοναδικό κριτήριο το νεαρό της ηλικίας, υπάρχει κίνδυνος να παραμείνει αδιάγνωστος ένας σημαντικός αριθμός χλαμυδιακών λοιμώξεων που συναντάμε σε μεγαλύτερες ηλικιακά ομάδες.

Αναφορικά με τους **σεξουαλικούς συντρόφους**, το 70,7% των ανδρών και γυναικών με *C.trachomatis* ανέφερε περισσότερους από έναν σεξουαλικούς συντρόφους τον τελευταίο χρόνο (53 από τους 75) και το 90,7% ανέφερε καινούργιο σεξουαλικό σύντροφο τον τελευταίο χρόνο (68 από τους 75).

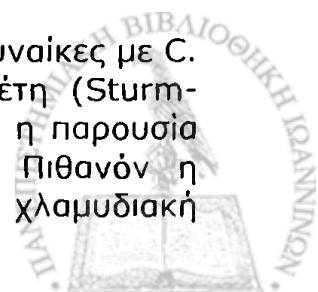
Όπως προκύπτει και από άλλες μελέτες, η επαφή με καινούργιο ή πολλαπλούς σεξουαλικούς συντρόφους στο πρόσφατο παρελθόν αποτελεί ένα σημαντικό παράγοντα κινδύνου για λοίμωξη από *C. trachomatis*, ακόμα και όταν ελέγχονται άλλοι παράγοντες, όπως η ηλικία (Mehta et al., 2001, Jensen et al., 2003, LaMontagne et al., 2003).

Η πιθανότητα εμφάνισης λοίμωξης από *C. trachomatis* είναι σημαντικά μεγαλύτερη στις γυναίκες που αναφέρουν επαφή με 2 ή περισσότερους συντρόφους τον τελευταίο χρόνο (έως και 3 φορές μεγαλύτερη από τις γυναίκες με έναν μόνο σεξουαλικό σύντροφο τον τελευταίο χρόνο (Fenton et al., 2001, Grun et al., 1997, Burstein et al., 2001, Todd et al., 2001) ή τις τελευταίες 90 ημέρες (έως και 1,4 φορές περισσότερο) (Gaydos et al., 1998) συγκριτικά με γυναίκες που είχαν έως και ένα σεξουαλικό σύντροφο την ίδια χρονική περίοδο.

Μελετώντας την πιθανότητα **συν-λοίμωξης** με άλλους μικροοργανισμούς, *Gardnerella vaginalis* απομονώθηκε σε ένα μεγάλο αριθμό γυναικών με *C.trachomatis* (63%). Η παρατήρηση αυτή είναι σε συμφωνία με μια μελέτη των Ruggao και συν. (Ruggao et al., 1993).

Συν-λοίμωξη με *Neisseria gonorrhoeae* ταυτοποιήθηκε σε πολύ μικρότερο αριθμό ασθενών από αυτόν που αναφέρουν άλλοι μελετητές (Palladino et al., 1999).

Επίσης, η παρουσία μυκήτων ήταν αρκετά μικρή (9,7%) στις γυναίκες με *C. trachomatis*. Στην ίδια παρατήρηση καταλήγει μια πρόσφατη μελέτη (Sturm-Ramirez et al., 2000) σε 722 ιερόδουλες στη Σενεγάλη, στις οποίες η παρουσία μυκήτων συσχετίστηκε με χαμηλό κίνδυνο για *C. trachomatis*. Πιθανόν η υπερανάπτυξη των μυκήτων στο γεννητικό σύστημα να αναστέλλει τη χλαμυδιακή



λοιμώξη ή εμμέσως να εμποδίζει την ανάπτυξή τους μετατρέποντας το γεννητικό περιβάλλον σε αφιλόξενο γι'αυτά. Ακόμη είναι πιθανό, η πρόσφατη χρήση αντιμυκητιασικών φαρμάκων να επηρεάζει την ισορροπία της φυσιολογικής χλωρίδας, περιορίζοντας ή ακόμα και εξαλείφοντας τη χλαμυδιακή λοίμωξη.

Στην παρούσα μελέτη, σε συμπτωματικούς και ασυμπτωματικούς ασθενείς, η ευαισθησία αναζήτησης *C. trachomatis* ήταν ελαφρώς χαμηλότερη στα δείγματα ούρων από ότι στα ενδοτραχηλικά και ουρηθρικά επιχρίσματα (Πίνακες: 8-11).

Αρκετές πρόσφατες μελέτες ασχολήθηκαν με το ρόλο που παίζει **το είδος και ο αριθμός των δειγμάτων** στην ευαισθησία των μοριακών μεθόδων.

Αναφέρουν λοιπόν ότι, οι μοριακές μέθοδοι έχουν μεγαλύτερη ευαισθησία όταν εφαρμόζονται σε επιχρίσματα (τραχηλικά ή ουρηθρικά), παρά σε δείγματα ούρων (Vincelette et al., 1999, Van der Pol et al., 2000, Van Doornum et al., 2001, Black et al., 2002, Watson et al., 2002). Σύμφωνα με αναφορά του CDC για τα *C. trachomatis*, το 2002, η ευαισθησία της μεθόδου Cobas Amplicor ήταν λίγο χαμηλότερη σε δείγματα ούρων σε σχέση με ενδοτραχηλικά επιχρίσματα (83,4% προς 91,4%) (CDC, 2002).

Ο Cook και συν., (2005), αναλύοντας τα αποτελέσματα μελετών που έγιναν από το 1994 έως το 2004, σε γυναικείο πληθυσμό, με 3 μοριακές μεθόδους: PCR, TMA και SDA, διαπίστωσαν ότι είχαν ευαισθησία: 83,3%, 92,5% και 79,9% σε δείγματα ούρων και 85,5%, 96,7% και 93,6% σε τραχηλικά επιχρίσματα, αντιστοίχως. Παρόμοια ήταν η ευαισθησία των 3 μοριακών μεθόδων και στον ανδρικό πληθυσμό: 84,0%, 87,7% και 93,1% σε δείγματα ούρων και 87,5%, 95,9% και 92,4% σε ουρηθρικά επιχρίσματα. Κατέληξαν λοιπόν στο ότι η ευαισθησία και η ειδικότητα και των 3 διαθέσιμων εμπορικά, μοριακών μεθόδων, σε μη επεμβατικά δείγματα (ούρα), είναι σχεδόν ίδιες με εκείνες των επεμβατικών δειγμάτων (επιχρίσματα). Τα αποτελέσματα αυτά ήταν ίδια σε γυναίκες και άνδρες και δεν διέφεραν από την παρουσία ή όχι συμπτωμάτων.

Όταν εξετάστηκαν δύο είδη δειγμάτων από κάθε ασθενή, σε μερικούς ασθενείς προέκυπτε θετικό αποτέλεσμα μόνο στο ένα είδος δείγματος. Γι'αυτό, ο συνολικός αριθμός των χλαμυδιακών λοιμώξεων που ανιχνεύθηκε ήταν μεγαλύτερος από τον αριθμό που θα προέκυπτε εάν μόνο ένα είδος δείγματος είχε ελεγχθεί. Έτσι, η ευαισθησία κάθε είδους δείγματος ήταν πιο ελεγχόμενη, αλλά επίσης και πιο ρεαλιστική, από την ευαισθησία που θα προέκυπτε εάν απουσίαζε το αποτέλεσμα του δεύτερου δείγματος.

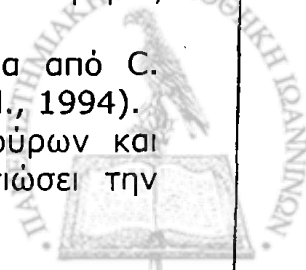
Στην παρούσα μελέτη, ο ταυτόχρονος έλεγχος και των δυο ειδών δειγμάτων με την PCR, σε άνδρες και γυναίκες, αύξησε το ποσοστό ανίχνευσης των χλαμυδιακών λοιμώξεων κατά μέσο όρο 7,5%.

Παρόμοια αποτελέσματα έδειξε πρόσφατη μελέτη (Jensen et al., 2003), στην οποία διαπιστώθηκε ότι όταν ελέγχονταν και ένα δείγμα ούρων, παράλληλα με το επίχρισμα, το ποσοστό ανίχνευσης *C. trachomatis* αυξανόταν κατά 9%. Υποστήριξε κατ'αυτόν τον τρόπο ότι ο ιδανικότερος τρόπος για τη διάγνωση λοίμωξης από *C. trachomatis* είναι η προσθήκη ενός δείγματος ούρων, παράλληλα με το επίχρισμα και όχι η αντικατάσταση του επιχρίσματος από το δείγμα ούρων.

Η ευαισθησίας της καλλιέργειας κατά την αναζήτηση *C. trachomatis* σε ενδοτραχηλικά επιχρίσματα μπορεί να αυξηθεί 23% εάν στο ίδιο υλικό μεταφοράς προστεθεί ταυτόχρονα και ουρηθρικό επίχρισμα (Jones et al., 1986).

Σε άλλες μελέτες, το ποσοστό των γυναικών με ουρηθρίτιδα από *C. trachomatis* και αρνητικό τραχηλικό επίχρισμα φτάνει το 30% (Hay et al., 1994).

Πρόσφατες μελέτες έχουν επίσης καταλήξει ότι η συλλογή ούρων και επιχρισμάτων και ο έλεγχός τους σε συνδυασμό, μπορεί να βελτιώσει την



αποτελεσματικότητα της μεθόδου και να ανιχνεύσει όλους τους μολυσμένους ασθενείς (π.χ. τα αποτελέσματα των μολυσμένων ασθενών μπορούν να αποτελέσουν το "gold standard") (Vincelette et al., 1999, Black et al., 2002).

Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων παρατηρήθηκε μια ελαφρώς μεγαλύτερη ευαισθησία της PCR στα δείγματα συμπτωματικών γυναικών (95%) σε σχέση με τα δείγματα ασυμπτωματικών γυναικών (91%). Παρόμοια αποτελέσματα είχε μια παρόμοια μελέτη (Van der Pol et al., 2000), η οποία αξιολογούσε την μέθοδο Cobas AmpliCor PCR, συγκρίνοντάς την με την κυτταροκαλλιέργεια. Σ'αυτήν τη μελέτη ελέγχθηκαν 2,236 γυναίκες και 1,940 άνδρες, συμπτωματικοί και μη, και ανιχνεύθηκαν *C. trachomatis* σε 2,4% και 7,2% των γυναικών και ανδρών, αντιστοίχως. Η συχνότητα της λοίμωξης ήταν ελαφρώς χαμηλότερη στις ασυμπτωματικές γυναίκες και άνδρες σε σχέση με τους συμπτωματικούς. Οι μοριακές μέθοδοι και ιδιαίτερα η PCR, εφαρμόζονται καλύτερα σε συμπτωματικό πληθυσμό, υψηλού κινδύνου, πιθανόν λόγω της ύπαρξης μεγαλύτερου αριθμού σωματιδίων *C. trachomatis* στα δείγματα που ελέγχονται.

Συμπερασματικά:

1. Η συχνότητα των ουρογεννητικών λοιμώξεων από *Chlamydia trachomatis*, που προέκυψε από τον έλεγχο συμπτωματικών και ασυμπτωματικών ασθενών από τη Βορειοδυτική Ελλάδα, με την εφαρμογή της κυτταροκαλλιέργεια και της PCR, ήταν χαμηλή.
2. Στην καθημερινή κλινική πράξη, το καλύτερο είναι να ελέγχονται δύο είδη δειγμάτων (ουρογεννητικών επιχρισμάτων και ούρων), τόσο σε άνδρες όσο και σε γυναίκες.
3. Ο έλεγχος και των δύο φύλων για *C. trachomatis* είναι σημαντικός για πολλούς λόγους, όχι μόνο για το κλινικό αποτέλεσμα της μείωσης της πιθανότητας εμφάνισης πυελικής φλεγμονώδους νόσου, αλλά και για κοινωνικούς λόγους, καθώς εισάγει νέους άνδρες στο σύστημα υγείας.
4. Οι λοιμώξεις από *C. trachomatis* υπερिσχύουν πολύ περισσότερο στους άνδρες από ότι στις γυναίκες, εκδηλώνονται πιο συχνά με συμπτώματα και είναι πιο συχνές σε νεαρούς άνδρες.
5. Αυξημένος αριθμός σεξουαλικών συντρόφων, καθώς και καινούργιος σεξουαλικός σύντροφος στο πρόσφατο παρελθόν, συσχετίστηκαν επίσης με τον κίνδυνο εμφάνισης λοίμωξης.

Από την επεξεργασία των **οφθαλμικών επιχρισμάτων** προέκυψε ότι η επιπεφυκίτιδα από *C. trachomatis*, στην περιοχή μας, είναι αρκετά σπάνια (3,5%). Παρόμοια επιδημιολογικά δεδομένα από την Ελλάδα δεν υπάρχουν.

Στους **ενήλικες**, η συχνότητα της λοίμωξης είναι σχετικά χαμηλή, τόσο στον αναπτυγμένο κόσμο, όσο και στις μη ενδημικές περιοχές του αναπτυσσόμενου.

Σε μελέτη που έγινε στην Αυστρία (Kessler et al., 1994), η συχνότητα της επιπεφυκίτιδας από *C. trachomatis* ήταν 6,6%.

Σε οφθαλμολογική κλινική της Ινδίας (Malathi et al., 2003), κατά την περίοδο 10 ετών, ελέγχθηκαν για *C. trachomatis*, 255 ενήλικες ασθενείς με επιπεφυκίτιδα και ένα νεογνό με νεογνική οφθαλμία. Χρησιμοποιήθηκε ανοσοφθορισμός σε άμεσα οφθαλμικά επιχρίσματα, κυτταροκαλλιέργεια, PCR με κρυπτικό πλασμίδιο και MOMP-1 PCR. Στο νεογνό ανιχνεύθηκαν *C. trachomatis* και στους δυο οφθαλμούς, με όλες τις μεθόδους. Στο 4,7% των ενηλίκων ανιχνεύθηκαν *C. trachomatis* με την cryptic-PCR. Η PCR που χρησιμοποιεί primers

για το κρυπτικό πλασμίδιο, βρέθηκε ότι ήταν πιο ευαίσθητη από όλες τα άλλες μεθόδους.

Σε προγενέστερη μελέτη στο Ισραήλ (Bepsudsky et al., 1999), εξετάστηκαν 36 ασθενείς με οξεία θυλακιώδη επιπεφυκίτιδα, με PCR και ELISA. Σε κανένα ασθενή δεν ανιχνεύθηκαν *C. trachomatis*, ούτε στην οξεία φάση, ούτε και 4 εβδομάδες μετά.

Αντιθέτως, στις ενδημικές περιοχές, η συχνότητα των σοβαρών μορφών των οφθαλμικών λοιμώξεων από *C. trachomatis*, όπως το τράχωμα, είναι πολύ υψηλή. Στην Κίνα (Zou et al., 2000), ανιχνεύθηκαν *C. trachomatis* με 16SrRNA gene PCR, στο 74,2% από 93 ασθενείς με κλινικά συμπτώματα τραχώματος και στο 3,4% από 178 ασθενείς χωρίς κλινικά συμπτώματα τραχώματος. Η μέθοδος και σ' αυτήν την περίπτωση είχε πολύ υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα.

Σε μια ακόμη μελέτη στην Ινδία (Madhavan et al., 1999), από το 1990 έως το 1998, εξετάστηκαν 1061 ασθενείς με επιπεφυκίτιδα, με nested PCR και RFLP. Τα *C. trachomatis* ήταν το πιο συχνό αίτιο (20,9%) και ακολουθούσαν οι αδενοϊοί (13,8%) και ο Herpes Simplex Virus (2,2%).

Στα **νεογνά** με επιπεφυκίτιδα τα ποσοστά είναι αρκετά υψηλά, ακόμα και στον αναπτυγμένο κόσμο. Παλαιότερα ο γονόκοκκος και οι χημικοί παράγοντες θεωρούνταν οι κύριες αιτίες νεογνικής οφθαλμίας, ενώ στην εποχή μας τα *C. trachomatis* κατέχουν την πρώτη θέση.

Η διάγνωση της νεογνικής οφθαλμίας από *C. trachomatis* βασίζεται πλέον στον ανοσοφθορισμό και στις μοριακές μεθόδους (PCR), ενώ η πρόληψη βασίζεται στο screening και στη θεραπεία των μητέρων και των συντρόφων τους, με μακρολίδες από το στόμα και όχι με τοπική θεραπεία η οποία αποδεικνύεται αναποτελεσματική.

Σε 180 περιστατικά ετερο/αμφοτερόπλευρης νεογνικής επιπεφυκίτιδας ανιχνεύθηκαν *C. trachomatis* στο 41% των νεογνών (Salpietro et al., 1999).

Σε παρόμοια υψηλά ποσοστά καταλήγουν και άλλες μελέτες. Σε 75 νεογνά με επιπεφυκίτιδα στις ΗΠΑ (Hammerschlag et al., 1997) ανιχνεύθηκαν *C. trachomatis* στο 27% (20/75) των νεογνών, καθώς επίσης και στα ούρα σε 12 από τις μητέρες. Σε παλαιότερη μελέτη (Hammerschlag et al., 1990) στις ΗΠΑ, σε 97 νεογνά (κάτω των 6 εβδομάδων) με επιπεφυκίτιδα ανιχνεύθηκαν *C. trachomatis* στο 30% των νεογνών με κυτταροκαλλιέργεια. Το 48,3% των νεογνών αυτών είχαν επίσης θετική καλλιέργεια ρινοφαρυγγικού επιχρίσματος για *C. trachomatis*.

Στη μελέτη μας δεν ήταν δυνατός ο παράλληλος έλεγχος των οφθαλμικών επιχρισμάτων των **νεογνών και των μητέρων** τους. Ακόμα και στην περίπτωση του βρέφους με επιπεφυκίτιδα από *C. trachomatis*, και οι δυο γονείς αρνήθηκαν να ελεχθούν για *C. trachomatis*.

Στην Κίνα (Ying et al., 1999), μελετήθηκε με την PCR, η επίδραση της λοίμωξης από *C. trachomatis* των εγκύων γυναικών, στην έκβαση της εγκυμοσύνης και στα νεογνά τους. Σε 35,9% των εγκύων γυναικών ανιχνεύθηκαν *C. trachomatis*. Από αυτές 24,7% είχαν πρόωρο τοκετό ή αποβολή, 18% των νεογνών παρουσίασαν επιπεφυκίτιδα ή πνευμονία και 13,5% απέκτησαν νεογνά με χαμηλό βάρος γέννησης (< 2500 gr). Τα αντίστοιχα ποσοστά στις έγκυες γυναίκες στις οποίες δεν ανιχνεύθηκαν *C. trachomatis*, ήταν 12,2%, 0,61% και 4,9%.

Στην Κίνα (Wu et al., 1999), για την μελέτη της κάθετης μετάδοσης των *C. trachomatis* εφαρμόστηκε η κυτταροκαλλιέργεια με McCoy κύτταρα, η PCR και DNA sequencing. Από τις 278 έγκυες γυναίκες που μελετήθηκαν σε 14%

ανιχνεύθηκαν *C. trachomatis* με PCR και σε 10,8% με την κυτταροκαλλιέργεια. Σε 79 από τα νεογέννητα διαπιστώθηκε επιπεφυκίτιδα από *C. trachomatis* στο 27,3% και πνευμονία από *C. trachomatis* στο 18,2%. Η κάθετη μετάδοση ήταν 55%.

Λίγες είναι οι μελέτες που υποστηρίζουν το αντίθετο, όπως σε μια μελέτη 182 εγκύων γυναικών (>37 εβδομάδων κύησης) στην Ταϊλάνδη (Chotnopparatpattara et al., 2003). Στο 10% των εγκύων ανιχνεύθηκαν *C. trachomatis* με multiplex PCR και μόνο στο 2% με καλλιέργεια. Σε κανένα νεογνό δεν ανιχνεύθηκαν *C. trachomatis* κατά τη γέννηση, αλλά ούτε και 2 μήνες μετά, και με τις δύο μεθόδους.

Όσο μεγαλώνει η ηλικία των παιδιών και βελτιώνονται οι συνθήκες υγιεινής τόσο μειώνεται η συχνότητα επιπεφυκίτιδας *C. trachomatis* (Javaloy et al., 2003). Οι Javaloy και συν. (2003), ήλεγξαν 527 **παιδιά**, ηλικίας 3-17 ετών, με θυλακιώδη επιπεφυκίτιδα, σε περιοχή της Σαχάρας, για *C. trachomatis*, με την ανοσοενζυμική μέθοδο Clearview και με PCR. 2,47% των παιδιών θεωρήθηκαν πιθανό να έχουν χλαμυδιακή λοίμωξη από την κλινική εξέταση, λόγω θυλακιώδους υπερτροφίας, που είναι και το πιο συχνό κλινικό εύρημα. Στο 0,8% των παιδιών ανιχνεύθηκαν *C. trachomatis* με τη μέθοδο Clearview και στο 2,27% με την PCR.

Στην παρούσα μελέτη, η ανίχνευση *C. trachomatis* και στα 3 οφθαλμικά επιχρίσματα έγινε με PCR, ενώ η **καλλιέργεια** ήταν αρνητική σ'όλες τις περιπτώσεις.

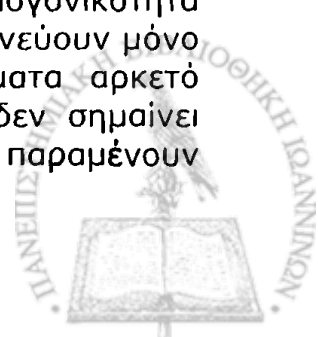
Η ευαισθησία της κυτταροκαλλιέργειας και των ανοσοενζυμικών μεθόδων, για την αναζήτηση *C. trachomatis* σε οφθαλμικά επιχρίσματα, είναι αρκετά χαμηλή (Zou et al., 2000).

Ο Bailey και συν. (1994), χρησιμοποίησε την PCR για την ανίχνευση οφθαλμικών λοιμώξεων σε περιοχές ενδημικές του τραχώματος. Διαπίστωσαν λοιπόν, κάνοντας διαδοχικές αραιώσεις του DNA, ότι το κατώτερο όριο ανίχνευσης ήταν 1 έως 10 στοιχειώδη σωμάτια για την PCR που έχει στόχο το πλασμίδιο και 10 έως 100 στοιχειώδη σωμάτια για την PCR που έχει στόχο το *omp1* γονίδιο.

Πολλές μελέτες καταλήγουν ότι η PCR είναι η πιο ευαίσθητη μέθοδος για την αναζήτηση *C. trachomatis* και στα οφθαλμικά επιχρίσματα (Zou et al., 2000, Chotnopparatpattara et al., 2003, Malathi et al., 2003).

Ο Solomon και συν. (2004) υποστηρίζουν ότι οι μοριακές μέθοδοι είναι πολύ καλύτερες από όλες τις άλλες μεθόδους για την αναζήτηση των *C. trachomatis*. Επιπλέον είναι εξαιρετικά χρήσιμες για την γενοτυπία των *C. trachomatis* που προκαλούν οφθαλμικές λοιμώξεις (Solomon et al., 2003). Ως εκ τούτου, η εφαρμογή των μοριακών μεθόδων μπορεί να βοηθήσει στην περαιτέρω κατανόηση της παθογένειας της λοίμωξης, του ρόλου της επιμένουσας λοίμωξης για την απώλεια της όρασης, της επιδημιολογίας των οφθαλμικών λοιμώξεων και της επίδρασης των στρατηγικών για τον έλεγχο του τραχώματος και των επιπλοκών του.

Παρά τη χαμηλή της ευαισθησία η κυτταροκαλλιέργεια παραμένει η μόνη μέθοδος που μπορεί να προσδιορίσει την ευαισθησία των απομονωθέντων *C. trachomatis* στα αντιβιοτικά, καθώς επίσης και να καθορίσει τη λοιμογονικότητα της νόσου. Αυτό συμβαίνει διότι οι μοριακές μέθοδοι μπορούν να ανιχνεύουν μόνο το γενετικό υλικό, το οποίο παραμένει στα οφθαλμικά επιχρίσματα αρκετό διάστημα μετά την αποδρομή της νόσου. Έτσι η ανίχνευσή του δεν σημαίνει πάντα ότι τα *C. trachomatis* είναι σε φάση αναπαραγωγής ή ότι παραμένουν ζωντανά (Solomon et al., 2004).



Τα *C. trachomatis* είναι υπεύθυνα για ένα ευρύ φάσμα λοιμώξεων, που αφορούν το ουροποιογεννητικό σύστημα και τους οφθαλμούς, συνήθως ήπιων ή ασυμπτωματικών, αλλά που μπορεί να αποτελέσουν αιτία σοβαρών επιπλοκών.

Στην περιοχή μας τα *C. trachomatis* έχουν σχετικά χαμηλή συχνότητα, όπως διαπιστώθηκε με τη εφαρμογή της PCR, μιας ταχείας και εύχρηστης μοριακής μεθόδου με υψηλή ευαισθησία και άριστη ειδικότητα.

Το πλεονέκτημα της PCR να εφαρμόζεται σε μη επεμβατικά δείγματα, όπως είναι τα δείγματα ούρων και η αξιόπιστη διάγνωση των χλαμυδιακών λοιμώξεων, σε συνδυασμό με την κατάλληλη θεραπευτική αγωγή, μπορούν να βοηθήσουν στην πρόληψη σοβαρών ουροποιογεννητικών προβλημάτων, όπως είναι η στειρότητα και η PID και να αποτρέψουν άσκοπες κλινικές πράξεις και εμπειρικές θεραπείες. Βέβαια η εφαρμογή της PCR απαιτεί εξειδικευμένο προσωπικό και κατάλληλους χώρους μοριακής Μικροβιολογίας για την αποφυγή επιμολύνσεων.

Τέλος, ο κλινικός γιατρός μπορεί να γνωρίζει ότι ο εργαστηριακός γιατρός διαθέτει στα χέρια του μια ειδική και ευαίσθητη μέθοδο μοριακής Μικροβιολογίας για τη ανίχνευση *C. trachomatis* σε οφθαλμικά δείγματα, με την οποία εξασφαλίζεται η διάγνωση αρκετών επιεμφυκίτιδων που χρονίζουν και επιμένουν.

Ευελπιστούμε, ότι μεγαλύτερα προγράμματα ελέγχου, με στόχο ιδιαίτερα τις ομάδες υψηλού κινδύνου (όπως: έφηβοι, μετανάστες, χρήστες ενδοφλέβιων ουσιών, ιερόδουλες, ασθενείς με HIV), θα περιορίσουν περαιτέρω τη συχνότητα των χλαμυδιακών λοιμώξεων στη γεωγραφική μας περιοχή.



Πίνακας 7: Συχνότητα της λοίμωξης από *Chlamydia trachomatis*.

Φύλο & Συμπτώματα	Εξεταζόμενοι	Ασθενείς με λοίμωξη (%)	Καλλιέργεια	PCR
Γυναίκες				
Συμπτωματικές	929	40 (4,3 %)	26 (65%)	40
Ασυμπτωματικές	2.169	22 (1 %)	12 (55%)	22
Σύνολο	3.098	62 (2 %)	38 (61%)	62
Άνδρες				
Συμπτωματικοί	207	13 (6,3 %)	9 (71%)	13
Ασυμπτωματικοί	35	-	-	-
Σύνολο	242	13 (5,4%)	-	-

Πίνακας 8: Αποτελέσματα-ευαισθησία της PCR σε γυναίκες με *C. trachomatis* ανάλογα με το είδος του κλινικού δείγματος.

Αριθμός γυναικών με <i>C. trachomatis</i> (η)	Τραχηλικό επίχρισμα (η) (%)	Ούρα (η) (%)
53	53	53
5	5	-
4	-	4
Σύνολο 62	58 (93,5%)	57 (91,9%)



Πίνακας 9: Αποτελέσματα-ευαισθησία της PCR σε συμπτωματικές γυναίκες με *C. trachomatis* ανάλογα με το είδος του κλινικού δείγματος.

Αριθμός συμπτωματικών γυναικών με <i>C. trachomatis</i> (η)	Τραχηλικό επίχρισμα (η) (%)	Ούρα (η) (%)
35	35	35
3	3	-
2	-	2
Σύνολο 40	38 (95%)	37 (92,5%)

Πίνακας 10: Αποτελέσματα-ευαισθησία της PCR σε ασυμπτωματικές γυναίκες με *C. trachomatis* ανάλογα με το είδος του κλινικού δείγματος.

Αριθμός ασυμπτωματικών γυναικών με <i>C. trachomatis</i> (η)	Τραχηλικό επίχρισμα (η) (%)	Ούρα (η) (%)
18	18	18
2	2	-
2	-	2
Σύνολο 22	20 (90,9%)	20 (90,9%)

Πίνακας 11: Αποτελέσματα-ευαισθησία της PCR σε συμπτωματικούς άνδρες με *C. trachomatis* ανάλογα με το είδος του κλινικού δείγματος.

Αριθμός συμπτωματικών ανδρών με <i>C. trachomatis</i> (η)	Ουρηθρικό επίχρισμα (η) (%)	Ούρα (η) (%)
12	12	12
1	1	-
-	-	-
Σύνολο 13	13 (100%)	12 (92,3%)



Πίνακας 12: Σεξουαλικοί σύντροφοι με *C.trachomatis*

Αριθμός ζευγαριών με <i>C.trachomatis</i>	Άνδρες με <i>C.trachomatis</i>	Γυναίκες με <i>C.trachomatis</i>
(n) (%)	(n) (%)	(n) (%)
1	-	1
4	4	-
2	2	2
Σύνολο 7 (4,8%)	6 (85%)	3 (43%)

Πίνακας 13:

Πληθυσμιακά χαρακτηριστικά των ασθενών (ανδρών και γυναικών) με *C. trachomatis*.

Ηλικία (έτη) (n=75)

18-20	4 (5,3%)
21-25	32 (42,7%)
26-30	30 (40%)
>30	9 (12%)

Συμπεριφερσιολογικοί παράγοντες κινδύνου (n=75)

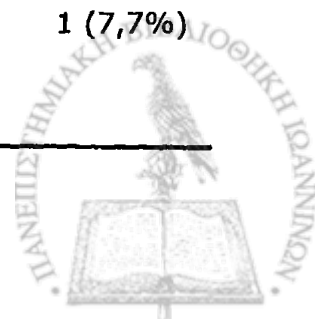
Καινούργιος σεξουαλικός σύντροφος τον τελευταίο χρόνο	68 (90,7%)
Δύο ή περισσότεροι σεξουαλικοί σύντροφοι τον τελευταίο χρόνο	53 (70,7%)

Εργαστηριακή διάγνωση των γυναικών με *Chlamydia trachomatis* (n=62)

<i>Gardnerella vaginalis</i>	39 (63%)
<i>Candida infection</i>	6 (9,7%)
<i>Trichomonas vaginalis</i>	1 (1,6%)
<i>Human Papilloma Virus infection</i>	0 (0%)
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	0 (0%)

Εργαστηριακή διάγνωση των ανδρών με *Chlamydia trachomatis* (n=13)

<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	1 (7,7%)
------------------------------	----------



5. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο σκοπός της μελέτης ήταν η ανίχνευση των *Chlamydia trachomatis* στον πληθυσμό της Β.Δ. Ελλάδος, με μοριακές μεθόδους και κυτταροκαλλιέργεια, σε δείγματα από το ουροποιογεννητικό σύστημα και τους οφθαλμούς, καθώς και η συσχέτιση των χλαμυδιακών λοιμώξεων με πιθανούς παράγοντες κινδύνου.

Συνολικά ελέγχθηκαν για *C. trachomatis* 3.340 σεξουαλικά ενεργά άτομα και 86 ασθενείς με επιπεφυκίτιδα, σε διάστημα 5 ½ ετών (Οκτώβριος 1998 - Μάιος 2004).

Σε όλα τα δείγματα (επιχρίσματα και ούρα) εφαρμόστηκε η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR (Cobas Amplicor CT) και η κυτταροκαλλιέργεια (μόνο στα επιχρίσματα) σε ειδικά σωληνάρια (shell vials), (Vircell S.L., Granada, Spain).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, σε 3.098 γυναίκες, 929 συμπτωματικές και 2.169 ασυμπτωματικές, *C. trachomatis* ανιχνεύθηκαν σε 2%, 4,3% και 1% αντιστοίχως. Σε 242 άνδρες, 207 συμπτωματικούς και 35 ασυμπτωματικούς, *C. trachomatis* ανιχνεύθηκαν σε 5,4%, 6,3% και 0,0% αντιστοίχως.

Στους 86 ασθενείς με επιπεφυκίτιδα, *C. trachomatis* ανιχνεύθηκαν σε 3 (3,5%): σε ένα παιδί 1 ½ ετών και σε 2 άνδρες με σύνδρομο Reiter.

Από τη μελέτη του πληθυσμού διαπιστώθηκε ότι η μικρή ηλικία (<30 ετών) και η εναλλαγή πολλών σεξουαλικών συντρόφων αποτελούν παράγοντες κινδύνου για λοίμωξη από *C. trachomatis*.

Η μέθοδος PCR παρουσίασε υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα, με ελαφρώς μεγαλύτερη ευαισθησία στους συμπτωματικούς ασθενείς και στα επιχρίσματα σε σχέση με τα δείγματα ούρων, χωρίς όμως στατιστικά σημαντικές διαφορές. Η ευαισθησία της κυτταροκαλλιέργειας ήταν αρκετά χαμηλή.

Συμπερασματικά, η ανίχνευση του γενετικού υλικού των *C. trachomatis* με τη μέθοδο PCR, σε δείγματα από το ουροποιογεννητικό σύστημα και τους οφθαλμούς, μπορεί να βοηθήσει σημαντικά στην αξιόπιστη και έγκαιρη διάγνωση των χλαμυδιακών λοιμώξεων.



6. SUMMARY

The aim of this study was the detection of *Chlamydia trachomatis* in the population of North-Western Greece by Nucleic acid amplification techniques (NAAT's) and cell culture, in samples taken from the urogenital system and eyes; as well as the correlation of *C. trachomatis* infections with variable risk factors.

Totally, 3,340 sexually active people and 86 patients with conjunctivitis were examined for *C. trachomatis* in 5 ½ - years period of time (from October 1998 to May 2004).

All samples (swabs and urine) were examined by Polymerase Chain Reaction (PCR, Cobas Amplicor CT) and "shell vial" culture (only the swabs), (Vircell S.L., Granada, Spain).

According to our results, in 3,098 women, 929 symptomatic and 2,169 asymptomatics, *C. trachomatis* were found in 2%, 4,3% and 1% respectively. In 242 men, 207 symptomatic and 35 asymptomatic, *C. trachomatis* were found in 5,4%, 6,3% and 0% respectively.

In 86 patients suffering from conjunctivitis *C. trachomatis* were found in 3 (3,5%): one child 1 ½ years old and two men suffering from Reiter's syndrome.

Based on the study of population it has been found that the early age (<30 years old) many sexual partners are risk factors for *C. trachomatis* infection.

In our study PCR presented high sensitivity and specificity, with slightly higher sensitivity in symptomatic patients and in swabs relation to urine samples, but without statistically important differences. The sensitivity of cell culture was low enough.

In conclusion, the detection of *C. trachomatis* DNA in urogenital and ocular swabs and in urines, by PCR, may offer considerable benefit in the reliable and accurate diagnosis of *C. trachomatis* infections.

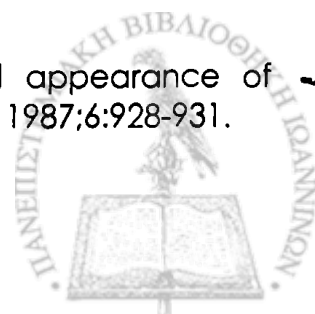


7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

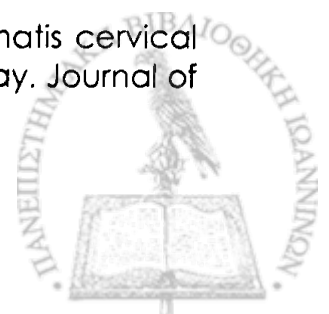
1. Addiss DG, Vaughn ML, Ludka D, et al. Decreased prevalence of *C.trachomatis* infection associated with a selective screening program in family planning clinics in Wisconsin. *Sex Transm Dis.* 1993;20:28-35.
2. Akane, A., K. Matsubara, H. Nakamura, S. Takahashi, and K. Kimura. Identification of the heme compound copurified with deoxyribonucleic acid (DNA) from bloodstains, a major inhibitor of polymerase chain reaction amplification. *J. Forensic Sci.* 1994;39:362-372.
3. Allan I., T.P.Hatch, and J.H.Pearce. Influence of cysteine deprivation on chlamydial differentiation from reproductive to infective life-cycle form. *G.Gen.Microbiol.* 1985;131:3171-3177.
4. al-Rifai, K. M. Trachoma through history. *Int. Ophthalmol.* 1988;12:9-14.
5. An Q, Olive DM. Molecular cloning and nucleic acid sequencing of *C.trachomatis* 16SrRNA genes from patient samples lacking the cryptic plasmid. *Mol Cell Probes.* 1994;8:429-435.
6. An Q, Radcliffe G, Vassallo R et al. Infection with a plasmid-free variant *Chlamydia* related to *Chlamydia trachomatis* identified by using multiple assays for nucleic acid detection. *Journal of Clinical Microbiology.* 1992; 30: 2814-2821.
7. Andersen B, Olesen F, Moller JK & Ostergaard L. Population-based strategies for outreach screening of urogenital *Chlamydia trachomatis* infections: a randomized, controlled trial. *Journal of Infectious Diseases.* 2002; 185: 252-258.
8. Andersen B, Ostergaard L, Moller JK & Olesen F. Home sampling versus conventional contact tracing for detecting *Chlamydia trachomatis* in male partners of infected women: randomised study. *British Medical Journal.* 1998; 316: 350-351.
9. Anestad G, Berdal BP, Scheel O, et al. Screening urine samples by leukocyte esterase test and LCR for chlamydial infections among asymptomatic men. *J.Clin.Microbiol.* 1995;33:2483-2484.
10. Anonymous. Planning for the global elimination of trachoma (GET): report of a WHO consultation (WHO/PBL/97.60) World Health Organization, Geneva, Switzerland. 1997.
11. Anttila T, Saikku P, Koskela P et al. Serotypes of *Chlamydia trachomatis* and risk for development of cervical squamous cell carcinoma. *Journal of the American Medical Association.* 2001; 285:47-51.
12. Ault, K.A. et al. Tumor necrosis factor- α response to infection with *C.trachomatis* in human fallopian tube organ culture. *Am J Obstet Gynecol.* 1996;175:1242-1245.



13. Bailey, R. L., T. J. Hampton, L. J. Hayes, M. E. Ward, H. C. Whittle, and D. C. Mabey. PCR for the detection of ocular chlamydial infection in trachoma-endemic communities. *J. Infect. Dis.* 1994;170:709-712.
14. Bardin T, Enel C, Cornelis F, et al. Antibiotic treatment of venereal disease and Reiter's syndrome in a Greenland population. *Arthritis Rheum.* 1992;35:190-194.
15. Barnett SD & Brundage JF. Incidence of recurrent diagnoses of Chlamydia trachomatis genital infections among male and female soldiers of the US Army. *Sexually Transmitted Infections.* 2001; 77:33-36.
16. Barry CE, Hayes SF, Hackstadt T. Nucleoid condensation in E.coli that express a chlamydial histone homolog. *Science.* 1992;256:377-379.
17. Bassiri, M., P.A. Mardh, M. Domeika & European Chlamydia Epidemiology Group. Multiplex AMPLICOR PCR detection of C.trachomatis and Neisseria gonorrhoeae in women attending non-sexually transmitted disease clinics. *J. Clin. Microbiol.* 1997;35:2556-2560.
18. Batteiger, B. E., and R. B. Jones. Chlamydial infections. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 1987;1:55-81.
19. Bavoil P, Ohlin A, Schachter J. Role of disulfide bonding in outer membrane structure and permeability in C. trachomatis. *Infect Immun.* 1984;44:479-485.
20. Beatty W.L., T.A.Belanger, A.A.Pesai, R.P.Morrison, and G.I.Byrne. Tryptophan depletion on a mechanism of gamma IFN-mediated chlamydial persistence. *Inf and Immunity.* 1994;62-9:3705-3711.
21. Beatty WL, Byrne GI, Morrison RP. Morphologic and antigenic characterization of interferon-gamma-mediated persistent C.trachomatis infection in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993;90:1-5.
22. Beck-Safue, C.M., C. E. Farshy, T. K. Jackson, L. Guillory, D. Edelkind, J.C. Bullard, E. A. Urdez, B. J. Jones, K. Francis, A. Sievert, S.A. Morse, and C.M. Black. Detection of Chlamydia trachomatis cervical infection by urine tests among adolescents clinics. *J. Adol.Health* 1998;22:197-204.
23. Beem MO, Saxon EM. Respiratory tract colonization and a distinctive pneumonia syndrome in infants infected with C.trachomatis. *N Engl J Med.* 1977;296:306-310.
24. Bell TA, Stamm WE, Kuo CC et al. Risk of perinatal transmission of Chlamydia trachomatis by mode of delivery. *Journal of Infection* 1994; 29(2): 165-169.
25. Bell TA, Stamm WE, Wang SP, et al. Chronic C.trachomatis infections in infants. *JAMA.* 1992;267:400-402.
26. Bell, T. A., K. I. Sandstrom, M. G. Gravett, et al. Delayed appearance of C.trachomatis infections acquired at birth. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 1987;6:928-931.



27. Bell, T.A., C.-C. Kuo, W.E. Stamm, M.R. Tam, R.S. Stephens, K.K. Holmes, and J.T. Grayston. Direct fluorescent monoclonal antibody stain for rapid detection of infant *Chlamydia trachomatis* infections. *Pediatrics* 1984; 74:224-228.
28. Bepsudsky V, Rehany U, Tendler Y, Leffler E, Selah S, Rumelt S. Diagnosis of chlamydial infection by direct-linked immunoassay and PCR in patients with acute follicular conjunctivitis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 1999 Aug; 237(8):617-20.
29. Berman SM, Harrison HR, Boyce WT, et al. Low birth weight, prematurity, and postpartum endometritis: Association with prenatal cervical *Mycoplasma hominis* and *Chlamydia trachomatis* infections. *JAMA*. 1987;257:1189-1194.
30. Black CM, Tharpe LA & Russell H. Distinguishing *Chlamydia* species by restriction analysis of the major outer membrane protein gene. *Molecular and Cellular Probes* 1992; 6: 395-400.
31. Black CM. Current methods of laboratory diagnosis of *C. trachomatis* infections *Clinical Microbiological Review* 1997; 10: 160-184).
32. Black M. Carolyn, Marrazzo Jeanne, Johnson E. Robert. Head-to-head multicenter comparison of DNA Probe and NAAT's for *Chlamydia trachomatis* infection in women performed with an improved reference standard. *J.Clin.Microb.* Oct.2002;3757-3763.
33. Blake DR, Duggan A, Quinn T, Zenilman J, Joffe A. Evaluation of vaginal infections in adolescent women: can it be done without a speculum. *Pediatrics* 1998;102:939-944.
34. Blanding J., L.Hirsch, N.Stranton, T.Wright, S.Aarnaes, L.M. de la Maza, and E.M.Peterson. Comparison of the Clearview *Chlamydia*, the PACE 2 assay, and culture for detection of *Chlamydia trachomatis* from cervical specimens in a low-prevalence population. *J.Clin.Microbiol.* 1993;31:1622-1625.
35. Bloomfield PJ, Kent C, Campbell D, Hanbrook L, Klausner JD. Community-based chlamydia and gonorrhea screening through the United States mail, San Francisco. *Sex Transm Dis.* 2002;29:294-7.
36. Blythe MJ, Katz BP, Orr, et al. Historical and clinical factors associated with *Chlamydia trachomatis* genitourinary infection in female adolescents. *J. Pediatr.* 1988;112:1000-1004.
37. Blythe, M. J., B. P. Katz, B. E. Batteiger, J. A. Ganser, and R. B. Jones. Recurrent genitourinary chlamydial infections in sexually active female adolescents. *J. Pediatr.* 1992;121:487-493.
38. Bobo L, Coutlee F, Yolken RH et al. Diagnosis of *Chlamydia trachomatis* cervical infection by detection of amplified DNA with an enzyme immunoassay. *Journal of Clinical Microbiology.* 1990; 28: 1968-1973.
39. Bodor FF. Conjunctivitis-otitis syndrome. *Pediatrics* 1982;69:695-698.



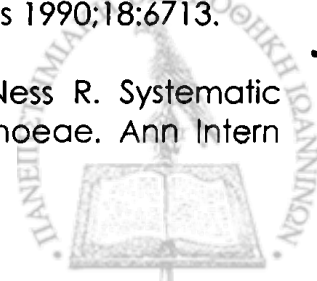
40. Bowie WR. Approach to men with urethritis and urologic complications of sexually transmitted diseases. *Med Clin North Am.* 1990;74:1543-1557.
41. Braley AE. Inclusion blenorrhea. *Am J Ophthalmol.* 1938;21:1203-1207.
42. Brasfield DM, Stagno S, Whitley RJ, et al. Infant pneumonitis associated with Cytomegalovirus, Chlamydia, Pneumocystis, and Ureaplasma: Follow-up. *Pediatrics.* 1987;79:76-83.
43. Braverman PK, Biro FM, Brunner RL, Gilchrost MJR, Rauh JL. Scenig asymptomatic adolescent males for chlamydia. *J. Adolesc. Health Care.* 1990;11:141-144.
44. Βρεπού Ε., Ψαρρού Ε., Τσούμαρης Λ., Κονείδου Γ., Σπηλιοπούλου Δ. Ανάπτυξη συστήματος οροτυπίας στελεχών *C.trachomatis* με μονοκλωνικά αντισώματα. 3^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Aids και Σεξουαλικά Μεταδιδόμενων Νοσημάτων, Αθήνα. 1992.
45. Broadbent R, O'Leary L. Chlamydial infections in young infants – a cause for concern. *N Z Med J.* 1988;101:44-45.
46. Brunham R, Paavonen J, Stevens CE, et al. Mucopurulent cervicitis – the ignored counterpart in women of urethritis in men. *N Engl J Med.* 1984;311:1-6.
47. Brunham R, Rey-Ladino J. Immunology of chlamydia infection: Implications for a *C.trachomatis* vaccine. *Nature Reviews Immunology* 5. 2005;149-161.
48. Brunham RC, Maclean IW, Binns B, et al. Chlamydia trachomatis: Its role in tubal infertility. *J Infect Dis.* 1985;152:1275-1282.
49. Brunham RC, Paavonen J, Stevens CE, et al. Mucopurulent cervicitis: The ignored counterpart in women of urethritis in men. *N Engl J Med.* 1984;311:1-6.
50. Brunham RC, Reeling R, Maclean I, et al. Chlamydia trachomatis-associated ectopic pregnancy: Serologic and histologic correlates. *J Infect Dis.* 1992;165:1076-1081.
51. Brunham, R.C., M. Laga, J. N. Simonsen, D. W. Cameron, R. Peeling, J. McDowell, H. Pamda, J. O. Ndinya-Achola, G. Maitha, and F. A. Plummer. The prevalence of *C. trachomatis* infection among mothers of children with trachoma. *Am. J. Epidemiol.* 1990;132:946-952.
52. Brussieux J, Baisivan A, Theron HP, Faidhersec, Machado N, Michelon B. Prevention of neonatal conjunctivitis. A comparative clinical and bacteriological study of 2 eyedrops: silver nitrate and oxytetracycline chlorhydrate. *Ann Pediatr* 1991;38:637-641.
53. Bulletin of the World Health Organization 1990;68(5):639-654.
54. Bump RC. Chlamydia trachomatis as a cause of prepubertal vaginitis. *Obstet Gynecol.* 1985;65:384-388.



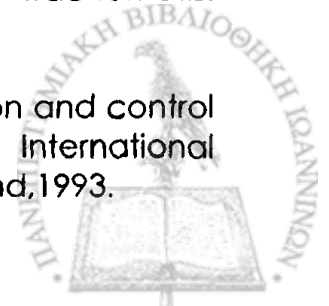
55. Burstein GR, Gaydos CA, Diener-West M, et al. Incident *C. trachomatis* infection among inner-city adolescents. *JAMA*. 1998;280:521-526.
56. Burstein GR, Zenilman JM, Gaydos CA et al. Predictors of repeat *Chlamydia trachomatis* infections diagnosed by DNA amplification testing among inner city females. *Sexually Transmitted Infections* 2001; 77: 26-32.
57. Burstein GR, Zenilman JM, Gaydos CA et al. Predictors of repeat *Chlamydia trachomatis* infections diagnosed by DNA amplification testing among inner city females. *Sex Transm Inf* 2001;77:26-32.
58. Caldwell, H. D., and L. J. Perry. Neutralization of *C. trachomatis* infectivity with antibodies to the major outer membrane protein. *Infect. Immun.*1982; 38:745-754.
59. Campbell LA, Kuo CC, Grayston JT. Structural and antigenic analysis of *C. pneumoniae*. *Infect Immun* 1990;58:93-97.
60. Campbell LA, Patton DL, Moore DE, et al. Detection of *Chlamydia trachomatis* deoxyribonucleic acid in women with tubal infertility. *Fertil Steril*. 1993;59:45-50.
61. Cates, W., Jr., and J. N. Wasserheit. Genital chlamydial infections: epidemiology and reproductive sequelae. *Am. J. Obstet. Gynecol*. 1991;164:1771-1781.
62. Center for Disease Control. Laboratory guidelines screening tests to detect *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* infections. *MMWR*,2002,51No.RR-15.1-38(<http://www.cdc.gov/STD/LabGuidelines/default.htm>).
63. Centers for Disease Control and Prevention. Recommendations for the prevention and management of *C. trachomatis* infections. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. 42(No. RR-12)1993:1-39.
64. Centers for Disease Control and Prevention. Guidelines for treatment of sexually transmitted diseases. *MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report*. 1998;47 (No. RR-1)1998: 1-116.)
65. Centers for Disease Control. *C. trachomatis* infections: Policy guidelines for prevention and control. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. 1985;34 Suppl. 3:53.
66. Chandler, JW, Alexander ER, Pfeiffer TA, et al. Ophthalmia neonatorum associated with maternal chlamydial infections. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol*. 1977;83:302-308.
67. Chernesky, M. A., D. Jang, J. Sellors, P. Coleman, J. Bodner, I. Hrusovsky, S. Chong, and J. B. Mahony. Detection of *Chlamydia trachomatis* antigens in male urethral swabs and urines with a microparticle enzyme immunoassay. *Sex. Transm. Dis.*1995; 22:55-59.
68. Chernesky, M. A. *Chlamydia trachomatis* diagnostics. *Sex. Transm. Infect.* 2002;78:232-234.



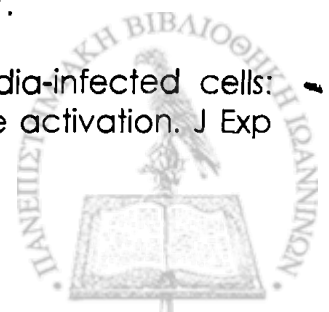
69. Chernesky, M., S. Castriciano, J. Sellors, I. Stewart, I. Cunningham, S. Landis, et al. Detection of *Chlamydia trachomatis* antigens in urine as an alternative to swabs and cultures. *J. Infect. Dis.* 1990;161:124-126.
70. Chernesky, M.A., S. Chong, D. Jang, K. Luinstra, J.Sellors, and J.B.Mahony. Ability of commercial LCR and PCR assays to diagnose *Chlamydia trachomatis* infections in men by testing first-void urine. *J.Clin.Microbiol.* 1997;35: 982-984.
71. Chernesky, M.A., J.B.Mahoney, S.Castriciano, M.Moresl, O.Stewart, S.F.Landis, W.Seidelman, et al. Detection of *Chlamydia trachomatis* antigens by enzyme immunoassay and immunofluorescence in genital specimens from symptomatic and asymptomatic men and women. *J.Infect.Dis.* 1986;154:141-148.
72. Chotnopparatpattara P, Limpongsanurak S, Wongprechasawas A. The prevalence of *Chlamydia trachomatis* infection in pregnant Thai women. *J Med Assoc Thai.* 2003;86:399-403.
73. Christiansen G, Pederien LB, Koehler JE, Lundemose AG, Birkelund S. Interaction between the *C.trachomatis* histone H1-like protein (Hc1) and DNA. *J Bacteriol.* 1993;175:1785-1795.
74. Christiansen, G., and S. Birkelund. *Chlamydia* structure-a molecular approach to understand the structure of *Chlamydia*. In J. Schachter, et al., *Chlamydial infections: Proceedings of the 10th International Symposium on Human Chlamydial Infections*, June 16-21, 2002, Antalya, Turkey. International Chlamydia Symposium, San Francisco, Calif. 2002.
75. Ciemins EL, Kent CK, Flood J, Klausner JD. Evaluation of chlamydia and gonorrhea screening criteria-San Francisco sexually transmitted disease clinic: 1997 to 1998. *Sex Transm Dis.* 2000;27:165-167.
76. Claas HC, Melchers WJ, de Bruijn IH et al. Detection of *Chlamydia trachomatis* in clinical specimens by the polymerase chain reaction. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 1990; 9: 864-868.
77. Clad A, Prillwitz J, Hintz KC et al. Discordant prevalence of *Chlamydia trachomatis* in asymptomatic couples screened using urine ligase chain reaction. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Disease* 2001; 20:324-328
78. Coffey JD. Otitis media in the practice of pediatrics: bacteriological and clinical observations. *Pediatrics* 1966;38:25-32.
79. Cohen I, Vielle JC, Calkins BM. Improved pregnancy outcome following successful treatment of chlamydial infection. *JAMA.* 1990;263:3160-3163.
80. Coles AM, Allan I, Pearce JH. The nucleotide and derived amino acid sequence of the *omp2* gene of *C.trachomatis* serovar E. *Nucleic Acids Res* 1990;18:6713.
81. Cook R., Hutchison S., Ostergaard L., Braithwalte S., and Ness R. Systematic Review: Noninvasive testing for *C.trachomatis* and *N.gonorrhoeae*. *Ann Intern Med.* 2005;142:914-925



82. Cosentino LA, Landers DV, Hillier SL. Detection of *C.trachomatis* and *N.gonorrhoeae* by strand displacement amplification and relevance of the amplification control for use with vaginal swab specimens. *J.Clin.Microbiol.*2003;41:3592-6.
83. Cottingham, J., and D. Hunter. *C.trachomatis* and oral contraceptive use: a quantitative review. *Genitourin. Med.* 1992;68:209-216.
84. Coutts WE. Lymphogranuloma venereum: A general review. *Bull WHO.* 1950;2:545-562.
85. Cox R.L.,Kuo C.C.,Grayston J.T.,Campbell L.A. Deoxyribonucleic acid relatedness of *Chlamydia* species strain:TWAR, *C.trachomatis* and *C.psittaci*. *Int. J. Syst. Bact.*1988;38:265-268.
86. D'Aunoy R, von Haam E. General reviews: Venereal lymphogranuloma. *Arch Pathol.* 1939;27:1032-1082.
87. Dan M, Rotmensch HH, Eylan E, et al. A case of lymphogranuloma venereum of 20 years' duration. *Br J Vener Dis.* 1980;56:344-346.
88. Dawson CR, Schachter J. Strategies for treatment and control of blinding trachoma: Cost effectiveness of topical or systemic antibiotics. *Rev Infect Dis.* 1985;7:768-773.
89. Dawson CR, Schachter J. TRIC agent infections of the eye and genital tract. *Am J Ophthalmol.* 1967;63:1288-1298.
90. Dawson CR, Sheta A, Sallam S, et al. Azithromycin in the control of trachoma 5: Oral azithromycin compared to topical oxytetracycline for active trachoma in Egypt. In: Stephens RS, Byrne GI, Christiansen G, et al, eds. *Chlamydial Infections: Proceedings of the 9th International Symposium on Human Chlamydial Infection.* International Chlamydia Symposium, San Francisco, 1998: Stephens RS, Byrne GI, Christiansen G, et al, eds. *Chlamydial Infections: Proceedings of the 9th International Symposium on Human Chlamydial Infection.* International Chlamydia Symposium, San Francisco, 1998:355-358.
91. Dawson, C. R., B. R. Jones, and M. L. Tarizzo. Guide to trachoma control in programs for the prevention of blindness. World Health Organization, Geneva, Switzerland. 1981.
92. De la Maza LM, Peterson EM. Scanning electron microscopy of McCoy cells infected with *C.trachomatis*. *Exp Mol Pathol.* 1982;36:217-326.
93. De Mets Andrea. Bacteriology 330 Lecture topics: *Chlamydia trachomatis*. University of Wisconsin-Madison Department of Bacteriology. 2000.
94. DeLisle S, Fine D, Kaetz S, et al. A multistate model for the prevention and control of sexually transmitted chlamydia infections. Abstract 162. 10th International Meeting of the International Society for STD Research, Helsinki, Finland, 1993.



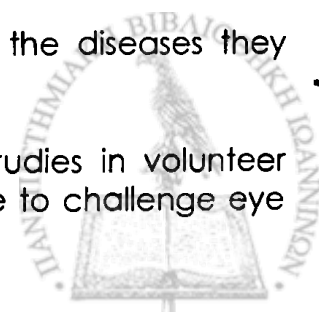
95. Division of Sexually Transmitted Diseases. Chlamydia in the United States. Center for Disease Control; Website accession date April .2002 www.cdc.gov/nchstp/dstd/Fact_Sheets/chlamydia_facts.htm
96. Domeika M, Domeika K, Paavonen J, et al. Humoral immune response to conserved epitopes of *C.trachomatis* and human 60-kDa heat-shock protein in women with pelvic inflammatory disease. *J Infect Dis.* 1998;177:714-719.
97. Domeika, M., M. Bassiri, and P. A. Mardh. Diagnosis of genital *Chlamydia trachomatis* infections in asymptomatic males by testing urine by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 1994; 32:2350-2352.
98. Dowe G, Smikle M, King SD et al. High prevalence of genital *Chlamydia trachomatis* infection in women presenting in different clinical settings in Jamaica: implications for control strategies. *Sexually Transmitted Infections* 1999; 75:412-416.
99. Eastick, K., D. Longhurst, I. D. Paul, J. Leece, E. O. Caul, P. J. Horner, and A. J. Herring. Sensitive detection of *C.trachomatis* using the LightCycler- a new reference test, p. 93. *In* P. Saikku (ed), *Proceedings of the 4th meeting of the European Society for Chlamydia Research.* Universitas Helsingiensis, Helsinki, Finland. 2000.
100. Eckert LO, Hawes SE, Wolner-Hanssen PK et al. Endometritis: the clinical-pathologic syndrome. *American Journal of Obstetrics & Gynecology.* 2002;186: 690-695.
101. Egger M, Low N, Smith GD et al. Screening for chlamydia infections and the risk of ectopic pregnancy in a county in Sweden: ecological analysis. *British Medical Journal* 1998; 316: 1776-1780.
102. Eissenberg LG, Wyrick RB, Davis CH, Rumpp JW. *C.psittaci* elementary body envelopes :ingestion and inhibition of phagolysosome fusion. *Infect Immun.* 1983;40:741-751.
103. Eley Adrian. *C trachomatis* is bad for your sperm. *Microbiology today.* 2003;30:61-62.
104. Everett, K.D., R. M. Bush, and A.A. Andersen. Emended description pf the order Chlamydiales, proposal of Parachlamydiaceae fam.nov. and Simkaniaceae fam.nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family Chlamydiaceae, including a new genus and five new species and standards for the identification of organisms. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1999;49:415-440.
105. Fahr MJ, Sriprakash KS & Hatch TP. Convergent and overlapping transcripts of the *Chlamydia trachomatis* 7.5-kb plasmid. *Plasmid* 1992; 28:247-257.
106. Fan T, Lu H, Hu H, et al. Inhibition of apoptosis in chlamydia-infected cells: Blockade of mitochondrial cytochrome c release and caspase activation. *J Exp Med.* 1998;187:487-496.



107. Farencena, A., M. Comanducci, M. Donati, G. Ratti, and R. Cevenini. Characterization of a new isolate of *C. trachomatis* which lacks the common plasmid and has properties of biovar trachoma. *Infect. Immun.* 1997;65:2965-2969.
108. Fedorko, D. P., and T.F. Smith. Chlamydial infections. P. 95-125. In B.B. Wentworth, F.N. Judson, and M.J.R. Gilchrist (ed), *Laboratory methods for the diagnosis of sexually transmitted diseases*. 2nd ed. American Public Health Association, Washington, D.C. 1991.
109. Fenton KA, Korovessis C, Johnson AM et al. Sexual behaviour in Britain: reported sexually transmitted infections and prevalent genital *Chlamydia trachomatis* infection. *Lancet* 2001; 358:1851-1854
110. Ferreti A.J et al. Evidence for association between *C. psittaci* infection and ocular adnexal lymphoma (OAL). *Proc. Am. Soc. Oncol.* 2003;22: page: 565.(abstr. 2273)
111. Forsey T, Darougar S. Transmission of chlamydiae by the housefly. *Br J Ophthalmol.* 1981;65:147-150.
112. Forster, G.E., Cooney, I., Munday, P. E. et al. Investigation into the value of Papanicolaou stained cervical smears for the diagnosis of chlamydial cervical infection. *J. Clin. Pathol.* 1985;38:399-402.
113. Fox A, Robers JC, Gilbart J, et al. Muramic acid is not detectable in *C. psittaci* or *C. trachomatis* by gas chromatography-mass spectrometry. *Infect Immun.* 1990;58:835-837.
114. Φραντζίδου-Αδαμοπούλου Φ. Χλαμύδια. *Ιατρική Μικροβιολογία* (Α.Αντωνιάδης, Γ. Αντωνιάδης, Ν. Λεγάκης, Ι. Τσελέντης). 1999;32: 224-254.
115. Fredlund H., L. Falk, M. Jurstrand and M. Unemo. Molecular genetic methods for diagnosis and characterisation of *C. trachomatis* and *N. gonorrhoeae*: impact on epidemiological surveillance and interventions. *APMIS* 2004;112: 771-84.
116. Frost EH, Deslandes S, Veilleux S et al. Typing *Chlamydia trachomatis* by detection of restriction fragment length polymorphism in the gene encoding the major outer membrane protein. *Journal of Infectious Diseases* 1991;163:1103-1107.
117. Frost, E. H., S. Deslandes, and D. Bourgaux-Ramoisy. *C. trachomatis* serovars in 435 urogenital specimens typed by restriction endonuclease analysis of amplified DNA. *J. Infect. Dis.* 1993;168:497-501.
118. Fukushi H, Hirai K. Restriction fragment length polymorphisms of rRNA as genetic markers to differentiate *Chlamydia* spp. 1993;43:613-617.
119. Fukushi, H., and K. Hirai. Proposal of *Chlamydia pecorum* sp. nov. for *Chlamydia* strains derived from ruminants. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1992;42:306-308.
120. Gaydos C, Howell R, Pare B et al. *Chlamydia trachomatis* infections in female military recruits. *New England Journal of Medicine* 1998; 339:739-744.



121. Gaydos C, Howell R, Pare B et al. Chlamydia trachomatis infections in female military recruits. *New England Journal of Medicine* 1998;339: 739-744.
122. Gaydos CA, Bobo L, Welsh L, Hook EW, Viscidi R, Quinn TC. Gene typing of *C. trachomatis* by polymerase chain reaction and restriction endonuclease digestion. *Sex Transm Dis* 1992;19:303-308.
123. Gaydos CA, Howell MR, Pare B, et al. *C. trachomatis* infections in female military recruits. *N Engl J Med.* 1998;339:739-744.
124. Gaydos, C.A., K.A. Crotchfelt, R.M. Howell, S. Kralian, P. Hauptman, and T. C. Quinn. Molecular amplification assays to detect chlamydial infections in urine specimens from high school female students and to monitor the persistence of chlamydia DNA after therapy. *J. Infect. Dis.* 1998;177:417-424.
125. Gencay M, Koskiniemi M, Fellman V et al. Chlamydia trachomatis infection in mothers with preterm delivery and in their newborn infants. *APMIS* 2001;109(9): 636-640.
126. Gigliotti F, Hendley JO, Morgan J, Mickaels R, Dickens M, Lohr J. Efficacy of topical antibiotic therapy in acute conjunctivitis in children. *J Pediatr* 1984;104:623-626.
127. Gigliotti F, Williams WT, Hayden FG, Hendley JO, Benjamin J, Dickens M, et al. Etiology of acute conjunctivitis in children. *J Pediatr* 1981;98:31-36.
128. Goessens, W.H.F., J.W. Mouton, W.I. van der Meijden, S. Deelen, T.H. van Rijsoort-Vos, N. Lemmens-Den Toom, H.A. Verbrugh, and R.P. Verkooyen. Comparison of three commercially available amplification assays, AMP CT, LCx and COBAS Amplicor, for detection of *Chlamydia trachomatis* in first-void urine. *J. Clin. Microbiol.* 1997;35:2628-2633.
129. Golden MR, Hughes JP, Cles LE, Crouse K, Gudgel K, Hu J, et al. Positive predictive value of Gen-Probe APTIMA Combo 2 testing *N. gonorrhoeae* in a population of women with low prevalence of *N. gonorrhoeae* infection. *Clin Infect Dis.* 2004;39:1387-90.
130. Gordon FB and Quan AL. Isolation of trachoma agents in cell culture. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. N.Y.* 1965;118:354-359.
131. Grayston GT, Kuo C-C, Campbell LA, et al. *C. pneumoniae* sp. nov. for *Chlamydia* sp. Strain TWAR. *Int J Syst Bacteriol.* 1989;39:88-90.
132. Grayston GT. Infections caused by *C. pneumoniae* strain TWAR. *Clin Infect Dis.* 1992;15:757-763.
133. Grayston JT, Wang S. New knowledge of chlamydiae and the diseases they cause. *J Infect Dis.* 1975;132:87-105.
134. Grayston JT, Wang SP, Lin HM, et al. Trachoma vaccine studies in volunteer students of the National Defense Medical Center. II. Response to challenge eye

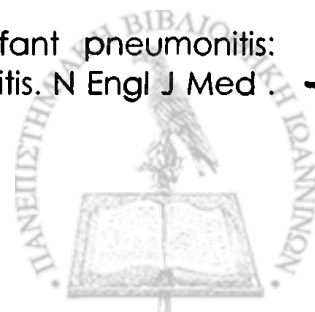


inoculation of egg grown trachoma virus. Chin Med J (Republic of China). 1961;8:312-318.

135. Grayston JT.,Kuo CC.,Wang SP.,Altman J. A new C.rittaci strain called TWAR from acute respiratory tract infections. New Engl.J.Med. 1986;315:161-168.
136. Grayston JT.,Wang SP.,Kuo CC. Current knowlence of Chlamydia TWAR, an important cause of pneumonia and other acute respiratory diseases. In: Perspectives in Antiinfective Therapy Ed. G.G. Jackson, H.D.Schlumberger, H.J. Zeiler. Current Torics in Infectious Diseases and Clinical Microbiology. 1989;2:216-228.
137. Grayston, J. T. Infections caused by Chlamydia pneumoniae strain TWAR. Clin. Infect. Dis. 1992,15:757-763.
138. Greaves AB, Hilleman MR, Taggart SR, et al. Chemotherapy in bubonic lymphogranuloma vevereum: A clinical and serological evaluation. Bull WHO. 1957;16:277-289.
139. Greenblatt RB. Antibiotics in treatment of LGV and granuloma inguinale. Ann N Y Acad Sci. 1952;55:1082-1089.
140. Griffin M, Pushpanathan C, Andrews W. C. trachomatis pneumonitis: A case study and literature review. Pediatr Pathol. 1990;10:843-852.
141. Groseclose SL, Zaidi AA, DeLisle SJ et al. Estimated incidence and prevalence of genital Chlamydia trachomatis infections in the United States, 1996. Sexually Transmitted Diseases. 1999; 26:339-344.
142. Grun L, Tassano -Smith J, Carder C et al. Comparison of two methods of screening for genital chlamydial infection in women attending in general practice: cross sectional survey. British Medical Journal 1997; 315:226-230.
143. Grun L, Tassano-Smith J, carder C et al. Comparison of two methods of screening for genital chlamydial infection in women etending in general practice : cross sectional survey. British Medical Journal 1997; 315:226-230.
144. Guaschino S. and De Seta F. Update to Chlamydia trachomatis. Ann NY Acad Sci. 2000:293-300.
145. Guaschino, S., E. Grimaldi, F. De Seta, et al. Detection of C.trachomatis in urine of asymptomatic women. In Collected Abstracts of the 3rd Congress of the European Society for Gynecologic and Obstetric Investigation. No FC20. *Madonna di Campiglio. Italy. 1997.
146. Guatelli, J. C., K. M. Whitfield, D. Y. Kwoh, K. J. Barringer, D. D. Richman, and T. R. Gingeras. Isothermal, in vitro amplification of nucleic acids by a multienzyme réaction modeled after retroviral replication. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1990;87:1874-1878.



147. Hackstadt T. Cell biology. In: Stephens RS, ed. Chlamydia: intracellular biology, pathogenesis and immunity. Washington DC: American Society for Microbiology; 1999:101-38.
148. Halberstaedter L., von Provazek S. Uber chlamydozoe nbefunde bei blennorrhoea neonatorum non gonorrhoeica. Klin Wochenschr. 1909;46:1839-1840.
149. Halberstaedter L., von Provazek S. Uber chlamydozoe nbefunde bei blennorrhoea neonatorum non gonorrhoeica. Klin Wochenschr. 1909;46:1839-1840.
150. Hammerschlag MR, Cummings C, Roblin PM, et al. Efficacy of neonatal ocular prophylaxis for the prevention of chlamydial and gonococcal conjunctivitis. N Engl J Med. 1989;320:769-772.
151. Hammerschlag MR, Gelling M, Roblin PM, Kutlin A, Jule JE. Treatment of neonatal chlamydial conjunctivitis with azythromycin. Pediatr Infect Dis J 1998;17:1049-1050.
152. Hammerschlag MR, Rettig PJ & Shields ME. False positive results with the use of chlamydial antigen detection tests in the evaluation of suspected sexual abuse in children. Pediatric Infectious Disease Journal 1988; 7: 11-14.
153. Hammerschlag MR, Roblin PM, Gelling M, and Worku M. Comparison of two Enzyme Immunoassays to Culture for the diagnosis of chlamydia conjunctivitis and respiratory infections in infants. J Clin Microbiol. Aug. 1990,p. 1725-1727.
154. Hammerschlag MR, Roblin PM, Gelling M, Tsumura N, Jule LE, Kutlin A. Use of polymerase chain reaction for the detection of Chlamydia trachomatis in ocular and nasopharyngeal specimens from infants with conjunctivitis. Pediatr Infect Dis J. 1997 Mar;16(3):293-7.
155. Han, Y., D. L. Morse, C. E. Lawrence, D. Murphy, and S. Hipp. Risk profile for Chlamydia infection in women from public health clinics in New York State. J. Community Health 1993;18:1-9.
156. Hare MJ, Taylor-Robinson D, Cooper P. Evidence for an association between Chlamydia trachomatis and cervical intraepithelial neoplasia. Br.J.Obstet.Gynaecol.1982;89:489-492.
157. Harrison CJ, Hadrick JA, Block SL. Relation of the outcome of conjunctivitis and the conjunctivitis-otitis syndrome to identifiable risk factors and oral antimicrobial therapy. Pediatr Infect Dis J. 1987;6:536-540.
158. Harrison HR, Alexander ER. Chlamydial infections in infants and children. In: Holmes KK, Mardh PA, Sparling PF, et al, eds. Sex Transm Dis. 2nd ed. New York: McGraw-Hill; 1990:811-820.
159. Harrison HR, English MG, Lee CK, et al. C.trachomatis infant pneumonitis: Comparison with matched controls and other infant pneumonitis. N Engl J Med . 1978; 288:702-708.



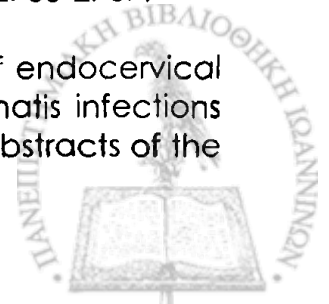
160. Harrison, H. R., M. Costin, J. B. Meder, L. M. Bounds, D. A. Sims, M. Lewis, and E. R. Alexander. Cervical *C.trachomatis* infection in university women: relationship to history, contraception, ectopy, and cervicitis. *Am J Obstet Gynecol.* 1985;153:244-251.
161. Hatch TP, Al-Hossaiwy E, Silverman JA. Adenine nucleotide and lysine transport in *C. psittaci*. *J Bacteriol.* 1982;150:662-670.
162. Hatch TP, Miceli M, Sublett JE. Synthesis of disulfide-bonded outer membrane proteins during the developmental cycle of *C.psittaci* and *C.trachomatis*. *J Bacteriol.* 1986;165:379-385.
163. Hatch,Thomas P. Disulfide Cross-Linked Envelope Proteins: the Functional Equivalent of Peptidoglycan in Chlamydia; *J.Bacter.* 1996;178:1-5.
164. Hatt C, Ward ME, & Clarke IN. Analysis of the entire nucleotide sequence of the cryptic plasmid of *Chlamydia trachomatis* serovar L1. Evidence for involvement in DNA replication. *Nucleic Acids Research* 1988;16:4053-4067.
165. Hay PE, Thomas BJ, Horner PJ, MacLeod E, Renton AM, Taylor-Robinson D. *Chlamydia trachomatis* in women: the more you look, the more you find. *Genitourin Med* 1994;70:97-100.
166. Heggie AD, Jaffe AC, Stuart LA, et al. Topical sulfacetamide vs oral erythromycin for neonatal chlamydial conjunctivitis. *Am J Dis Child.* 1985;139:564-566.
167. Heinonen PK & Miettinen A. Laparoscopic study on the microbiology and severity of acute pelvic inflammatory disease. *European Journal of Obstetrics, Gynecology & Reproductive Biology* 1994; 57: 85-89.
168. Herrmann BF, Johansson AB, Mardh PA. A retrospective study of efforts to diagnose infections by *C.trachomatis* in a Swedish country. *Sex Transm Dis.* 1991;18:233-237.
169. Heymann B. Uber die fundorte der "Provazek" schen Korperchen. *Berl Klin Wochenschr.* 1910;47:663-666.
170. Hillis, S. D., A. Nakashima, P. A. Marchbanks, D. G. Addiss, and J.P. Davis. Risk factors for recurrent *C.trachomatis* infections in women. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1994;170:801-806.
171. Hiltunen-Back E, Haikala O, Kautiainen H et al. A nationwide sentinel clinic survey of *Chlamydia trachomatis* infection in Finland. *Sexually Transmitted Diseases* 2001; 28:252-258.
172. Hinton EL, Bobo LD, Wu TC et al. Detection of *Chlamydia trachomatis* DNA in archival paraffinized specimens from chronic salpingitis cases using the polymerase chain reaction. *Fertility and Sterility* 2000; 74:152-157.



173. Holland SM, Gaydos CA & Quinn TC. Detection and differentiation of *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia psittaci*, and *Chlamydia pneumoniae* by DNA amplification. *Journal of Infectious Diseases* 1990;162: 984-987.
174. Hollblad-Fadiman K, Goldman SM. American College of Preventive Medicine practice policy statement: screening for *C.trachomatis*. *Am J Prev Med.* 2003;24:287-92.
175. Howell R, Quinn TC, et al. Screening for *Chlamydia trachomatis* in asymptomatic women attending family planning clinics. A cost-effectiveness analysis of three strategies. *Annals of Internal Medicine*, 1998;128:277-284.
176. Ingalls RR, Rice PA, Qureshi N, Takayama K, Lin JS, Golenbock DT. The inflammatory cytokine response to *C.trachomatis* infection is endotoxin mediated. *Infect Immun.* 1995;63:3125-3130.
177. Iwen PC, Blair TM, Woods GL. Comparison of the Gen-Probes PACE 2 system, direct fluorescent-antibody, and cell culture for detecting *C.trachomatis* in cervical specimens. *Am J Clin Pathol* 1991;95:578-582.
178. Javaloy J, Ferrer C, Vidal MT, Alio JL. Follicular conjunctivitis caused by *Chlamydia trachomatis* in an infant Saharan population: molecular and clinical diagnosis. *Br J Ophthalmol.* 2003;87:142-6.
179. Jensen I.P. H.Fogh and J.Prag. Diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections in a sexually transmitted disease clinic: evaluation of a urine sample tested by enzyme immunoassay and PCR in comparison with a cervical and/or a urethral swab tested by culture and PCR. 2003;9:194-201.
180. Johnson RE, Newhall WJ, Papp JR, Knapp JS, Black CM, Gift TL, et al. Screening tests to detect *C.trachomatis* and *N.gonorrhoeae* infections-2002. *MMWR Recomm Rep.* 2002;51:1-38.
181. Johnson, R. E., T. A. Green, J. Schachter, R. B. Jones, E. W. Hook, 3rd, C.M. Black, D. H. Martin, M. E. St Louis, and W. E. Stamm. Evaluation of nucleic acid amplification tests as reference tests for *C. trachomatis* infections in asymptomatic men. *J. Clin. Microbiol.* 2000;38:4382-4386.
182. Jones B.Robert, Batteiger E. Byron. "Infectious diseases and their etiologic agents", Section C, Chlamydial diseases, Chapters 167-168, p:1986-2004.
183. Jones M.F., Smith T.F., Honglum A.J. and Hezmann J.E. Detection of *C.trachomatis* in genital specimens by Chlamydiazyme test. *J.Clin.Microbiol.* 1984;20:465-467.
184. Jones RB. Treatment of *C.trachomatis* infections of the urogenital tract. In: Bowie WR, Caldwell HD, Jones RP, et al, eds. *Chlamydial Infections*. Cambridge: Cambridge University Press. 1990;509-518.
185. Jones, BR. The prevention of blindness from trachoma. *Trans Ophthalmol. Soc. U.K.* 1975;95:16-33.

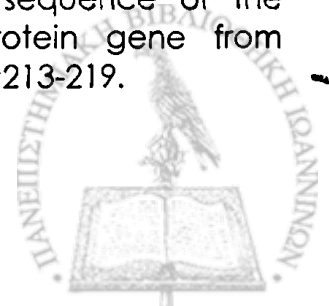


186. Jones, R. B., B. P. Katz, B. VanderPol, V. A. Caine, B. E. Batteiger, and W. J. Newhall. 1986. Effect of blind passage and multiple sampling on recovery of *Chlamydia trachomatis* from urogenital specimens. *J. Clin. Microbiol.* 1986;24:1029-1033.
187. Joseph TD, Bose SK. A heat-labile protein of *C. trachomatis* binds to HeLa cells and inhibits the adherence of chlamydiae. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991;88:4054-4058.
188. Joseph TD, Bose SK. Surface components of HeLa cells that inhibit cytoadherence of *C. trachomatis*. *FEMS Microbiol Lett.* 1992;70:177-180.
189. Joyner JL, Douglas JM Jr, Foster M & Judson FN. Persistence of *Chlamydia trachomatis* infection detected by PCR in untreated patients. *Sexually Transmitted Diseases* 2002; 29: 196-200.
190. Kamwendo F, Forslin L, Bodin L & Danielsson D. Decreasing incidences of gonorrhoea- and chlamydia- associated acute pelvic inflammatory disease. A 25-years study from an urban area of central Sweden. *Sexually Transmitted Diseases* 1996; 23:384-391.
191. Katz BP, Danos CS, Quinn TS, et al. Efficiency and cost effectiveness of field follow-up for patients with *C. trachomatis* infection in a sexually transmitted diseases clinic. *Sex Transm Dis.* 1988;15:11-16.
192. Katz BP, Fortenberry D, Orr DP. Factors affecting chlamydial persistence or recurrence one and three months after treatment. In: Stephens RS, Byrne GI, Christiansen G, et al, eds. *Chlamydial Infections : Proceedings of the 9th International Symposium on Human Chlamydial Infections.* International Chlamydia Symposium, San Francisco, 1998:35-38.
193. Keat A. Extragenital *Chlamydia trachomatis* infection as sexually-acquired reactive arthritis. *J. Infect.* 1992;25:1:47-49.
194. Kellogg JA, Seiple JW & Hick ME. Cross-reaction of clinical isolates of bacteria and yeasts with the chlamydiazyme test for chlamydial antigen, before and after use of a blocking reagent. *American Journal of Clinical Pathology* 1992; 97: 309-312.
195. Kellogg JA, Seiple JW, Klinedinst JL & Stroll E. Diff-Quik stain as a simplified alternative to Papanicolaou stain for determination of quality of endocervical specimens submitted for PCR detection of *Chlamydia trachomatis*. *Journal of Clinical Microbiology* 1996;34: 2590-2592.
196. Kellogg JA, Seiple JW, Klinedinst JL et al. Improved PCR detection of *Chlamydia trachomatis* by using an altered method of specimen transport and high-quality endocervical specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 1995; 33: 2765-2767.
197. Kellogg, J. A., J. W. Seiple, J. L. Klinedinst, and E. S. Stroll. Impact of endocervical specimen quality on apparent prevalence of *Chlamydia trachomatis* infections diagnosed using polymerase chain reaction, abstr.C-494, p.86. In *Abstracts of the*

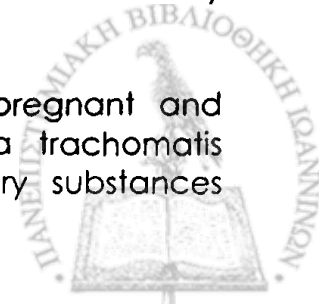


95th General Meeting of the American Society for Microbiology 1995. American Society for Microbiology, Washington, DC. 1995.

198. Kessler HH, Pierer K, Stuenzner D, Auer-Grumbach P, Haller EM, Marth E. Rapid detection of *Chlamydia trachomatis* in conjunctival, pharyngeal, and urethral specimens with a new polymerase chain reaction assay. *Sex Transm Dis*. 1994 Jul-Aug; 21(4):191-5.
199. Kohl KS, Sternberg MR, Markowitz LE, Blythe MJ, Kissinger P, Lafferty WE, et al. Screening of males for *C. trachomatis* and *N. gonorrhoeae* infections at STD clinics in three US cities-Indianapolis, New Orleans, Seattle. *Int J STD AIDS*. 2004;15:822-8.
200. Krech, T., M. Bleckmann, and R. Paatz. Comparison of Buffalo Green Monkey cells and McCoy cells for isolation of *Chlamydia trachomatis* in a microtiter system. *J. Clin. Microbiol*. 1989;27:2364-2365.
201. Kuipers, J., K. Scharmann, J. Wollenhaupt, E. Nettelbreker, S. Hopf, and H. Zeidler. Sensitivities of PCR, MicroTrak, ChlamydiaEIA, IDEIA, and PACE 2 for purified *C. trachomatis* elementary bodies in urine, peripheral blood, peripheral blood leukocytes, and synovial fluid. *J. Clin. Microbiol*. 1995;33:3186-3190.
202. Kuo C-C. Cultures of *C. trachomatis* in mouse peritoneal macrophages: Factors affecting organism growth. *Infect Immun*. 1978;20:439-445.
203. Kuo CC. Host response. In: Barron AL, ed. *Microbiology of Chlamydia*. Boca Raton, Fla: CRC Press; 1988:193-208.
204. Kuo, C.-C., S.-P. Wang, B.B. Wentworth, and J.T. Grayston. Primary isolation of TRIC organisms in HeLa 229 cells treated with DEAE-dextran. *J. Infect. Dis*. 1972;125:665-668
205. Kutlin A, Flegg C, Stenzel D, et al. Ultrastructural study of *Chlamydia pneumoniae* in a continuous-infection model. *J Clin Microbiol*. 2001;39:3721-3.
206. Laga, M., A. Manoka, M. Kiuvu, B. Malele, M. Tuliza, N. Nzila, J. Gowman, et al. Non-ulcerative sexually transmitted diseases as risk factors for HIV-1 transmission in women: results from a cohort study. *AIDS* 1993;7:95-102.
207. LaMontagne DS, Fine DN, Marrazzo JM. *Chlamydia trachomatis* infection in asymptomatic men. *Am J Prev Med*. 2003;24:36-42.
208. Lampe MF, Suchland RJ, Stamm WE. Nucleotide sequence of the variable domains within the major outer membrane protein gene from serovariants of *C. trachomatis*. *Infect. Immun*. 1993;61:213-219
209. Lampe, M.F., R.J. Suchland, and W.E. Stamm. Nucleotide sequence of the variable domains within the major outer membrane protein gene from serovariants of *Chlamydia trachomatis*. *Infect. Immun*. 1993; 61:213-219.



210. Lauhio A, Leirisalo-Repo M, Lahdevirta J, et al. Double-blind, placebo-controlled study of three-month lymecycline course in reactive arthritis with special reference to Chlamydia arthritis. *Arthritis Rheum.* 1991;34:6-14.
211. Lennette et al.,1995
212. Les chlamydioses urogenitales en France en 1996. Reseau National de Sante Publique
213. Levine WC, Dicker-LW, Devine O, Mosure DJ. Indirect estimation of Chlamydia screening coverage using public health surveillance data. *Am J Epidemiol.* 2004;160:91-6.
214. Lindner K. Zur aetiologie der gonokokkenfreien urethritis. *Wien Klin Wochenschr.* 1910;23:283-284.
215. Little, M. C., J. Andrews, R. Moore, S. Bustos, L. Jones, et al. Strand displacement amplification and homogeneous real-time detection incorporated in a second-generation DNA probe system, BDProbeTecET. *Clin. Chem* 1999;45:777-784.
216. Loeffelholz, M.J., C.A.Lewinski, S.R. Silver, A.P. Purohit, S.A. Herman, D.A. Buonagurio, and E.A. Dragon. Detection of Chlamydia trachomatis in endocervical specimens by polymerase chain reaction. *J.Clin.Microbiol.* 1992;30:2847-2851.
217. Λώλης Ε. Δ. Γυναικολογία και Μαιευτική. Φλεγμονές των γεννητικών οργάνων της γυναίκας. 1995;1: 203-250.
218. Mabey D, Bailey R, Faal H, et al. Azithromycin in control of trachoma 2. Community based treatment of trachoma with oral azithromycin: A one year follow-up study in the Gambia. In: Stephens RS, Byrne GI, Christiansen G, et al, eds. Chlamydial Infections: Proceedings of the 9th International Symposium on Human Chlamydial Infection. International Chlamydia Symposium, San Francisco, 1998: 351-354.
219. Mabey, D. C., A. W. Solomon, and A. Foster. Trachoma. *Lancet* 2003;362:223-229.
220. Mabey, D. C., T. Forsey, and J. D. Treharne. Serotypes of C.trachomatis in the Gambia. *Lancet* 1987:452.
221. Madhavan HN. Laboratory investigations on viral and Chlamydia trachomatis infections of the eye: Sankara Nethralaya experiences. *Indian J Ophthalmol.* 1999 Dec;47(4):241-6.
222. Magder, L. S., H. R. Harrison, J. M. Ehret, T. S. Anderson, and F. N. Judson. Factors related to genital C.trachomatis and its diagnosis by culture in a sexually transmitted disease clinic. *Am. J. Epidemiol.* 1988;28:298-308.
223. Mahony J, Chong S, Jang D et al. Urine specimens from pregnant and nonpregnant women inhibitory to amplification of Chlamydia trachomatis nucleic acid by PCR, LCR and TMA : identification of urinary substances



associated with inhibition and removal of inhibitory activity. *Journal of Clinical Microbiology* 1998; 36: 3122-3126.

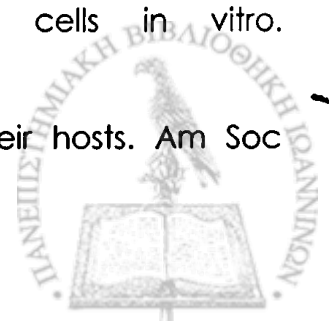
224. Mahony JB, Luinstra KE, Jang D et al. Chlamydia trachomatis confirmatory testing of PCR-positive genitourinary specimens using a second set of plasmid primers. *Molecular and Cellular Probes* 1992; 6: 381-388.
225. Mahony JB, Luinstra KE, Sellors JW & Chernesky MA. Comparison of plasmid- and chromosome-based polymerase chain reaction assays for detecting Chlamydia trachomatis nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology* 1993; 31: 1753-1758.
226. Mahony, J. B., and M. A. Chernesky. Effect of swab type and storage temperature on the isolation of Chlamydia trachomatis from clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 1985;22:865-867.
227. Malathi J, Madhavan HN, Therese KL, Joseph PR. A hospital based study on the prevalence of conjunctivitis due to Chlamydia trachomatis. *Indian J Med Res.* 2003 Feb; 117:71-5.
228. Malaty R, Zaki S, Said Me, et al. Extraocular infections in children in areas with endemic trachoma. *J Infect Dis.* 1981;143:853.
229. Marazzo JM, Stamm WE. New approaches to the diagnosis, treatment, and prevention of chlamydial infection. In: Remington JS, Swartz MN, eds. *Current clinical topics in infectious diseases*. 18th ed. Boston: Blackwell Science, 1998;37-59.
230. Mardh PA & Wolner-Hanssen P. Periappendicitis and chlamydial salpingitis. *Surgery, Gynecology & Obstetrics* 1985;160: 304-306.
231. Marrazzo JM, White CL, Krekeler B, et al. Community-based urine screening for Chlamydia trachomatis with a LCR assay. *Ann Intern Med* 1997;127:796-803.
232. Martin DH, Nsuami M, Schachter J, Hook EW 3rd, Ferrero D, Quinn TC, et al. Use of multiple nucleic acid amplification tests to define the infected-patient "gold standard" in clinical trials of new diagnostic tests for Chlamydia trachomatis infections. *J.Clin.Microbiol.* 2004;42:4749-58.
233. Martin JL, Alexander SY, Selwood TS & Cross GF. Use of the polymerase chain reaction for the detection of Chlamydia trachomatis in clinical specimens and its comparison to commercially available tests. *Genitourinary Medicine* 1995; 71: 169-171.
234. Martin, D. H. Chlamydial infections. *Med. Clin. North Am.* 1990;74:1367-1387
235. Mashauan HN, Roy S, Malathy J. In vitro activities of tetracyclin and ciprofloxacin against C. trachomatis isolates from conjunctivitis patients. *Indian J Med Res* 1996;103:138-141.



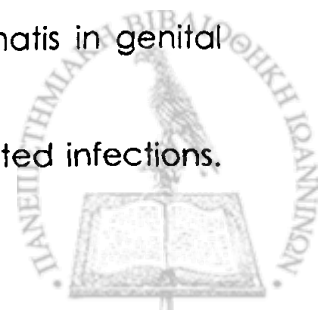
236. Mathews, S., C. George, C. Flegg, D. Stenzel, and P. Timms. Differential expression of ompA, ompB, pyk, nlpD and Cpn0585 genes between normal and interferon- γ treated cultures of *Chlamydia pneumoniae*. *Microb. Pathog.* 2001;30:337-345.
237. Matsumoto, A. Structural characteristics of chlamydial bodies, p.21-45. In A. L. Baron (cd.), *Microbiology of Chlamydia*. CRC Press, Boca Raton, Fla. 1988.
238. McCormack WM, Alpert S, McComb DE, Nichols RL, Semine DZ, Zinner SH. Fifteen-month follow up study of women infected with *C.trachomatis*. *N Engl J Med.* 1979;300:123-125. -
239. McGregor JA, French JI. *Chlamydia trachomatis* infection during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 1991;164:1782-1789.
240. McNagny, S. E., R. M. Parker, J. M. Zenilman, and J. S. Lewis. Urinary leukocyte esterase test: A screening method for the detection of asymptomatic chlamydial and gonococcal infections in men. *J. Infect. Dis.* 1992;165:573-576.
241. Mehta SD, Rothman RE, Kelen GD, Quinn TC, Zenilman JM. Unsuspected gonorrhoea and chlamydia in patients of an urban adult emergency department. A critical population for STD control intervention. *Sex. Transm. Dis.* 2001;28:33-39.
242. Mertz KJ, Ransom RL, St Louis ME et al. Prevalence of genital chlamydia infection in young women entering a national job training program, 1990-1997. *American Journal of Public Health* 2001; 91:1287-1290.
243. Meyer K.F. The host spectrum of psittacosis – lymphogranuloma venereum (PL) agents. *Am. J. Ophthalmol.* 1967;63:1225-1246.
244. Miller ME, Dyer IE, Richwald GA, et al. Chlamydia screening of Los Angeles high school students using urine ligase chain reaction assay. In: Stephens RS, Byrne GI, Christiansen G, et al, eds. *Chlamydial Infections : Proceedings of the 9th International Symposium on Human Chlamydial Infections*. International Chlamydia Symposium, San Francisco, 1998:289-292.
245. Miller WC, Ford CA, Morris M, Handcock MS, Schmitz JL, Hobbs MM, et al. Prevalence of chlamydial and gonococcal infections among young adults in the United States. *JAMA.* 2004;291:2229-36.
246. Modarress KL, Cullen AP, Jaffurs WJ Sr, et al. Detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in swab specimens by the Hybrid Capture II and Pace 2 nucleic acid probe tests. *Sex Transm Dis.* 1999;26:303-8.
247. Moller JK, Ostergaard L & Hansen JT. Clinical evaluation of four non-related techniques for detection of *Chlamydia trachomatis* in endocervical specimens. *Immunology and Infectious Diseases* 1994; 4: 191-196.
248. Moncada, J., J. Schachter, M. Shipp, G. Bolan, and J. Wilber. Cytobrush in collection of cervical specimens for detection of *Chlamydia trachomatis*. *J. Clin. Microbiol.* 1989;27:1863-1866.



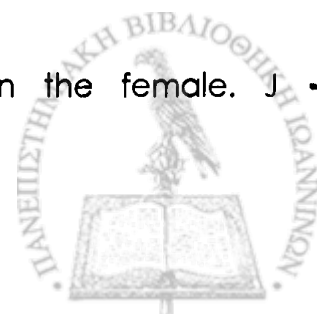
249. Moncada, J., Schachter, J., Bolan, G. et al. Confirmatory assay increases specificity of the Chlamydiazyme test for Chlamydia trachomatis infection of the cervix. *J. Clin. Microbiol.* 1990;28:1770-1773.
250. Mondesire RR, Maclean IW, Shewen PE, et al. Identification of genus-specific epitopes of the outer membrane complexes of *C. trachomatis* and *C. psittaci* immunotypes 1 and 2. *Infect Immun.* 1989;57:2914-2918.
251. Money DM, Hawes SE, Eschenbach DA et al. Antibodies to the chlamydial 60 kd heat-shock protein are associated with laparoscopically confirmed perihepatitis. *American Journal of Obstetrics & Gynecology* 1997; 176:870-877.
252. Monstein HJ, Kihlstrom E, Tiveljung A. Detection and identification of bacteria using in-house broad range 16S rDNA PCR and genus-specific DNA hybridization probes, located within variable regions of 16S rRNA genes. *APMIS* 1996;104:451-458.
253. Morre SA, Van Valkengoed IG, Moes RM, Boeke AJ, Meijer CJ, Van den Brule AJ. Determination of chlamydia trachomatis prevalence in an asymptomatic screening population: performances of the LCx and COBAS Amplicor tests with urine specimens. *J Clin Microbiol.* 1999; 37:3092-3096.
254. Morrison RP, Belland RJ, Lyng K, et al. Chlamydial disease pathogenesis: 57kD chlamydial hypersensitivity antigen is a stress response protein. *Exp Med.* 1989;170:1271-1283.
255. Morrison RP, Feilzer K & Tumas DB. Gene knockout mice establish a primary protective role for major histocompatibility complex class II-restricted responses in Chlamydia trachomatis genital tract infection. *Infection and Immunity* 1995; 63: 4661-4668.
256. Moss, T.R., S. Darougar, R.M. Woodland, M. Nathan, R.J. Dines, and V. Cathrine. Antibodies to Chlamydia Species in patients attending a genitourinary clinic and the impact of antibodies to *C. pneumoniae* and *C. psittaci* on the sensitivity and the specificity of *C. trachomatis* serology tests. *Sex. Transm. Dis.* 1993;20:61-65.
257. Moulder J.W., T.P. Hatch, C.C. Kuo, J. Schachter and J. Storz. 1984. Order II. Chlamydiales. Storz and Page 1971;334:729-739. In N.R. Krieg and J.G. Holt (ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 1. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
258. Moulder JW, Levy NJ, Schulman RP. Persistent infection of mouse fibroblast (L cells) with Chlamydia psittaci: evidence for a cryptic chlamydial form. *Infect Immun.* 1980;30:874-83.
259. Moulder JW. Interaction of Chlamydiae and host cells in vitro. *Microbiol. Rev.* 1991;55:143-190
260. Moulder JW. Looking at chlamydiae without looking at their hosts. *Am Soc Microbiol News.* 1984;50:353-362.



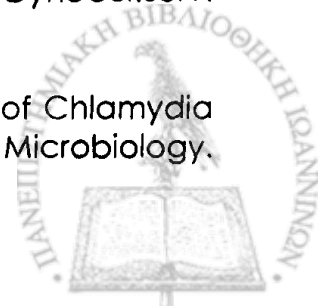
261. Moulder, J.W. The relation of the psittacosis group (Chlamydiae) to bacteria and viruses. *Annu. Rev. Microbiol.* 1966;20:107-130.
262. Mouton JW, Verkooyen R, van der Meijden WI et al. Detection of *Chlamydia trachomatis* in male and female urine specimens by using the amplified *Chlamydia trachomatis* test. *Journal of Clinical Microbiology* 1997; 35: 1369-1372.
263. Myhre EB, Mardh PA. Unusual manifestations of *C.trachomatis* infections. *Scand. J Infect Dis* 1982;32 Suppl:122.
264. Naher H, Drzonek H, Wolf J et al. Detection of *C. trachomatis* in urogenital specimens by polymerase chain reaction. *Genitourinary Medicine* 1991; 67: 211-214.
265. Newhall WJ 5th. Biosynthesis and disulfide cross-linking of outer membrane components during the growth cycle of *C.trachomatis*. *Infect Immun.* 1987;55:162-168.
266. Newhall WJ, Johnson RE, DeLisle S, et al. Head-to-head evaluation of five chlamydia tests relative to a quality-assured culture standard. *J Clin Microbiol* 1999;37:681-5.
267. Newhall WJ., Batteiger VB., Jones RB. Analysis of the human serological response to proteins of *C. trachomatis*. *Infect Immun.* 1982;38:1181-1189.
268. Newhall, W. J. T. Biosynthesis and disulfide cross-linking of outer membrane components during the growth cycle of *Chlamydia trachomatis*. *Infect. Immun.* 1987;55:162-168.
269. Norman J MD. Epidemiology of female genital *Chlamydia trachomatis* infections. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynecology.* 2002;Vol. 16, No.6,pp.775-787.
270. Norman J. Epidemiology of female genital *Chlamydia trachomatis* infections. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2002;16:775-787.
271. Nurminen, M., M. Leinonen, P Saikku and P.H. Makela. The genus-specific antigen of *Chlamydia*: resemblance to the lipopolysaccharide of enteric bacteria. *Science.* 1983;220:1279-1281.
272. Oakeshott P, Hay P. General practice update: chlamydia infection in women. *Br J Gen Pract* 1995;45:615-620.
273. Oh MK, Cloud GA, Baker SL, et al. Chlamydial infection and sexual behavior in young pregnant teenagers. *Sex Transm Dis.* 1993;20:45-50.
274. Oriel JD and Ridgway GL. Morphology and nature of *C.trachomatis* in genital infection by *C.trachomatis* pp.7-8 Edward Arnold. 1982.
275. Orr DR, Fortenberry JB. Screening adolescents for sexually transmitted infections. *JAMA.* 1998;280:654-655.



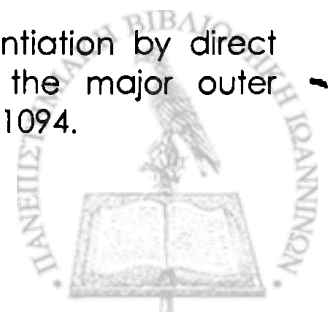
276. Osser S, Persson K. Chlamydial antibodies and deoxyribonucleic acid in patients with ectopic pregnancy. *Fertil Steril*. 1992; 57: 578-582.
277. Ossewaarde JM, Rieffe M, Rozenberg Arska M et al. Development and clinical evaluation of a polymerase chain reaction test for detection of *Chlamydia trachomatis*. *Journal of Clinical Microbiology* 1992; 30: 2122-2128.
278. Ostergaard L, Andersen B, Moller JK & Olesen F. Home sampling versus conventional swab sampling for screening of *Chlamydia trachomatis* in women: a cluster-randomized 1-year follow-up study. *Clinical Infectious Diseases* 2000; 31: 951-957.
279. Ostergaard L, Andersen B, Olesen F & Moller JK. Efficacy of home sampling for screening of *Chlamydia trachomatis*: randomised study. *British Medical Journal* 1998; 317: 26-27.
280. Ostergaard L, Birkelund S & Christiansen G. Use of polymerase chain reaction for detection of *Chlamydia trachomatis*. *Journal of Clinical Microbiology* 1990; 28: 1254-1260.
281. Ostergaard L, Moller JK, Andersen B & Olesen F. Diagnosis of urogenital *Chlamydia trachomatis* infection in women based on mailed samples obtained at home: multipractice comparative study. *British Medical Journal* 1996; 313: 1186-1189.
282. Ostergaard L, Moller JK. Use of PCR and direct immunofluorescence microscopy for confirmation of results obtained by Syva MicroTrak *Chlamydia* enzyme immunoassay. *Journal of Clinical Microbiology* 1995; 33: 2620-2623.
283. Ostergaard L. Detection of *Chlamydia trachomatis* in a low prevalence population. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 1995; 14: 471-472.
284. Ostergaard L. diagnosis of urogenital *Chlamydia trachomatis* infection by use of DNA amplification. *APMIS* 1999; 89: 5-36.
285. Ostergaard L., Microbiological aspects of the diagnosis of *Chlamydia trachomatis*. *Best Practice & Research Clin. Obst. And Gynaec.* 2002 16: 789-799.
286. Ovetchkine P. La lutte contre la resistance aux antibiotiques passe aussi par l'information aux parents. *Arch Pediatr.* 1999; 6: 321-323.
287. Paavonen J, Kiviat N, Brunham RC, et al. Prevalence and manifestations of endometritis among women with cervicitis. *Am J Obstet Gynecol.* 1985; 152: 280-286.
288. Paavonen J. Genital *Chlamydia trachomatis* infections in the female. *J Infect.* 1992; 25 (Suppl 1): 39-45



289. Page LA .Rension of the family Chlamydiaceae (Rake).Int J Syst Bact. 1966;16:233-252.
290. Page, L. A. Proposal for the recognition of two species in the genus Chlamydia. Jones, Rake and Stearns, 1945. Int.J.Syst.Bacteriol. 1968;18:51-66.
291. Paisley, J.W., B.A.Lauer, P.Melinkovich, B.A.Gitterman, D.J.Feiten, and S.Berman. Rapid diagnosis of Chlamydia trachomatis pneumonia in infants by direct immunofluorescence microscopy of nasopharyngeal secretions. J.Pediatr.1986;109:653-655.
292. Palladino S, Pearman JW, Kay ID, Smith DW, Harnett GB, Woods M, Marshall L, McCloskey J. Diadnosis of chlamydia trachomatis and neisseria gonorrhoeae genitourinary infections in males by the Amplicor PCR assay of urine. Diagn Microbiol Infect Dis. 1999;33:141-146.
293. Palmer L & Falkow S. A common plasmid of Chlamydia trachomatis. Plasmid 1986; 16: 52-62.
294. Palmer L, Falkow S. A common plasmid of C.trachomatis. Plasmid. 1986;16:52-62.
295. Parks KS, Dixon PB, Richey CM & Hook EW 3rd. Spontaneous clearance of Chlamydia trachomatis infection in untreated patients. Sexually Transmitted Diseases 1997; 24(4) 229-235.
296. Pasternack, R., P.Vuorinen, T. Pitkajarvi, M.Koskela, and A. Miettinen. Comparison of manual Amplicor PCR, COBAS Amplicor , and LCx assays for the detection of Chlamydia trachomatis infection in women using urine specimens. J.Clin. Microbiol. 1977;35:402-405.
297. Patton DL, et al. Demonstration of delayed hypersensitivity in Chlamydia trachomatis salpingitis in monkeys. A pathogenic mechanism of tubal damage. J Infect Dis. 1994;169:680-683.
298. Patton DL, KuoCC, Wang SP, et al. Distal tubal obstruction induced by repeated C.trachomatis salpingeal infections in pigtailed macaques. J Infect Dis. 1987;155:1292-1299.
299. Patton DL, Taylor HR. The histopathology of experimental trachoma: Ultrastructural changes in the conjunctival epithelium. J Infect Dis. 1986;153:870-878.
300. Patton DL. et al. Host response to primary C.trachomatis infection of the fallopian tub in pig-tailed monkeys. Fertil Steril. 1983;40:829-840.
301. Pearlman, M. D., and S. G. McNeeley. A review of the microbiology, immunology, and clinical implications of C.trachomatis infections.Obstet. Gynecol.Surv. 1992;47:448-461.
302. Pedersen LN, Kjaer HO, Moller JK et al. High-resolution genotyping of Chlamydia trachomatis from recurrent urogenital infections. Journal of Clinical Microbiology. 2000; 38: 3068-3071.



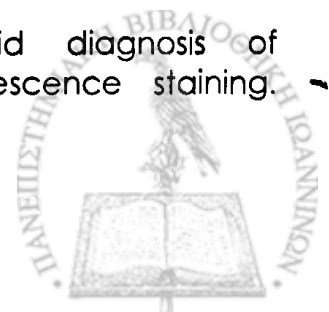
303. Peeling R, Peeling J, Brunham R. High-resolution ³¹P nuclear magnetic resonance study of *C. trachomatis*: Induction of ATPase activity in elementary bodies. *Infect Immun.* 1989;57:3338-3344.
304. Peeling RW, Bailey RL, Conway DJ, et al. Antibody response to the 60-kDa chlamydial heat-shock protein is associated with scarring trachoma. *J Infect Dis.* 1998;177:256-259.
305. Peeling RW, Kimani J, Plummer F, et al. Antibody to chlamydial hsp60 predicts an increased risk for chlamydial pelvic inflammatory disease. *J Infect Dis.* 1997;175:1153-1158.
306. Pekka Al Saikku. Chlamydia. Chapt.236, *Infectious Diseases*, 2nd ed, Vol.2. 2004.
307. Pereira LH, Embil JA, Haase DA, et al. Cytomegalovirus infection among women attending a sexually transmitted disease clinic: Association with clinical symptoms and other sexually transmitted diseases. *Am J Epidemiol.* 1990;131:683-692.
308. Perine PL, Osoba AO. Lymphogranuloma venereum. In: Holmes KK, Mardh PA, Sparling PF, et al. eds. *Sex Transm Dis.* 2nd ed. New York: McGraw-Hill; 1990:195-204.
309. Persson K, Ronnerstam R, Svanberg L, et al. Neonatal chlamydial eye infection: An epidemiological and clinical study. *Br J Ophthalmol.* 1983; 67:700-704.
310. Peterson EM, Markoff BA, Schachter J & de la Maza LM. The 7.5-kb plasmid present in *Chlamydia trachomatis* is not essential for the growth of this microorganism. *Plasmid* 1990; 23: 144-148.
311. Peterson EM, Markoff BA, Schachter J, De la Maza LM. The 7.5 Kb plasmid present in *C. trachomatis* is not essential for the growth of the microorganism. *Plasmid.* 1990;23:144-148.
312. Phillips LE, Smith PB, Riddle GD et al. Ortho enzyme immunoassay versus McCoy cell monolayers stained by iodine or fluorescent antibody for detection of *Chlamydia trachomatis*. *Journal of Clinical Microbiology* 1990; 28: 1647-1648.
313. Pimenta JM, Catchpole M, Rogers PA, Perkins E, Jackson N, Carlisle C, et al. Opportunistic screening for genital chlamydial infection. I: acceptability of urine testing in primary and secondary healthcare settings. *Sex Transm Infect.* 2003;79:16-21.
314. Piot P, Plummer FA. Genital ulcer adenopathy syndrome. In: Holmes KK, Mardh PA, Sparling PF, et al, eds. *Sex Transm Dis.* 2nd ed. New York: McGraw-Hill ;1990:711-716.
315. Poole E & Lamont I. *Chlamydia trachomatis* serovar differentiation by direct sequence analysis of the variable segment 4 region of the major outer membrane protein gene. *Infection and Immunity* 1992; 60:1089-1094.



316. Postema EJ. Epidemiology of genital Chlamydia infections in patient with Chlamydia conjunctivitis: a retrospective study. *J Genitorum Med* 1996;72:203-205.
317. Πουρναρόπουλος Γ., Άπαντα: Ιπποκράτης.
318. Pudjiatmoko, H., Y. Fukushi, Y. Ochiai, T. Yamaguchi. And K. Hirai. Phylogenetic analysis of the genus Chlamydia based on 16S rRNA gene sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1997;47:425-431.
319. Puolakkainen, M., E. Hiltunen-Back, T. Reunala, S. Suhonen, P. Lahteenmaki, M. Lehtinen, and J. Paavonen. Comparison of performances of two commercially available tests, a PCR assay a LCR test, in detection of urogenital Chlamydia trachomatis infection. *J.Clin.Microbiol.* 1998;36: 1489-1493.
320. Quinn TC, Gaydos C, Shepherd M et al. Epidemiologic and microbiologic correlates of Chlamydia trachomatis infection in sexual partnerships. *Journal of the American Medical Association.* 1996; 276: 1737-1742.
321. Quinn TC, Warfield P, Kappus E et al. Screening for Chlamydia trachomatis infection in an inner-city population: a comparison of diagnostic methods. *Journal of Infectious Diseases.* 1985; 152: 419-423.
322. Quinn TCMDM, Gaydos CD, Shepherd MMS et al. Epidemiologic and Microbiologic Correlates of Chlamydia trachomatis Infection in sexual partneships. *Journal of the American Medical Association.* 1996; 276:1737-1742.
323. R.W.Peeling & P.F.Sparling : *Methods in Molecular Medicine, Vol.20: Sexually Transmitted Diseases: Methods and Protocols.* Humana Press Inc.,Totowa,NJ.
324. Rae, R. et al. Chlamydial serologic stydies and recurrent spontaneous abortion. *Am J Obstet Gynecol.* 1994;170:782-785.
325. Raeymaekers, L. Basic principles of quantitative PCR. *Mol. Biotechnol.* 2000;15:115-122.
326. Rahm VA, Gnarpe H, Odvind V. Chlamydia trachomatis among sexually active teenage girls. Lack of correlation between chlamydial infection, history of the patient and clinical signs of infection. *Br J Obstet Gynaecol.* 1988;95:916-919.
327. Rahman MU, Hudson AP, Schumacher HR Jr. Chlamydia and Reiter's syndrome (reactive arthritis) *Rheum Dis Clin North Am.* 1992;18:67-79.
328. Rani, R., G. Corbitt, R. Killough, and E. Curless. Is there any role for rapid tests for C. trachomatis? *Int. Sex. Transm. Dis. AIDS* 2002;13:22-24.
329. Rank RG, Ramsey KH, Pack EA, et al. Effect of gamma interferon on resolution of murine chlamydial genital infection. *Infect Immun.* 1992;60:4427-4429.



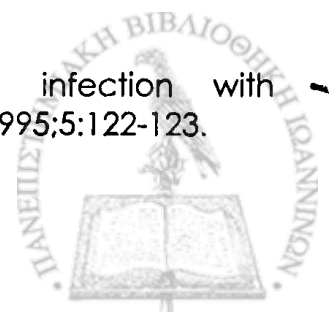
330. Rapoza, P.A., T.C. Quinn, L.A. Kiessling, W.R. Green, and H.R. Taylor. Assessment of neonatal conjunctivitis with a direct fluorescent monoclonal antibody stain for Chlamydia. *JAMA*. 1986;255:3369-3373.
331. Rasmussen SJ, Eckmann L, Quayle AJ, et al. Secretion of proinflammatory cytokines by epithelial cells in response to Chlamydia infection suggests a central role for epithelial cells in chlamydial pathogenesis. *J Clin Invest*. 1997;99:77-87.
332. Ratti G, Moroni A & Cevenini R. Detection of Chlamydia trachomatis DNA in patients with non-gonococcal urethritis using the polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Pathology* 1991; 44: 564-568.
333. Reesink-Peters N, Ossewaarde JM, van der Zee AG et al. No association of anti-Chlamydia trachomatis antibodies and severity of cervical neoplasia. *Sexually Transmitted Infections* 2001; 77:101-102.
334. Register KB, Morgan PA, Wyrick PB. Interaction between Chlamydia spp. and human polymorphonuclear leukocytes in vitro. *Infect Immun*. 1986;52:664-670.
335. Reitmeijer CA, Yamaguchi KJ, Ortiz CG, et al. Feasibility and yield of screening urine for C.trachomatis by polymerase chain reaction among high-risk male youth in field-based and other nonclinic settings. *Sex Transm Dis*. 1997;24:429-435.
336. Ridker P. Inflammation, infection and cardiovascular risk: How good is the clinical evidence; *Circulation*. 1988;97:1671.
337. Rietmeijer, C. A. M., F. N. Judson, M. B. van Hensbroek, J. M. Ehret, and J. M. Douglas, Jr. Unsuspected C.trachomatis infection in heterosexual men attending a sexually transmitted diseases clinic: evaluation of risk factors and screening methods. *Sex. Transm. Dis*. 1991;18:28-35.
338. Ripa KT & Mardh PA. Cultivation of Chlamydia trachomatis in cycloheximide-treated McCoy cells. *Journal of Clinical Microbiology* 1977; 6: 328-331.
339. Ripa T. Epidemiologic control of genital C.trachomatis infections. *Scand J infect Dis*. 1990;69(Suppl):157-167.
340. Rockey DD, Grosenbach D, Hruby DE, et al. C.psittaci IncA is phosphorylated by the host cell and is exposed on the cytoplasmic face of the developing inclusion. *Mol Microbiol*. 1997;24:217-228.
341. Rockey, D. D. 2002. Chlamydial interactions with host cells: recent progress and remaining issues. *In* J. Schachter, et al., Chlamydial infections: Proceedings of the 10th International Symposium on Human Chlamydial Infections, June 16-21, 2002, Antalya, Turkey. International Chlamydia Symposium, San Francisco, Calif.
342. Rompalo, A.M., R.J. Suchland, C.B. Price, and W.E. Stamm. Rapid diagnosis of Chlamydia trachomatis rectal infection by direct fluorescence staining. *J.Infect.Dis*. 1987;155:1075-1076.



343. Ronnerstam R, Persson K, Hansson H, et al. Prevalence of chlamydial eye infection in patients attending an eye clinic, a VD clinic, and in healthy persons. *Br J Ophthalmol.* 1985;69:385-388.
344. Roosendaal R, Walboomers JM, Veltman OR et al. Comparison of different primer sets for detection of *Chlamydia trachomatis* by the polymerase chain reaction. *Journal of Medical Microbiology* 1993; 38:426-433
345. Rothermel CD, Byrne GI, Havell EA. Effect of interferon on the growth of *C.trachomatis* in mouse fibroblasts (L cells). *Infect Immun.* 1983;39:362-370.
346. Rothermel, C. D., J. Schachter, P. Lavrich, E. C. Lipsitz, and T. Francus. *Chlamydia trachomatis* - induced production of interleukin-1 by human monocytes. *Infect. Immun.* 1989;57:2705-2711.
347. Ruggao S, Sirirungsi W, Vannareumol P, Leechanachai P, Wongtrangarn S, Niyomka P, Luangsuk P, Thanuthumjaroen W, Mahaprom S, Chandrawongsen W. Isolation of *chlamydia trachomatis* among women with symptoms of lower genital tract infection. *J Med Assoc Thai.* 1993;76:475-481.
348. Ryan G, Abdella T, McNeeley G et al. *Chlamydia trachomatis* infection in pregnancy and effect of treatment on outcome. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 1990;162: 34-39.
349. Salmon, V. C., B. R. Kenyon, J. C. Overall, Jr., and R. Anderson. 1994. Use of a universal transport media in a commercial polymerase chain reaction assay for *Chlamydia trachomatis*, abstr. S7, p. 33. Abstracts of the 10th Annual Clearwater Virology Symposium 1994.
350. Salpietro CD, G Bisignano, F Fulia, A Marino, I Barberi. La conjonctivite a *C.trachomatis* du nouveau-ne. *Arch Pediatr* 1999;6:317-320.
351. Schachter , J., E. Stoner, and J. Moncada. Screening for chlamydial infections in women attending family planning clinics. *West. J. Med.* 1983;138:375-379.
352. Schachter , West SK, Mabey D, et al. Azithromycin in control of trachoma. *Lancet.* 1999;354:630-5
353. Schachter J, West S, Mabey D, et al. Azithromycin in control of trachoma 3. Effect of treatment on *C.trachomatis* infection in trachoma. In: Stephens RS, Byrne GI, Christiansen G, et al, eds. *Chlamydial Infections: Proceedings of the 9th International Symposium on Human Chlamydial Infection.* International Chlamydia Symposium, San Francisco, 1998:347-350.
354. Schachter J, Caldwell HD. *Chlamydiae.* *Ann Rev Microbiol.* 1980;34:285-309.
355. Schachter J, Hill EC, King EB, et al. *Chlamydia trachomatis* and cervical neoplasia. *JAMA.* 1982;248:2134-2138.



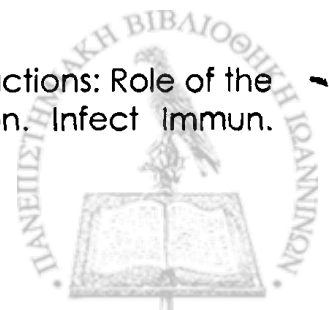
356. Schachter J, McCormack WM, Chernesky MA, Martin DH, Van Der Pol B, Rice PA, et al. Vaginal swabs are appropriate specimens for diagnosis of genital tract infection with *C.trachomatis*. *J.Clin.Microbiol.* 2003;41:3784-9.
357. Schachter J, Stamm WE & Quinn TC. Discrepant analysis and screening for *Chlamydia trachomatis*. *Lancet* 1996;348:1308-1309.
358. Schachter J., Dawson CR. *Human Chlamydial Infections*. Littleton, Mass: PSG Publishing; 1978:63-96.
359. Schachter J., Kidway G., Gollier L. *Chlamydial diseases*. In: Topley and Wilson's. *Microbiology and Microbial Infections*, 9th edition, 1988, p.977-994.
360. Schachter J. Evolution of diagnostic tests for C.T. infections. UCSF Chlamydia Research Laboratory, San Francisco, CA USA 3th Meeting of the European Society for Chlamydia, Austria, 11-19 Sept., 1966.
361. Schachter, J. Why we need a program for the control of *C.trachomatis*. *N. Engl. J. Med.* 1989; 320:802-804.
362. Schachter, J. *Chlamydia trachomatis*: the more you look, the more you find- how much is there? *Sex. Transm. Dis.* 1998;25:229-231.
363. Schachter, J., M. Grossman, R. L. Sweet, J. Holt, C. Jordan, and E. Bishop. Prospective study of perinatal transmission of *C.trachomatis*. *JAMA* 1986;255:3374-3377.
364. Schachter, J., and W.E. Stamm. *Chlamydia*, p.669-677. In P.R. Murray, M.A. Pfaller, F.C. Tenover, and R.H. Tenover (ed.) *Manual of clinical microbiology*, 6th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1995.
365. Schepetiuk, S., T. Kok, L. Martin, R. Waddell, and Higgins. Detection of *Chlamydia trachomatis* in urine samples by nucleic acid tests: comparison with culture and enzyme immunoassay of genital swab specimen. *J.Clin.Microbiol.* 1997;35:3355-3357.
366. Scholes D, Stergachis A, Heidrich F et al. Prevention of pelvic inflammatory disease by screening for cervical chlamydial infection. *New England Journal of Medicine* 1996; 334: 1362-1366.
367. Schubiner, H.H., W.D. LeBar, S. Joseph, C. Taylor, and C. Jemal. Evaluation of two rapid tests for the diagnosis of *Chlamydia trachomatis* genital infections. *Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis.* 1992;11:553-556.
368. Sexually Transmitted Disease Recourse - 2002. <http://www.herpes-coldsores.com/std/chlamydia.htm>
369. Sexually transmitted diseases quarterly report. Genital infection with *C.trachomatis* in England and Wales. *Comm Dis Rep CDR Rev* 1995;5:122-123.



370. Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2002. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2002; 51 (RR-6): 1-78. Accessed at www.cdc.gov/std/treatment/default.htm on 8 April 2005.
371. Shafer MA, Tebb KP, Pantell GH, Wibbelsman CJ, Neuhaus JM, Tipton AC, et al. Effect of a clinical practice improvement intervention on Chlamydial screening among adolescent girls, JAMA. 2002;288:2846-52.
372. Shariat H, Young M, Abedin M. An interesting case presentation: A possible new route for perinatal acquisition of chlamydia. J Perinatol. 1992;12:300-302.
373. Shattock, R. M., C. Patrizio, P. Simmonds, and S. Sutherland. Detection of *C. trachomatis* in genital swabs: comparison of commercial and in house amplification methods with culture. Sex. Transm. Infect. 1998;74:289-293.
374. Shepard MK, Jones RB. Recovery of *Chlamydia trachomatis* from endometrial and fallopian tube biopsies in women with infertility of tubal origin. Fertil Steril. 1989;52:232-238.
375. Smith JR, Murdoch J, Carrington D, et al. Prevalence of *C. trachomatis* infection in women having smear tests. BMJ 1991;302:82-84.
376. Solomon, A. W., M. J. Holland, M. J. Burton. S. K. West, N. D. Alexander, et al. Strategies for control of trachoma: observational study with quantitative PCR. Lancet 2003;362:198-204.
377. Solomon. A. W., R. W. Peeling, A. Foster, and D. C. W. Mabey. Diagnosis and assessment of trachoma. Clin. Microbiol. Reviews. 2004;982-1011.
378. Sriprakash KS & Macavoy ES. Characterization and sequence of a plasmid from the trachoma biovar of *Chlamydia trachomatis*. Plasmid 1987; 18: 205-214.
379. Sriprakash KS, Macavoy ES. Characterization and sequence of a plasmid from the trachoma biovar of *C. trachomatis*. Plasmid. 1987;18:205-214.
380. Stacey CM, Munday PE, Taylor-Robinson D et al. A longitudinal study of pelvic inflammatory disease. British Journal of Obstetrics and Gynaecology 1992; 99:994-999.
381. Stamm WE, Gle B. Asymptomatic *C. trachomatis* urethritis in men. Sex Transm Dis 1986;13:163-165.
382. Stamm WE, Tam M, Koester M & Cles L. Detection of *Chlamydia trachomatis* inclusions in McCoy cell cultures with fluorescein-conjugated monoclonal antibodies. Journal of Clinical Microbiology 1983; 17: 666-668.
383. Stamm WE, Cole B. Asymptomatic *Chlamydia trachomatis* urethritis in men. Sex Transm Dis. 1986;13:163-165.



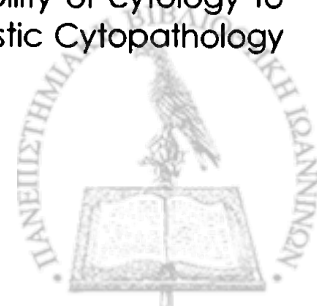
384. Stamm, W. E., L. A. Koutsky, J. K. Benedetti, J. L. Jourden, R. C. Brunham, and K. K. Holmes. *C.trachomatis* urethral infections in men. Prevalence, risk factors, and clinical manifestations. *Ann. Intern. Med.* 1984;100:47-51.
385. Stamm, W.E. et al. *C.trachomatis* infections of the adult. In *Sexually Transmitted Diseases*. K.K. Holmes et al., Eds. 1990:184-194. McGraw Hill. New York.
386. Stry A. Correct samples for diagnostic tests in sexually transmitted diseases: which sample for which test? *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 1999;24:455-459.
387. Stry,A.,M.Genc,C.Heller-Vitouch,and P.A.Mardh. Chlamydial antigen detection in urine samples by immunofluorescence tests. *Infection*. 1992;20:101-104.
388. Steingrimsson, O., K. Jonsdottir, J. H. Olafsson, S. M. Karisson, R. Palsdottir, and S. Davidsson. Comparison of Roche COBAS Amplicor and Abbott LDX for the rapid detection of *Chlamydia trachomatis* in specimens from high-risk patients. *Sex.Transm.Dis.* 1998;25:44-48.
389. Stenberg K, Mardh PA. Genital infection with *C.trachomatis* in patients with chlamydial conjunctivitis: Unexplained results. *Sex Trans Dis.* 1991;18:1-4.
390. Stenson S. Adult inclusion conjunctivitis: Clinical characteristics and corneal changes. *Arch Ophthalmol.* 1981;99:605-608.
391. Stephens RS, Kalman S, Lammel C, et al. Genome sequence of an obligate intracellular pathogen of humans:*C.trachomatis*. *Science*. 1998;282:754-759.
392. Stephens RS, Wagar EA, Schoolnik GM. High-resolution mapping of serovar-specific and common antigenic determinants of the major outer membrane protein of *C trachomatis*. *J Exp Med* 1988;167:817-831.
393. Stephens, R. S., K. Koshiyama, E. Lewis, and A. Kubo. Heparin-binding outer membrane protein of chlamydiae. *Mol. Microbiol.* 2001;40:691-699.
394. Stirling P, Richmond SJ. Production of outer membrane blebs during chlamydial replication. *FEMS Microbiol Lett.* 1980;9:103-105.
395. Stothard, D. R., J. A. Williams, B. Van Der Pol, and R. B. Jones. Identification of a *C.trachomatis* serovar E urogenital isolate which lacks the cryptic plasmid. *Infect. Immun.* 1998;66:6010-6013.
396. Sturm-Ramirez K, Brumblay H, Diop K, Gueye-Ndiaye A, Sankale JL, Thior I, N'Doye I, Hsieh CC, Mboup S, Kanki PJ. Molecular Epidemiology of Genital *Chlamydia trachomatis* Infection in High-Risk Women in Senegal, West Africa. *J. Clin. Microbiol.* 2000;38:138-145.
397. Su H, Watkins NG, Zhang YX, et al. *C.trachomatis* host cell interactions: Role of the chlamydial major outer membrane protein as an adhesion. *Infect Immun.* 1990;58:1017-1025.



398. Suchland KL, Counts JM & Stamm WE. Laboratory methods for detection of *Chlamydia trachomatis*: survey of laboratories in Washington State. *Journal of Clinical Microbiology* 1997; 35: 3210-3214.
399. Suss AL, Homel P, Hammerschlag M & Bromberg K. Risk factors for pelvic inflammatory disease in inner - city adolescents. *Sexually Transmitted Diseases* 2000; 27: 289-291.
400. Tang FF, Chang HL, Huang YT and Wang KC. Studies of the aetiology of trachoma with special reference to isolation of the virus in chick embryo. *Clin. Med. J.* 1957; 75: 429-447.
401. Tam M.R., Stamm W.R., Handsfield H.H., Stephens R., Kuo C.C., Holmes K.K., Ditzenberger K., Krieger M. and Nowinski R.C. Culture-independent diagnosis of *C. trachomatis* using monoclonal antibodies. *N Engl J Med.* 1984; 310: 1146-1150.
402. Tam, M.R., W.E. Stamm, H.H. Handsfield, R. Stephens, C.- Kuo, K.K. Holmes, K. Ditzenberger, M. Kreiger and R.C. Nowinski. Culture - independent diagnosis of *Chlamydia trachomatis* using monoclonal antibodies. *N. Engl. J. Med.* 1984; 310: 1146-1150.
403. Taylor HR, Siler JA, Mkocho HA, et al. The natural history of endemic trachoma: A longitudinal study. *Am J Trop Med Hyg.* 1992; 46: 552-559.
404. The National Institute of Health. NIH Taxonomy Browser. <http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/January> 17, 1998.
405. Thejls H, Gnarpe J, Gnarpe H et al. Expanded gold standard in the diagnosis of *Chlamydia trachomatis* in a low prevalence population: diagnostic efficacy of tissue culture, direct immunofluorescence, enzyme immunoassay, PCR and serology. *Genitourinary Medicine* 1994; 70: 300-303.
406. Thomas, B.J., E.J. MacLeod, and D. Taylor-Robinson. Evaluation of sensitivity of 10 diagnostic assays for *Chlamydia trachomatis* by use of a simple laboratory procedure. *J. Clin. Pathol.* 1993; 46: 912-914.
407. Thylefors B, Dawson CR, Jone BR, et al. A simple system for the assessment of trachoma and its complications. *Bull WHO.* 1987; 65: 477-483.
408. Thylefors, B. Prevention of blindness-WHO's mission for vision. *World Health Forum* 1998; 19: 53-59.
409. Tipple MA, Beem MO, Saxon EM. Clinical characteristics of the afebrile pneumonia associated with *C. trachomatis* infection in infants less than six months of age. *Pediatrics.* 1979; 63: 192-197.
410. Tipples G, McClarty G. The obligate intracellular bacterium *C. trachomatis* is auxotrophic for three of the four ribonucleoside triphosphates. *Mol Microbiol.* 1993; 8: 1105-1114.



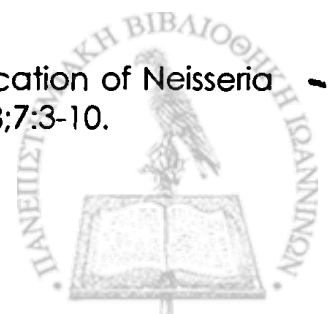
411. Todd CS, Haase C & Stoner BP. Emergency department screening for asymptomatic sexually transmitted infections. *American Journal of Public Health*. 2001; 91(3): 461-464.
412. Todd WJ, Caldwell HD. The interaction of *C.trachomatis* with host cells: Ultrastructural studies of the mechanism of release of a biovar II strain from HaLa 229 cells. *J Infect Dis*. 1985;151:1037-1044.
413. Todd WJ, Storz J. Ultrastructural cytochemical evidence for the activation of lysosomes in the cytotoxic effect of *C.psittaci*. *Infect Immun*. 1975;12:638-646.
414. Toye B, et al. Association between antibody to the *Chlamydia* heat-shock protein and tubal infertility. 1993;168:1236-1240.
415. Toye B, Zhong GM, Peeling R, Brunham RC. Immunologic characterization of a cloned fragment containing the species-specific epitope from the major outer membrane protein of *C.trachomatis*. *Infect Immun* 1990;58:3909-3913.
416. Treharne, J. D., T. Forsey, and B. J. Thomas. Chlamydial serology. *Br. Med. Bull*. 1983;39:194-200.
417. Uyeda, C. T., P. Welborn, N. Ellison-Birang, K.Shunk, and B. Tsaouse. Rapid diagnosis of chlamydial infections with the MicroTrak direct test. *J. Clin. Microbiol*. 1984;20:948-950.
418. Van der Pol B, Quinn TC, Gaydos CA, Crotchfelt K, Schachter J, Moncada J, Jungkind D, Martin DH, Turner B, Peyton C, Jones RB. Multicenter evaluation of the AMPLICOR and automated COBAS AMPLICOR CT/NG tests for detection of *Chlamydia trachomatis*. *J. Clin. Microbiol*. 2000;38:1105-1112.
419. Van Doornum GJJ, Schouls LM, Pijl A, Cairo I, Buimer M, Bruisten S. Comparison between the LCx Probe System and the COBAS AMPLICOR System for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* infections in patients attending a clinic for treatment of sexually transmitted diseases in Amsterdam, The Netherlands. *J Clin Microbiol*. 2001; 39:829-835.
420. van Duynhoven YT, Ossewarde JM, Derksen-Nawrocki RP et al. *Chlamydia trachomatis* genotypes: correlation with clinical manifestations of infection and patients' characteristics. *Clinical Infectious Diseases*.1998; 26: 314-322.
421. Vincelette J, Schirm J, Bogard M, Bourgault AM, Lujt DS, Bianchi A, Van Voorst Vader PC, Butcher A, Rosenstraus M. Multicenter evaluation of the fully automated COBAS AMPLICOR PCR test for detection of *chlamydia trachomatis* in urogenital specimens. *J Clin Microbiol*. 1999, 37:74-80.
422. Vinette-Leduc D, Yazdi HM, Jessamine P & Peeling RW. Reliability of cytology to detect chlamydial infection in asymptomatic women. *Diagnostic Cytopathology* 1997; 17: 258-261.



423. Vretou E., Mentis A., Psarrou E., Tsoumaris L., Gonidou G., Spiliopoulou D. Unusual prevalences of the rare serovar Da of *C. trachomatis* in Greece detected by monoclonal antibodies. *Sex Transm Dis.* 1992;19:78-73.
424. Wagar EA, Schachter J, Bavoil P, et al. Differential human serologic response to two 60,000 molecular weight *C. trachomatis* antigens. *J Infect Dis.* 1990;162:922-927.
425. Walker, G. T., M.C. Little, J. G. Nadeau, and D. D. Shank. Isothermal in vitro amplification of DNA by a restriction enzyme/DNA polymerase system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992;89:392-396.
426. Wang SP, Eschenbach DA, Holmes KK et al. Chlamydia trachomatis infection in Fitz-Hugh-Curtis syndrome. *American Journal of Obstetrics & Gynecology* 1980; 138:1034-1038.
427. Wang SP, Grayston JT. Human serology in *C. trachomatis* infection with microimmunofluorescence. *J. Infect. Dis.* 1974;130:388-397.
428. Wang SP. A micro-immunofluorescence method. Study of antibody response to TRIC organisms in mice. In Nichol RL (ed). *Trachoma and related disorders caused by chlamydial agents.* Excerpta Medica, Amsterdam. 1971;pp:273-288.
429. Wang SP., Grayston JT. Three new serovars of *C. trachomatis* Da, La, and L2a. *J Infect Dis.* 1991;63:403-405.
430. Wang SP., Grayston JT. Immunologic relationship between genital TRIC, lymphogranuloma venereum, and related organisms in a new micro-titer indirect immunofluorescence test. *Am. J. Ophthalmol.* 1970;70:367-375.
431. Wang SP., Grayston JT., Alexander ER., Holmes KK. Simplified microimmunofluorescence test with Trachoma LGV (*C. trachomatis*) antigen for use as a screening test for antibody. *J. Clin. Microbiol.* 1975;1:250-255.
432. Wang SP., Kuo CC., Barnes RC., Stephens RC., Grayston JT. Immunotyping of *C. trachomatis* with monoclonal antibodies. *J Infect Dis.* 1985;152:791-799.
433. Wang SR., Kuo CC., Grayston JT. A simplified method for immunological typing of trachoma-inclusion conjunctivitis-lymphogranuloma venereum organisms. *Infect. Immun.* 1973;7:356-360.
434. Wang, S.-P., J.T. Grayston. Immunologic relationship between genital TRIC, lymphogranuloma venereum, and related organisms in a new microtiter indirect immunofluorescence test. *Am. J. Ophthalmol.* 1970; 70:367-374.
435. Ward, M.E. 2002. Chlamydial plasmids
[http://www.chlamydiae.com/chlamydiae/docs/biology/genome_plasmid.htm]
436. Ward, M. E. 2002. Classic diagnostic methods: cell culture
[http://www.chlamydiae.com/chlamydiae/restricted/docs/labtests/diag_cellcult.htm], accessed 26 June 2002.



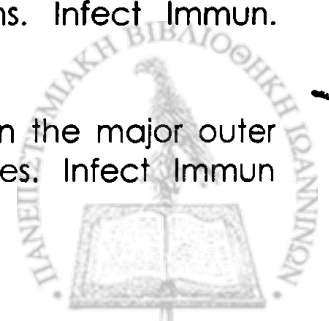
437. Washington, A. E., R. E. Johnson, and L. L. Sanders, R. C. Barnes, and E.R. Alexander. Incidence of *C.trachomatis* infections in the United States using reported *Neisseria gonorrhoeae* as a surrogate, p. 487-490. In D. Oriel, G. Ridgway, J. Schachter, et al. (ed.), *Chlamydia Infections. Proceedings of the 6th International Symposium on Human Chlamydial Infections*. Cambridge University Press, Cambridge, England. 1986.
438. Washington, A. E., R. E. Johnson, and L. L. Sanders. *C.trachomatis* infections in the United States. What are they costing us; *JAMA* 1987;257:2070-2072.
439. Wasserheit J, Bell T, Kiviat N et al. Microbial causes of proven pelvic inflammatory disease and efficiency of clindamycin and tobramycin. *Annals of Internal Medicine* 1986; 104: 187-193.
440. Watson EJ, Templeton A, Russell I, Paavonen J, Mardh PA, Stary A, Pederson BS. The accuracy and efficacy of screening tests for *Chlamydia trachomatis*: a systematic review. *J Med Microbiol*. 2002; 51:1021-1031.
441. Weinstock H, Berman S, Cates W Jr. Sexually transmitted diseases among American youth: incidence and prevalence estimates,2000. *Perspect Sex Reprod Health*. 2004;36:6-10.
442. Weinstock, H., D. Dean, and G. Bolan. *C.trachomatis* infections. Sexually transmitted diseases in the AIDS era, part II. *Infect Dis Clin North Am*. 1994;8:797-819.
443. Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol*. 1991;173:697-703.
444. Weiss A, Brinser JH, Nazar-Stewart V. Acute conjunctivitis in childhood. *J Pediatr* 1993;122:10-14.
445. Weiss SG, Newcomb RW,Beem MO. Pulmonary assessment of children after chlamydial pneumonia of infancy. *J Pediatr*. 1986;108:659-664.
446. West S, Munoz B, Lynch M, et al. Impact of-face-washing on trachoma in Kongwa, Tanzania. *Lancet*. 1999;345:155-8.
447. Westh H, Kolmos HJ. Large-scale testing of women in Copenhagen has not reduced the prevalence of *chlamydia trachomatis* infections. *Clin Microbiol Infect*. 2003;9:619-624.
448. Wheeler WB, Kurachek SC, Lobas JG, et al. Acute hypoxemic respiratory failure caused by *C.trachomatis* and diagnosed by flexible bronchoscopy. *Am Rev Respir Dis*. 1990;142:471-473.
449. Whittington WL, Rice RJ, Bidde JW,Knapp JS. Incorrect identification of *Neisseria gonorrhoeae* from infants and children. *Pediatr Infect Dis J*. 1988;7:3-10.



450. Witkin, S. et al. Detection of *C.trachomatis* in semen by the polymerase chain reaction in male members of infertile couples. *Am J Obstet Gynecol.* 1993;168:1457-1462.
451. Witkin, S. S. & W.J. Ledger. Antibodies to *C. trachomatis* in sera of women with recurrent spontaneous abortions. *Am J Obstet Gynecol.* 1992;167:135-139.
452. Wolner-Hanssen P, Patton DL, Holmes KK. Protective immunity in pigtailed macaques after cervical infection with *Chlamydia trachomatis*. *Sex Transm Dis.*1991;18:21-25. .
453. Woods,G.L.,and J.A.Bryan. Detection of *Chlamydia trachomatis* by direct fluorescent antibody staining. Results of the College of American Pathologists proficiency testing program. *Arch.Pathol.Lab.Med.* 1994;118:483-488.
454. World Health Organisation. Global prevalence and incidence of selected curable sexually transmitted infections. Website accession date April 2002-http://www.who.int/HIV_AIDS/STIGlobalReport, 2001.
455. World Health Organization. Global Prevalence and Incidence of Selected Curable Sexually Transmitted Diseases: Overview and Estimates. Geneva: World Health Organization; 2001. Accessed at www.who.int/emc-documents/STIs/docs/whocdscsredc200110.pdf on 8 April 2005.
456. Wu S, Shen L &Liu G. Study on vertical transmission of *Chlamydia trachomatis* using PCR and DNA sequencing. *Chinese Medical Journal (English)* 1999;112(5): 396-399.
457. Wu S, Shen L, Liu G. Study on vertical transmission of *Chlamydia trachomatis* using PCR and DNA sequencing.*Chin Med J (Engl).*1999 May;112(5):396-9.
458. Wyllie, S., R. H. Ashley, D. Longbottom, and A. J. Herring. The major outer membrane protein of *Chlamydia psittaci* functions as a porin-like ion channel. *Infect. Immun.* 1998;66:5202-5207.
459. Wyrick PB, Brownridge EA. Growth of *C.psittaci* in macrophages. *Infect Immun.* 1978;19:1054-1060.
460. Wyrick PB. Cell biology of chlamydial infection. In : Stephens RS, Byrne GI, Christiansen G, et al, eds.*Chlamydial infections: Proceedings of the 9th International Symposium on Human Chlamydial Infections, International Chlamydia Symposium, San Francisco, 1998:69-78.*
461. Wyrick RB, Choong J, Davis CH, et al. Entry of genital *C.trachomatis* into polarized human epithelial cells. *Infect Immun.* 1989;57:2378-2389.
462. Xu F, Schillinger JA, Markowitz LE et al. Repeat *Chlamydia trachomatis* infection in women: analysis through a surveillance case registry in Washington State, 1993-1998. *American Journal of Epidemiology* 2000;152:1164-1170.



463. Yang, C.L., Maclean, I., and Brunham, R.C. DNA sequence polymorphism of the *Chlamydia trachomatis* omp1 gene. *J. Infect. Dis.* 1993;168:1225-1230.
464. Yescas-Berendia G, Udalta-Mora E, Arrodondo-Garcia JL, Guerra F, Chavez-Gonzales C, Joachim-Roy H. Conjunctivitis neonatal by *C. trachomatis*. *Biol Med Hosp Infant Mex* 1993;50:570-576.
465. Yi Y, Zhong G, Brunham RC. Continuous B cell epitopes in *C. trachomatis* heat shock protein 60. *Infect Immun.* 1993;61:1117-1120.
466. Ying C, Wang B, Zheng D. The effect of *chlamydia trachomatis* infection in pregnant women on pregnant outcome and neonates. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi.* 1999 Jun; 34(6):348-50.
467. Yliskoski M, Tervahauta A, Saarikoski S, et al. Clinical course of cervical human papillomavirus lesions in relation to coexistent cervical infections. *Sex Transm Dis.* 1992;19:137-139.
468. Yuan Y, Lyng K, Zhang YX, et al. Monoclonal antibodies define genus-specific, species-specific cross-reactive epitopes of the chlamydial 60-kilodalton heat shock protein (hsp60): Specific immunodetection and purification of chlamydial hsp60. *Infect Immun.* 1992;60:2288-2296.
469. Yuan Y, Zhang YX, Watkins NG, Caldwell HD. Nucleotide and deduced amino acid sequences for the four variable domains of the major outer membrane proteins of the 15 *C. trachomatis* serovars. *Infect Immun* 1989;57:1040-1049.
470. Zelin, J. M., A. J. Robinson, G. L. Ridgway, E. Allason-Jones, and P. Williams. Chlamydial urethritis in heterosexual men attending a genitourinary medicine clinic: prevalence, symptoms, condom usage and partner change. *Int. J. STD AIDS* 1995;6:27-30.
471. Zenilman JM, Miller WC, Gaydos C, Rogers SM, Turner CF. LCR testing for gonorrhoea and chlamydia in population surveys and other screenings of low prevalence populations: coping with decreased positive predictive value. *Sex Transm Infect.* 2003;79:94-7.
472. Zenilman JM. Chlamydia and cervical cancer: a real association? *Journal of the American Medical Association* 2001;285:81-83.
473. Zhang YX, Morrison SG, Caldwell HD, Baehr W. Cloning and sequence analysis of the major outer membrane protein genes of two *C. psittaci* strains. *Infect Immun* 1989;57:1621-1625.
474. Zhong G, Peterson EM, Czarniecki CW, et al. Role of endogenous gamma interferon in host defense against *C. trachomatis* infections. *Infect Immun.* 1989;57:152-157.
475. Zhong GM, Reid RE, Brunham RC. Mapping antigenic sites on the major outer membrane protein of *C. trachomatis* with synthetic peptides. *Infect Immun* 1990;58:1450-1455.



476. Zou J, Liu S, Xiao W, Yang X. Evaluation of PCR for detection of chlamydia trachomatis in eye swabs. Yan Ke Xue Bao. 2000 Jun;16(2):124-6.

