



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ

«Κλινικές Εφαρμογές Μοριακής Ιατρικής»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΤΟΥ
ΜΥΚΟΠΛΑΣΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΤΟΥ
ΟΥΡΕΟΠΛΑΣΜΑΤΟΣ ΣΤΟ
ΟΥΡΟΓΕΝΝΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΣΤΗΝ
ΠΕΡΙΟΧΗ ΤΗΣ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ ΤΟ 2013**

Ζωή Κ. Γαρυφαλοπούλου

Βιοχημικός

ΛΑΡΙΣΑ 2014

Τριμελής Εξεταστική επιτροπή

Έφη Πετεινάκη, Βιοπαθολόγος, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια της Μικροβιολογίας του τμήματος της Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και Διευθύντρια του Μικροβιολογικού Εργαστηρίου του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου

Αναστάσιος Γερμενής, Καθηγητής Εργαστηριακής Ανοσολογίας του τμήματος της Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και Διευθυντής του εργαστηρίου Ανοσολογίας και Ιστοσυμβατότητας του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας

Ματθαίος Σπελέτας, Αναπληρωτής Καθηγητής της Εργαστηριακής Ανοσολογίας του τμήματος της Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	4
ΠΡΟΛΟΓΟΣ	5
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
1.1 <i>Mycoplasma spp.</i> και <i>Ureaplasma spp.</i>	8
1.1.1 <i>Mycoplasma genitalium</i>	10
1.1.2 <i>Mycoplasma hominis</i>	12
1.1.3 <i>Ureaplasma urealyticum</i> και <i>Ureaplasma parvum</i>	14
1.2 Εργαστηριακή διάγνωση	17
1.2.1 Καλλιέργεια.....	17
1.2.2 Εμπορικά διαθέσιμες δοκιμασίες ανίχνευσης.....	19
1.2.3 Ορολογικές μέθοδοι	20
1.2.4 Μοριακές μέθοδοι	21
A. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	21
B. Διπλή PCR (nested PCR)	23
Γ. PCR Πραγματικού Χρόνου (Real –Time PCR).....	23
1.3 ΣΚΟΠΟΣ.....	24
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	26
2.1 Συλλογή και προέλευση των δειγμάτων.....	26
2.2 Ανίχνευση <i>Ureaplasma</i> και <i>Mycoplasma</i> με εμπορική δοκιμασία <i>Mycoplasma</i> IES	26
2.3 Εξαγωγή DNA από δείγματα.....	29
2.4 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR)	30
2.5 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης.....	34
2.6 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real – Time PCR) .	36
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	41
3.1 Αποτελέσματα της ανίχνευσης και ταυτοποίησης των μικροοργανισμών με τις τρεις μεθόδους.....	41
3.2 Αποτελέσματα επιδημιολογικής μελέτης.....	43
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	45
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	50
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	55

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

BV	Βακτηριακή κοπλίτιδα
CFU/ml	Colony-Forming Units per milliliter
DNA	Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
dNTPs	DeoxyriboNucleotide TriPhosphate (διδεοξυριβονουκλεοτίδια)
G+C	Γουανίνη και Κυτοσίνη
MBA	Multiple Banded Antigen
MIC	Minimal Inhibitory Concentration
MH	<i>Mycoplasma hominis</i>
NAATs	Nucleic Acid Amplification Tests (μέθοδοι ενίσχυσης νουκλεϊκών Οξέων)
NGU	Μη γονοκοκκική ουρηθρίτιδα
PCR	Polymerase Chain Reaction, Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης
PID	Φλεγμονή της πυέλου
Spp	Species (είδος)
UPA	<i>Ureaplasma parvum</i>
UUR/UU	<i>Ureaplasma urealyticum</i>

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Οι μικροοργανισμοί του γένους *Mycoplasma* καθώς και του γένους *Ureaplasma* οι οποίοι σχετίζονται με λοιμώξεις του ουρογεννητικού συστήματος είναι οι: *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma urealyticum* και *Ureaplasma parvum*. Ανήκουν στην οικογένεια των *Mycoplasmataceae* και στην κλάση των *Mollicutes* (μυκοπλάσματα), τους μικρότερους των κυτταρικών μικροοργανισμών που ζουν ελεύθερα στη φύση. Κύριο χαρακτηριστικό των οργανισμών αυτών είναι η έλλειψη κυτταρικού τοιχώματος και περιβάλλονται από μία απλή κυτταρική μεμβράνη τριών στρωμάτων που περιέχει στερόλες. Στην απουσία κυτταρικού τοιχώματος οφείλεται η ανθεκτικότητα τους στα αντιβιοτικά που δρουν στο κυτταρικό τοίχωμα όπως είναι οι β-λακτάμες, το πλειομορφικό σχήμα και η αδυναμία βαφής με την χρώση Gram. Σχηματίζουν πολύμορφα νημάτια με μέση διάμετρο 0,1-0,3μm. Λόγω του μικρού τους μεγέθους, αρχικά πίστευαν ότι ήταν ιοί. Εντούτοις, διαιρούνται με διχοτόμηση και είναι προαιρετικά αναερόβια. Η γενετική πληροφορία που φέρουν είναι πολύ μικρή και για αυτό έχουν μειωμένες βιοσυνθετικές ικανότητες. Δεν αναπτύσσονται σε κοινά θρεπτικά μέσα αλλά σε ειδικά θρεπτικά υλικά χωρίς κύτταρα εμπλουτισμένα με χοληστερόλη.

Ενοχοποιούνται για διάφορες λοιμώξεις του ουρογεννητικού συστήματος όπως είναι η μη γονοκοκκική ουρηθρίτιδα (NGU), η προστατίτιδα, η κολπίτιδα, η σαλπινγίτιδα και η φλεγμονή της πυέλου (PID) καθώς και για υπογονιμότητα σε γυναίκες και άνδρες. Επίσης, σχετίζονται με πρόωρους τοκετούς, αυτόματες αποβολές και γεννήσεις νεογνών χαμηλού σωματικού βάρους. Η αυξημένη συχνότητα αποικισμού των μυκοπλασμάτων και ουρεοπλάσμάτων και η συμμετοχή τους στην παθογένεια ποικίλων λοιμώξεων απαιτεί την χρήση κατάλληλων διαγνωστικών μεθόδων που χαρακτηρίζονται από ευαισθησία και ταχύτητα. Σε αυτό συνέβαλαν οι μοριακές μέθοδοι καθώς οι συμβατικές μέθοδοι αδυνατούν να ανιχνεύσουν τους μικροοργανισμούς γρήγορα και αξιόπιστα.

Ωστόσο όμως η παρουσία τους δεν προκαλεί απαραίτητα λοίμωξη αλλά μπορεί να συνίσταται σε φορία ή σε υποκλινική μορφή λοίμωξης. Το *U.urealyticum* και το *M.hominis* έχουν σχετισθεί με διάφορες λοιμώξεις αλλά υπάρχει αμφισβήτηση σχετικά με τον παθογενετικό ρόλο τους επειδή απομονώνονται συχνά και στην χλωρίδα φυσιολογικών ατόμων. Το πιθανότερο είναι ότι δρουν ως ευκαιριακά παθογόνα. Το *U.urealyticum* και το *U.parvum* αποικίζουν τον κόλπο ασυμπτωματικών γυναικών σε ποσοστό 40 με 80% ενώ το *M.hominis* σε ποσοστό 21 με 53% (Waites *et al.*, 2005). Τα ποσοστά ανίχνευσης τους στην ουρήθρα ασυμπτωματικών ανδρών είναι λίγο χαμηλότερα. Ο αποικισμός εξαρτάται από το φύλο, την ηλικία, την σεξουαλική δραστηριότητα, τον αριθμό των σεξουαλικών συντρόφων και το ορμονικό status (Αρσένη, Α., 1994). Ερευνητές από τις ΗΠΑ συσχέτισαν τον αποικισμό με χαμηλό κοινωνικό-οικονομικό επίπεδο, νεαρές ηλικίες, πολλαπλό αριθμό σεξουαλικών συντρόφων και χρήση αντισυλληπτικών χαπιών (Cassell *et al.*, 1993).

Στην Ελλάδα υπάρχει έλλειψη επιδημιολογικών στοιχείων που αφορούν τον επιπολασμό των ουρογεννητικών λοιμώξεων από *Mycoplasma spp.* και *Ureaplasma spp.* καθώς μελέτες για τον προσδιορισμό της συχνότητας ανίχνευσης τους πραγματοποιήθηκαν μόνο τα τελευταία χρόνια. Στην Βόρεια Ελλάδα οι Kotrotsiou *et al.*, 2013, ανίχνευσαν το *Ureaplasma spp.* σε ασυμπτωματικές γυναίκες σε ποσοστό 16,13% ενώ στην Αθήνα οι Baka *et al.*, 2009, ανίχνευσαν σε γυναίκες με χρόνια ουρηθρικά συμπτώματα το *U.urealyticum* σε ποσοστό 52,9% και το *M.hominis* σε ποσοστό 3,3%. Για την περιοχή της Θεσσαλίας δεν υπάρχει κάποια ανάλογη μελέτη, γεγονός που συνέβαλε στην πραγματοποίηση της παρούσας εργασίας.

Σκοπός της εργασίας είναι ο προσδιορισμός της συχνότητας του μυκοπλάσματος και του ουρεοπλάσματος στο ουρογεννητικό σύστημα ατόμων που προσήλθαν στα εξωτερικά ιατρεία της γυναικολογικής και της ουρολογικής κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας από την περιοχή της Θεσσαλίας σε περίοδο ενός εξαμήνου, Ιούλιος 2013–Δεκέμβριος 2013. Η μελέτη εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου της Λάρισας κατά το έτος 2013 – 2014 υπό την επίβλεψη της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας της Μικροβιολογίας

του Ιατρικού τμήματος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και διευθύντριας του μικροβιολογικού εργαστηρίου του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας κ. Ευθυμίας Πετεινάκη.

Σε αυτό το σημείο θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την καθηγήτριά μου κ. Έφη Πετεινάκη που με δέχτηκε ως μέλος του Εργαστηρίου, πίστεψε σε μένα και μου έδινε δύναμη να προσπαθώ συνεχώς για κάτι ανώτερο. Χωρίς την πολύτιμη καθοδήγηση και τις συμβουλές της δεν θα ήταν δυνατή η ολοκλήρωση της εργασίας. Ευχαριστώ επίσης τα υπόλοιπα 2 μέλη της τριμελούς επιτροπής κ. Αναστάσιο Γερμενή και κ. Ματθαίο Σπελέτα για την βοήθειά τους κατά την εκπόνηση της διπλωματικής μου εργασίας.

Επίσης ευχαριστώ θερμά το ερευνητικό προσωπικό του εργαστηρίου Στέλλα Σάρρου, Ζωή Φλώρου, Απόστολο Λιακόπουλο, Μαρία Σταυροπούλου και Χριστίνα Χατεδάκη για την αμέριστη βοήθεια και υποστήριξη που μου παρείχαν σε όλη την διάρκεια των πειραματικών διαδικασιών. Ευχαριστώ ακόμα τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για την καλή συνεργασία σε όλη τη διάρκεια της παρουσίας μου.

Θα ήταν παράληψή μου να μην ευχαριστήσω την αδερφή μου Έφη για την υποστήριξή της και την υπομονή της αυτούς τους μήνες, τον Βαγγέλη για την κατανόηση και ηθική συμπαράσταση που μου προσέφερε καθώς και τους φίλους μου. Τέλος, ευχαριστώ τους αγαπημένους μου γονείς για την αδιάκοπη ηθική και υλική υποστήριξη, καθώς και την υπομονή που μου δείχνουν όλα αυτά τα χρόνια.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 *Mycoplasma spp.* και *Ureaplasma spp.*

Οι μικροοργανισμοί του γένους *Mycoplasma* καθώς και του γένους *Ureaplasma* ανήκουν στην οικογένεια των *Mycoplasmataceae* και στην κλάση των *Mollicutes* και ανιχνεύονται στον άνθρωπο, στα θηλαστικά, στα πτηνά, στα ψάρια και σε άλλα σπονδυλωτά καθώς και στα φυτά (Tully *et al.*, 1981, Yoshida *et al.*, 2002). Οι μικροοργανισμοί της κλάσης των *Mollicutes*, δηλαδή τα μυκοπλάσματα, προέρχονται από προγονικά αναερόβια βακτήρια μετά από εξάλειψη γονιδίων. Τα μυκοπλάσματα είναι οι μικρότεροι και απλούστεροι προκαρυωτικοί μικροοργανισμοί που μπορούν να πολλαπλασιάζονται μόνοι τους. Το κύτταρό τους περιέχει τα ελάχιστα οργανίδια που είναι απαραίτητα για την κυτταρική ανάπτυξη και αντιγραφή: μία μεμβράνη που διαχωρίζει το κυτταρόπλασμα από το εξωτερικό περιβάλλον, ριβοσώματα για τον σχηματισμό των πρωτεϊνών του και δίκλωνο δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ (DNA) που παρέχει τις πληροφορίες για την σύνθεση των πρωτεϊνών (Razin *et al.*, 1978). Σε αντίθεση με τους υπόλοιπους προκαρυώτες, χαρακτηριστικό αυτών των οργανισμών είναι η έλλειψη του κυτταρικού τοιχώματος. Ανταυτού έχουν μία τρίστιβη κυτταροπλασματική ελαστική μεμβράνη (Αρσένη, Α., 1994). Το κυρίαρχο σχήμα τους είναι σφαιρικό. Ωστόσο, πολλά μυκοπλάσματα παρουσιάζουν μία ποικιλία στη σχηματική μορφολογία τους από σφαιρικό, ωοειδές, φιαλοειδές μέχρι και νηματοειδές με εκβλαστήσεις (Razin *et al.*, 1998). Η ικανότητα να διατηρούν τέτοια σχήματα απουσία άκαμπτου κυτταρικού τοιχώματος φανέρωσε νωρίς την παρουσία κυτταροσκελετού (Razin *et al.*, 1978). Το γονιδίωμα τους είναι το τυπικό προκαρυωτικό αφού είναι κυκλικό, δίκλωνο DNA (Maniloff *et al.*, 1972, Morowitz *et al.*, 1973) αλλά διαφέρει από τους άλλους προκαρυώτες στο μέγεθος επειδή είναι πολύ μικρό και χαρακτηρίζεται από χαμηλό ποσοστό γουανίνης–κυτοσίνης (G+C). Τέλος, τα μυκοπλάσματα δεν αναπτύσσονται στα κοινά θρεπτικά υλικά αλλά σε ειδικά υλικά με ορό αίματος και εκχύλισμα μυκήτων (Αρσένη, Α., 1994). Τα είδη *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* και *Ureaplasma parvum* σχετίζονται με λοιμώξεις του ουρογεννητικού

συστήματος (Jensen *et al.*, 1991, Deguchi *et al.*, 2002, Taylor-Robinson *et al.*, 1980, Tully *et al.*, 1983). Τα γεννητικά μυκοπλάσματα αποικίζουν τους βλεννογόνους του γεννητικού συστήματος της γυναίκας, το αιδοίο, τον κόλπο, τον τράχηλο και στους άνδρες την ουρήθρα. Επίσης, αποικίζουν το ορθό και τις πέριξ περιοχές αυτού (Munday *et al.*, 1981).

Μελέτες που προέρχονται από διαφορετικά μέρη του κόσμου έχουν διαπιστώσει αύξηση των λοιμώξεων από τα γεννητικά μυκοπλάσματα και ουρεοπλάσματα την τελευταία δεκαετία (Taylor-Robinson *et al.*, 2012, Rivera *et al.*, 2001). Η συχνότητα ανίχνευσής τους διαφοροποιείται παγκοσμίως: 3,9-31% στο Μεξικό (Rivera *et al.*, 2004, Ramirez *et al.*, 2004, Fagundo *et al.*, 2006) 21,4% στις ΗΠΑ (Imudia *et al.*, 2008), 44,8% στην Κίνα (Zuo *et al.*, 2006) και 54,9% στην Τουρκία (Karabay *et al.*, 2006). Ο αποικισμός εξαρτάται από το φύλο, την ηλικία, την σεξουαλική δραστηριότητα, τον αριθμό των σεξουαλικών συντρόφων, το ορμονικό status και τις κοινωνικό-οικονομικές συνθήκες που επικρατούν σε κάθε χώρα (Αρσένη, Α., 1994). Στην Ελλάδα στοιχεία για την συχνότητα ανίχνευσης των γεννητικών μυκοπλάσμάτων και ουρεοπλάσμάτων είναι λίγα και προέρχονται από μελέτες που έγιναν την τελευταία δεκαετία. Στην Βόρεια Ελλάδα, ασυμπτωματικές γυναίκες φέρουν το *Ureaplasma spp.* σε ποσοστό 16,13%, από τις οποίες στο 96,4% ανιχνεύθηκε το *U.parvum* και στο 3,6% το *U.urealyticum* (Kotrotsiou *et al.*, 2013). Στην Αθήνα το 2008 ελέχθησαν 369 γυναίκες με κολπίτιδα από τις οποίες οι 137 (37,1%) ήταν θετικές είτε στο *M.hominis*, είτε στο *U.urealyticum*, είτε και στα δύο μαζί, πολλές φορές σε συνδυασμό με άλλους μικροοργανισμούς του γεννητικού συστήματος. Από τις 137 γυναίκες το 47,44% ήταν θετικό μόνο για *U.urealyticum*, το 0,72% μόνο για *M.hominis*, το 2,92% είχε και τα δύο ενώ στο 48,90% συνυπήρχαν τα γεννητικά μυκοπλάσματα με άλλους μικροοργανισμούς (Kechagia *et al.*, 2008). Επίσης, οι Baka *et al.*, 2009 ανίχνευσαν σε γυναίκες με χρόνια ουρηθρικό σύνδρομο το *U.urealyticum* σε ποσοστό 52,9% και το *M.hominis* σε ποσοστό 3,3%. Τέλος, οι Karanikolas *et al.*, 2009, ανίχνευσαν το *M.genitalium* σε ποσοστό 18% σε 150 γυναίκες.

1.1.1 *Mycoplasma genitalium*

Ο μικροοργανισμός *M.genitalium* έχει τους γενικούς χαρακτήρες του γένους και διαφέρει από τα άλλα μυκοπλάσματα στους μορφολογικούς, καλλιεργητικούς και μεταβολικούς χαρακτήρες. Συγκεκριμένα, έχει σχήμα φιαλοειδές με ένα λεπτό ραβδοειδές οργανίδιο στο ένα άκρο. Όσον αφορά το κυτταροσκελετό του, οι Wasinger *et al.* είχαν προτείνει την ύπαρξη μίας πρωτεΐνης παρόμοιας με την τουμπουλίνη (Wasinger *et al.*, 1995). Το *M.genitalium* αποτελείται τουλάχιστον από επτά πρωτεΐνες, δύο από τις οποίες (η MgPa, 140 kDa [γνωστή ως MG191] και η P110 [γνωστή ως MG192]) είναι απαραίτητες για την προσκόλληση του μικροοργανισμού στις επιφάνειες των γυάλινων και πλαστικών δοχείων καλλιέργειάς του καθώς και στα διάφορα ανθρώπινα και ζωικά κύτταρα σε συνεργασία με δύο άλλες πρωτεΐνες τις MG218 και MG317 (Musatonova *et al.*, 2003, Pich *et al.*, 2008). Επίσης, η πρωτεΐνη MG191 εκτός από προσκολλητίνη είναι και πρωτεϊνικό αντιγόνο (Morrison-Plummer *et al.*, 1987, Svenstrup *et al.*, 2002, Svenstrup *et al.*, 2006). Όταν ένα στέλεχος *M.genitalium* έχει μία μετάλλαξη που δεν του επιτρέπει να παράγει την MG191, τότε τα ερυθροκύτταρα δεν προσκολλώνται στις αποικίες το (Merbaugh *et al.*, 1993). Συνεπώς, η πρωτεΐνη αυτή είναι παράγων παθογονικότητας. Το μέγεθος του γονιδιώματός του είναι 580 kb (Peterson *et al.*, 1993), ενώ το ποσοστό γουανίνης-κυτοσίνης είναι 32% (Taylor-Robinson *et al.*, 2011) και θεωρείται ευρέως ως ο μικροοργανισμός με το μικρότερο γονιδίωμα από όλα τα βακτήρια που μπορεί να αναπτυχθεί σε δοκιμαστικό σωλήνα απουσία κυτάρων-ξενιστών (Fraser *et al.*, 1995). Μεταβολίζει την γλυκόζη, αλλά όχι την αργινίνη και την ουρία (Tully *et al.*, 1981, Tully *et al.*, 1983, Taylor-Robinson *et al.*, 1981).

Έχει πολύ αργό ρυθμό ανάπτυξης (περίπου 30-50 ημέρες), ο οποίος αυξάνεται μετά από επαναλαμβανόμενες ανακαλλιέργειες. Δεν αναπτύσσεται στα συνήθη θρεπτικά υλικά της καλλιέργειας των μυκοπλασμάτων, γιατί είναι ευαίσθητο στην παρουσία οξεικού θαλίου σε συγκεντρώσεις ανεκτές από τα άλλα μυκοπλάσματα. Αναπτύσσεται σε κύτταρα Vero (Jensen *et al.*, 1996) καθώς και σε SP4 άγαρ (Tully *et al.*, 1981) σε αναερόβιες συνθήκες με νάτριο,

5% CO₂ και θερμοκρασία 37⁰C. Οι αποικίες που σχηματίζει είναι μικρές, βαθειά ριζωμένες στο υλικό και συχνά με περιφέρεια σαν «αυγά μάτια».

Το *M.genitalium* εμφανίζει ευαισθησία στις τετρακυκλίνες, τις φθοροκινολλόνες και τις μακρολίδες (Taylor-Robinson *et al.*, 2011). Επίσης, υψηλές συγκεντρώσεις πενικιλίνης G και αμφοτερικίνης B δρύνε ανασταλτικά στην ανάπτυξη άγριων στελεχών *M.genitalium*, ενώ σε συγκέντρωση 200 IU/ml πενικιλίνης και 500 µg/ml πολυμυκίνης τα αντιβιοτικά αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εκλεκτικά αντιβιοτικά ώστε να αποφευχθεί βακτηριακή υπερανάπτυξη σε καλλιέργειες κυτάρων Vero (Hamasuna *et al.*, 2007).

Νόσοι του ουρογεννητικού συστήματος που οφείλονται στο *M.genitalium* είναι πολλές και διαφορετικές σε άνδρες και γυναίκες. Στους άνδρες ο μικροοργανισμός σχετίζεται με την μη γονοκοκκική ουρηθρίτιδα (NGU). Απομονώθηκε πρώτη φορά το 1981 σε καλλιέργειες από δείγματα από την ουρήθρα δύο ανδρών που είχαν NGU (Tully *et al.*, 1981). Το *M.genitalium* είναι το ενδέκατο είδος μυκοπλάσματος (σε χρονολογική σειρά) που απομονώθηκε στον άνθρωπο (Tully *et al.*, 1983). Αν και το *M. genitalium* είχε προταθεί ως αιτία της μη γονοκοκκικής ουρηθρίτιδας στον άνθρωπο (Tully *et al.*, 1986), ο ακριβής ρόλος του στην αιτιολογία της νόσου δεν είχε εδραιωθεί εξαιτίας της δυσκολίας που εμφάνιζε η απομόνωσή του από κλινικά δείγματα. Η χρήση της PCR διευκόλυνε την ανίχνευση του από κλινικά δείγματα (Jensen *et al.*, 1991, Palmer *et al.*, 1991) και αποδείχτηκε σημαντική συσχέτιση μεταξύ του *M.genitalium* και της NGU (Horner *et al.*, 1993, Jensen *et al.*, 1993, Maeda *et al.*, 1998, Totten *et al.*, 2001). Σήμερα, έχει αποδειχθεί ότι το *M.genitalium* συσχετίζεται πιο στενά με την συμπτωματική NGU παρά με την ασυμπτωματική (Horner *et al.*, 2002, Horner *et al.*, 2003). Το *M.genitalium* αναγνωρίζεται ως ένας ανεξάρτητος αιτιολογικός παράγοντας της οξείας αλλά και της χρόνιας μη γονοκοκκικής ουρηθρίτιδας στους άνδρες και είναι υπεύθυνο για το 20-35% των περιπτώσεων αυτών (Arraiz *et al.*, 2008, Baczynska *et al.*, 2007). Επίσης, υπάρχουν έρευνες που δείχνουν ότι το *M.genitalium* μπορεί να σχετίζεται με την επιδιδιμίτιδα στους άνδρες (Eickhoff *et al.*, 1999).

Στις γυναίκες υπάρχουν ενδείξεις ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ του *M.genitalium* και της μη γονοκοκκικής ουρηθρίτιδας (Falk *et al.*, 2005,

Anagrius *et al.*, 2005). Επίσης, ο μικροοργανισμός συσχετίζεται με την τραχηλίτιδα. Η πρώτη ένδειξη ήρθε το 1997 από μία ιαπωνική έρευνα όπου το *M.genitalium* ανιχνεύθηκε στον τράχηλο σε 5 γυναίκες από τις 57 με τραχηλίτιδα (9%) αλλά σε καμία από τις 79 που δεν είχαν τραχηλίτιδα (Uno *et al.*, 1997). Πράγματι, σε μία πρόσφατη έρευνα (Lusk *et al.*, 2011), το *M.genitalium* ήταν το μοναδικό μυκόπλασμα που θεωρήθηκε αιτία τραχηλίτιδας. Μία ακόμα ασθένεια που φαίνεται να σχετίζεται με το *M.genitalium* είναι η φλεγμονή της πυέλου (PID), η οποία όπως και οι περισσότερες ασθένειες του ουρογεννητικού δεν έχουν μία μόνο αιτία (Hebb *et al.*, 2004). Η πρώτη φορά που αναφέρθηκε το *M.genitalium* ως πιθανή αιτία των PID ήταν το 1984 (Moller *et al.*, 1984). Από τότε άλλες 5 εργασίες βασιζόμενες στην τεχνική της PCR βρήκαν θετική συσχέτιση μεταξύ του *M.genitalium* και των PID σε διαφορετικούς γεωγραφικούς πληθυσμούς σε όλο τον κόσμο (Uno *et al.*, 1997, Bjartling *et al.*, 2010, Cohen *et al.*, 2002, Haggerty *et al.*, 2008, Simms *et al.*, 2003).

Τέλος, το *M.genitalium* ενοχοποιείται και στα δύο φύλα για υπογονιμότητα (Clausen *et al.*, 2001, Svenstrup *et al.*, 2003, Svenstrup *et al.*, 2008).

1.1.2 *Mycoplasma hominis*

Το *M.hominis* είναι το πρώτο μυκόπλασμα που απομονώθηκε από τον άνθρωπο το 1937 (Dienes *et al.*, 1937). Είναι ένα ετερογενές μυκόπλασμα του ουρογεννητικού συστήματος (Christiansen *et al.*, 1997) και εντοπίζεται στα 2/3 των γυναικών με βακτηριακή κολπίτιδα (BV) (Rosenstein *et al.*, 1996, Taylor-Robinson *et al.*, 1998). Το *M.hominis* είναι ένα κοκκιοειδές, κοκκοβακτηριοειδές και νηματοειδές κύτταρο που αλλάζει μορφή και μέγεθος αυτομάτως γιατί κατέχει συσπαστικό-χαλαρωτικό μηχανισμό (Αρσένη, Α., 1994). Το μέγεθος του γονιδιώματός του κυμαίνεται από 696 kb έως 825 kb (Ladefoged *et al.*, 1992). Όσον αφορά το μεταβολισμό του, διασπά την αργινίνη αλλά όχι την γλυκόζη και την ουρία. Δεν ανάγει το τετραζόλιο και το κυανούν του μεθυλενίου. Έχει μεγάλη αντοχή στην ερυθρομυκίνη (Bebear *et*

al., 2000) και στις κετολίδες αλλά παρουσιάζει ευαισθησία στην ζοσαμυκίνη (Pereyre *et al.*, 2002). Επίσης, και οι φλουοροκινολόνες, όπως η Τροβαφλοξακίνη, δρουν εναντίον του *M.hominis* στοχεύοντας τα γονίδια των τοποϊσομερασών του (Bébéar *et al.*, 2000). Οι αποικίες του προσκολλούν κύτταρα HeLa και κύτταρα κυτταροκαλλιιεργειών εμβρύου όρνιθας. Ευνοϊκό pH για την ανάπτυξή τους είναι 5,5 με 8,0 ενώ ο χρόνος ανάπτυξης των αποικιών κυμαίνεται από 1 με 5 ημέρες. Η συχνότητα αποικισμού από το *M.hominis* κυμαίνεται από 0-45% και είναι υψηλότερη στις γυναίκες (Αρσένη, Α., 1994). Διαθέτει τρία διαφορετικά αντιγόνα στην επιφάνειά του τα οποία έχουν χαρακτηριστεί λεπτομερώς. Τα δύο είναι πρωτεΐνες (135 kDa) οι οποίες ανήκουν στην οικογένεια πρωτεϊνών Lmp, οι Lmp1 και Lmp3 (Ladefoged *et al.*, 1995, Ladefoged *et al.*, 1996). Το τρίτο αντιγόνο είναι μία λιποπρωτεΐνη η P120 η οποία συμμετέχει και στην προσκόλληση του μικροοργανισμού στα κύτταρα (Nynvold *et al.*, 1997, Zhang *et al.*, 1996). Βάσει των πρωτεϊνικών αντιγόνων έχουν διαχωρισθεί 7 ορότυποι.

Ο μικροοργανισμός *M.hominis* συχνότερα εντοπίζεται στο κατώτερο γεννητικό σύστημα, χωρίς να σχετίζεται με ασθένειες στους άνδρες. Επίσης, έχει απομονωθεί από το ανώτερο γεννητικό σύστημα μόνο όταν έχουν υπάρξει συμπτώματα οξείας λοίμωξης, συχνά σε συνδυασμό με την ύπαρξη συγκεκριμένης αντιγονικής απάντησης (Thomsen *et al.*, 1978). Επίσης, άγνωστος είναι ο ρόλος του *M.hominis* στην στειρότητα ως συνέπεια σαλπιγγίτιδας. Ωστόσο, είναι λογικό να πιστεύουμε ότι ο μικροοργανισμός μπορεί να εμπλέκεται και στην στειρότητα αφού έχει απομονωθεί με τριπλάσια συχνότητα από στείρες γυναίκες με PID σε σχέση με τις φυσιολογικές γυναίκες (Miller *et al.*, 1985). Ο μικροοργανισμός *M.hominis* ενοχοποιείται για την εμφάνιση κολπίτιδας. Υπάρχει στον κόλπο των 2/3 των γυναικών και περισσότερο με ανώμαλα κολπικά ευρήματα, σε σύγκριση με το 10% των γυναικών χωρίς ευρήματα. Επίσης έχουν βρεθεί υψηλά ποσοστά IgG αντισωμάτων για τον μικροοργανισμό σε γυναίκες με κολπίτιδα (Rosenstein *et al.*, 1996). Η φλεγμονή της πυέλου (PID) είναι μία ασθένεια που οφείλεται σε πολλούς παράγοντες. Φαίνεται ότι μπορεί να οφείλεται και στον *M.hominis* αφού έχει απομονωθεί από το ενδομήτριο και από τις σάλπιγγες από το 10% γυναικών με σαλπιγγίτιδα (Mardh *et al.*, 1970) και το εύρημα αυτό συνοδεύεται από συγκεκριμένη αντιγονική απάντηση (Mardh *et*

al., 1970). Το *M.hominis* απομονώνεται από το αίμα γυναικών με πυρετό μετά από έκτρωση ή μετά από φυσιολογικό τοκετό και σχετίζεται με πνευμονία, αρθρίτιδα, ενδομητρίτιδα και λοίμωξη καισαρικής τομής μετά τον τοκετό. Ακόμα απομονώνεται από το αμνιακό υγρό, από το αίμα του ομφάλιου λώρου, από το αίμα των νεογνών και περιστασιακά έχει σχετισθεί με χοριοαμνιονίτιδα, αποβολή εμβρύου, εμβρυικό θάνατο και πρόωρο τοκετό. Επειδή όμως συνήθως απομονώνεται μαζί με το *U.urealyticum* είναι πολύ δύσκολο να αποδειχθεί αν το *M.hominis* είναι καθαυτό υπεύθυνο για τις παραπάνω επιπλοκές (Φωκάς, Σ. 2003).

1.1.3 *Ureaplasma urealyticum* και *Ureaplasma parvum*

Οι μικροοργανισμοί *U.urealyticum* (UUR) και *U.parvum* (UPA) ανήκουν στο γένος *Ureaplasma*. Το γένος αυτό πρώτη φορά περιγράφηκε το 1954 (Shepard *et al.*, 1954), ενώ η επίσημη του ταξινόμηση στα μυκοπλάσματα έγινε το 1974 (Shepard *et al.*, 1974). Αρχικά επικρατούσε η άποψη ότι οι δύο μικροοργανισμοί ήταν δύο διαφορετικοί υπότυποι του *U.urealyticum* (biovar 1 και biovar 2). Οι Kong *et al.* κάνοντας φυλογενετική ανάλυση πρότειναν την ίδρυση ενός καινούριου είδους του *U.parvum* (biovar 1) (Kong *et al.*, 1999). Και οι δύο μικροοργανισμοί έχουν τους γενικούς μορφολογικούς και καλλιεργητικούς χαρακτήρες των *Mycoplasma*, αλλά έχουν ένα ιδιαίτερο μεταβολικό δείκτη, ότι όλα τα στελέχη τους υδρολύουν την ουρία (Shepard *et al.*, 1974). Επίσης δεν μεταβολίζουν σάκχαρα και αργινίνη, δεν ανάγουν το τετραζόλιο και παράγουν φωσφατάση (Αρσένη, Α., 1994). Δεν έχουν κυτταρικό τοίχωμα όπως τα μυκοπλάσματα, αλλά περιβάλλονται από μία μεμβράνη από την οποία προβάλλουν ινδοειδείς προσεκβολές. Ευνοϊκό pH για την ανάπτυξή τους είναι 6 με 6,5 (Shepard *et al.*, 1974). Αναπτύσσονται στα θρεπτικά υλικά των μυκοπλασμάτων αλλά οι αποικίες τους δεν έχουν απλωτή περιφέρεια και είναι πολύ μικρές (15-25μm). Ο χρόνος ανάπτυξης των αποικιών κυμαίνεται από 1 με 4 ημέρες (Αρσένη, Α.). Μπορούν και προσκολλούν σε μία ποικιλία κυτάρων όπως τα επιθηλιακά κύτταρα της ουρήθρας, τα σπερματοζωάρια και τα ερυθροκύτταρα (Χiao *et al.*, 2010). Η προσκόλληση γίνεται με τη βοήθεια πρωτεϊνών οι οποίες εκφράζονται στην

επιφάνεια του κυττάρου τους (Saada *et al.*, 1991, Smith *et al.*, 1994). Μία μεγάλη οικογένεια πρωτεϊνών της επιφάνειας είναι οι MBA, οι οποίες είναι και πρωτεϊνικά αντιγόνα και έχουν χρησιμοποιηθεί στην ανάπτυξη αντιδραστηρίων για την διάγνωση και στον διαχωρισμό των οροτύπων (Kong *et al.*, 2000, Teng *et al.*, 1994, Xiao *et al.*, 2010, Zheng *et al.*, 1995). Για το *U.urealyticum* έχουν διαχωριστεί 10 ορότυποι (UUR2, UUR4, UUR5, UUR7-13) (Harasawa *et al.*, 1999, Kong *et al.*, 1999, Robertson *et al.*, 1982) ενώ για το *U.parvum* έχουν διαχωριστεί 4 ορότυποι (UPA1, UPA3, UPA6, UPA14) (Kong *et al.*, 1999, Kong *et al.*, 2000).

Οι δύο μικροοργανισμοί παρουσιάζουν γενικά ευαισθησία στις μακρολίδες (Hannan *et al.*, 1998, Kenny *et al.*, 1993) και στις κινολόνες (Kenny *et al.*, 2001) ενώ είναι ανθεκτικοί στις τετρακυκλίνες (Roberts *et al.*, 1986) καθώς και στην πενικιλίνη και στις κεφαλοσπορίνες αφού στερούνται κυτταρικό τοίχωμα (Kenny *et al.*, 2001). Επίσης, το *U.urealyticum* παρουσιάζει ευαισθησία στα αντιβιοτικά εβερνιμυκίνη, κουινοπριστίνη/δαλφοπριστίνη και τελιθρομυκίνη (Kenny *et al.*, 2001). Ο μικροοργανισμός *U.parvum* σε πρόσφατη έρευνα που έγινε για πρώτη φορά και αφορούσε τις γυναίκες της Νότιας Αφρικής έδειξε σε ορισμένες περιπτώσεις ανθεκτικότητα στις κινολόνες, στην ερυθρομυκίνη και στην αζυθρομυκίνη που οφείλεται σε μεταλλάξεις γονιδίων (Govender *et al.*, 2012).

Τα δύο είδη ουρεοπλάσματος μπορούν να απομονωθούν ξεχωριστά ή και μαζί από κλινικά δείγματα. Σχηματίζουν συμβιωτικές αποικίες στο ουρογεννητικό σύστημα σε υγιείς ανθρώπους, αλλά εμπλέκονται και σε λοιμώξεις. Το *U.urealyticum* στους άνδρες προκαλεί μη γονοκοκκική ουρηθρίτιδα (NGU), προστατίτιδα και επιδιδυμίτιδα (McCormack and Rein, 2000). Συχνά συνυπάρχει με λοίμωξη από *C.trachomatis*. Στις γυναίκες προκαλεί κολπίτιδα, τραχηλίτιδα, ενδομητρίτιδα, απομονώνεται από φλεγμαίνουσες σάλπιγγες, συσχετίζεται με ουρηθρικό σύνδρομο, πυελική φλεγμονώδη νόσο (PID) και περιγεννητικές επιπλοκές. Επίσης υπάρχει σημαντική συσχέτιση του μικροοργανισμού με πυελονεφρίτιδα (Pickering 1990) και λιθίαση του ουροποιητικού (Grenabo *et al.*, 1988, Waites 2003). Στην Ελλάδα, πρόσφατες έρευνες αναφέρουν ότι το 47,44% των ασθενών με συμπτώματα κολπίτιδας (Kechagia *et al.*, 2008) και το 52,9% των γυναικών

με χρόνια ουρηθρικό σύνδρομο (Baka *et al.*, 2009) ήταν θετικές στο *U.urealyticum*.

Επίσης, έχει αποδειχθεί ότι η παρουσία του *U.urealyticum* μεταξύ ανδρών με μη γονοκοκκική ουρηθρίτιδα είναι υψηλότερη από ότι μεταξύ ανδρών χωρίς NGU. Γι' αυτό, το *U.urealyticum* ίσως να παίζει σημαντικό ρόλο στην αιτιολογία της NGU (Palmer *et al.*, 1991). Λόγω της φορίας του στην ουρήθρα, η συσχέτιση του με τη μη γονοκοκκική ουρηθρίτιδα άργησε να εδραιωθεί, μετά την πρώτη περιγραφή από τον Shepard το έτος 1954. Ακολούθησαν αρκετές μελέτες με αντικρουόμενα αποτελέσματα μέχρι να επιβεβαιωθούν τα αξιώματα του Koch (Waites *et al.*, 2005). Σύμφωνα με τους Deguchi *et al.*, 2004, η φορία του *U.urealyticum* στην ουρήθρα ανδρών κυμαίνεται μεταξύ του 7,8-13,5%. Ο μικροοργανισμός, επίσης, απομονώνεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις στο 28,2% των δειγμάτων σπέρματος, αλλά η παρουσία του δεν σχετίζεται με την ηλικία των ανδρών και την κλινική σημειολογία (Andrade-Rocha 2003). Σύμφωνα με τη μελέτη των Takahashi *et al.*, 2006, στην Ιαπωνία, τα ποσοστά ανίχνευσης του μικροοργανισμού στα ούρα ασυμπτωματικών ανδρών συσχετίζονται με τη σεξουαλική δραστηριότητα και ανέρχονται στο 12% για το είδος *U.urealyticum* και στο 23% για το *U.parvum*. Ο λόγος για τον οποίο τα ουρεοπλάσματα σε κάποιες περιπτώσεις είναι συμβιωτικοί μικροοργανισμοί και σε άλλες προκαλούν ασθένειες είναι ακόμα άγνωστος, αλλά είναι πιθανόν να σχετίζεται με την λοιμογόνο ικανότητα των μικροοργανισμών, το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή ή με τοπικούς παράγοντες του γεννητικού συστήματος (Abele-Horn *et al.*, 1997, Breugelmans *et al.*, 2010, Foulon *et al.*, 1986, Lamont *et al.*, 1987, Naessens *et al.*, 1987, Yoon *et al.*, 1998). Υποψίες ότι συγκεκριμένα είδη ή ορότυποι των ουρεοπλασμάτων συνδέονται με συγκεκριμένες ασθένειες καθιστούν αναγκαίες τις έρευνες για να αναπτυχθούν μέθοδοι με τις οποίες θα προσδιορίζεται ο ορότυπος σε κάθε ασθενή.

Σε ότι αφορά τη συσχέτιση του *Ureaplasma spp.* με τη γυναικεία υπογονιμότητα, οι έρευνες που έχουν διεξαχθεί μέχρι σήμερα δεν έχουν καταλήξει σε οριστικά συμπεράσματα, καθώς τα αποτελέσματα είναι αντιφατικά. Ωστόσο θα πρέπει να σημειωθεί ότι ο μικροοργανισμός ανευρίσκεται συχνότερα σε υπογόνιμες γυναίκες και ότι στις γυναίκες αυτές η αποτελεσματικότητα των μεθόδων τεχνητής γονιμοποίησης μειώνεται (Fenkci

et al., 2002). Η σχέση γονιμότητας και φορίας του *Ureaplasma spp.* στο γεννητικό σύστημα του άρρενος δεν είναι απόλυτα διευκρινισμένη. Από παλαιότερη μελέτη που έγινε στην Ελλάδα σε ασυμπτωματικούς άνδρες, φαίνεται ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση της ανεύρεσης του μικροοργανισμού με παθολογικά ευρήματα στο σπέρμα (Gregoriou *et al.*, 1989).

1.2 Εργαστηριακή διάγνωση

1.2.1 Καλλιέργεια

Η καλλιέργεια του κλινικού δείγματος με στόχο την απομόνωση και ταυτοποίηση του παθογόνου αιτίου της λοιμώξεως είναι η κυριότερη εργαστηριακή πράξη για την ανίχνευση του αιτιολογικού παράγοντα της λοίμωξης και την εφαρμογή κατάλληλης αντιμικροβιακής θεραπείας. Η επιτυχία του στόχου αυτού εξαρτάται από ένα σύνολο γνώσεων και πράξεων, όπως είναι ο τρόπος λήψεως και μεταφοράς του κλινικού δείγματος στο εργαστήριο που εξασφαλίζει την καταλληλότητα του δείγματος, η επιλογή των θρεπτικών υλικών όπου το δείγμα θα καλλιεργηθεί κοινής και ειδικής χρήσεως, η εφαρμογή των απαραίτητων ποιοτικών ελέγχων και γενικά η τήρηση των βασικών κανόνων των τεχνικών της καλλιέργειας, με πρότυπο την τεχνική της πρωτοκαλλιέργειας (Αρσένη, Α., 1994).

Με τον όρο καλλιέργεια εννοούμε τον εμβολιασμό του κλινικού δείγματος στην επιφάνεια θρεπτικού υλικού σε τρυβλίο για απομόνωση μικροοργανισμών, με στόχο την απομόνωση αυτών. Η επώαση των καλλιεργημάτων γίνεται σε κλίβανο θερμοκρασίας 35⁰-37⁰C για 18-24 ώρες, ενώ για μικροοργανισμούς με βραδύ χρόνο αναπτύξεως, όπως είναι τα μυκοβακτηρίδια, η επώαση διαρκεί πολλές ημέρες ή εβδομάδες.

Η σειρά των τεχνικών μεθόδων που οδηγούν στην ταυτοποίηση του παθογόνου μικροοργανισμού που αναπτύχθηκε στα θρεπτικά υλικά πρωτοκαλλιέργειας κλινικού ή άλλου υλικού είναι η εξής:

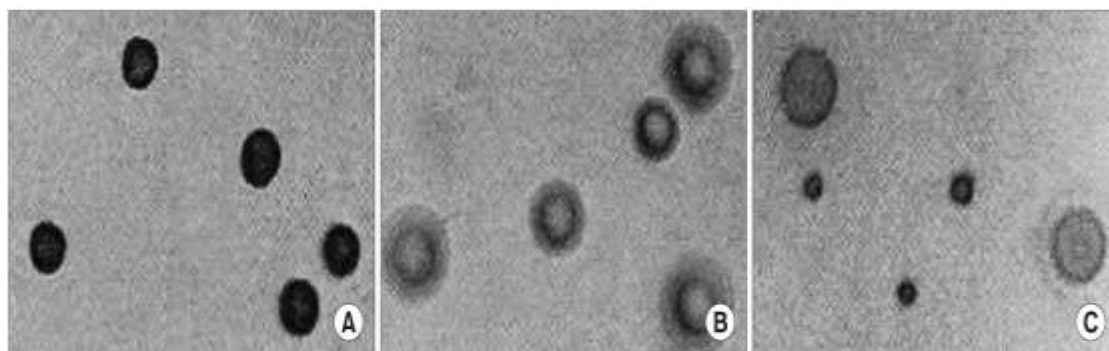
1. Μακροσκοπική εξέταση της μορφολογίας των αποικιών και των μεταβολών στο θρεπτικό υλικό για εντόπιση αποικίας πιθανώς παθογόνου ή ζητούμενου μικροοργανισμού.
2. Μικροσκοπική εξέταση της μορφολογίας του μικροοργανισμού και της συμπεριφοράς του στη χρώση Gram.
3. Ανακαλλιέργεια από την ύποπτη αποικία στην επιφάνεια ενός μη εκλεκτικού και ενός εκλεκτικού θρεπτικού υλικού με τεχνική αραιώσεως πάνω στο άγαρ για να ληφθούν μεμονωμένες αποικίες και διαχωρισμός των ζητούμενων αποικιών από τυχόν συνυπάρχοντες άλλους μικροοργανισμούς.
4. Από τις μεμονωμένες αποικίες θα γίνουν οι ταυτοποιητικές δοκιμές.

Ωστόσο, η μέθοδος της καλλιέργειας έχει και ορισμένους περιορισμούς οι οποίοι δυσκολεύουν πολύ την διάγνωση. Υπάρχουν μικροοργανισμοί οι οποίοι εμπλέκονται σε σοβαρές ασθένειες και αναπτύσσονται βραδέως, ενώ είναι αναγκαία η ταχύτερη διάγνωση της νόσου. Τέτοιο παράδειγμα είναι το *Mycobacterium tuberculosis* που ευθύνεται για την φυματίωση (Huard *et al.*, 2003). Άλλοι μικροοργανισμοί όπως η *Kingella kingae*, έχουν μεγάλες θρεπτικές απαιτήσεις και δεν αναπτύσσονται στα κοινά θρεπτικά υποστρώματα (Brachiow *et al.*, 2004). Επίσης, σε πολλές περιπτώσεις υπάρχει αδυναμία απομόνωσης του παθογόνου αίτιου λόγω χορήγησης αντιμικροβιακής θεραπείας και τέλος με τις καλλιέργειες δεν μπορεί να γίνει διάγνωση ιογενών λοιμώξεων.

Οι μικροοργανισμοί *Mycoplasma* και *Ureaplasma* μπορούν να καλλιεργηθούν και να αναπτυχθούν σε τεχνητά θρεπτικά υλικά, υγρά και στερεά. Έχουν αυστηρές διατροφικές ανάγκες, ιδιαίτερα σε λιπίδια, που τα χρειάζονται για την σύνθεση της κυτταροπλασματικής τους μεμβράνης.

Το άγαρ A7 είναι το κατεξοχήν στερεό θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιείται για την καλλιέργειά τους. Περιέχει ζυμό τρυπτικάσης και σόγιας, 0,015% αστέρα θειικού μαγγανίου, ορό ίππου, εκχύλισμα μάγιας, υδροχλωρική L-κυστεΐνη, 0,1% ουρία και πενικιλίνη, σε pH 6.0 (Shepard *et al.*, 1976). Αφού το δείγμα ενοφθαλμιστεί στο θρεπτικό υλικό, επωάζεται σε κλίβανο για 48 ώρες στους 36⁰C με 10% CO₂. Το καλλιέργημα ελέγχεται για αποικίες με το οπτικό μικροσκόπιο με ξηρό φακό 10x σε 2-4 ημέρες. Για το *Mycoplasma* οι αποικίες είναι μικρές, άχρωμες και έχουν συχνά περιφέρεια

σαν «αυγά μάτια». Για το *Ureaplasma* οι αποικίες έχουν χρώμα σκούρο και είναι διαφόρου μεγέθους, στρογγυλές και κοκκώδεις και περιγράφονται «σαν αχινός» ή «σαν κουβάρι». Το σκούρο καφεοειδές τους χρώμα οφείλεται στο διοξειδίο του μαγγανίου που προκύπτει από την αντίδραση του εστέρα του θειικού μαγγανίου με την αμμωνία (Shepard *et al.*, 1974, Kotrotsiou *et al.*, 2010).



Εικόνα 1. (A) Μικροσκοπική εικόνα *Ureaplasma urealyticum* σε άγαρ A7. (B) Μικροσκοπική εικόνα *Mycoplasma hominis* σε άγαρ A7. (C) Μικροσκοπική εικόνα και των δύο σε άγαρ A7. (Park *et al.*, 2006).

1.2.2 Εμπορικά διαθέσιμες δοκιμασίες ανίχνευσης

Στο εμπόριο κυκλοφορούν τυποποιημένες μέθοδοι ανίχνευσης του μικροοργανισμού καθώς και προσδιορισμού της ευαισθησίας του. Οι μέθοδοι αυτές είναι πρακτικές και εύκολες στη χρήση τους και χαρακτηρίζονται από επαναληψιμότητα. Αποτελούνται από κυπέλια που περιέχουν εκλεκτικό καλλιεργητικό ζυμό για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού όταν βρίσκεται σε υψηλή συγκέντρωση ($\geq 10^4$ CFU/ml), καθώς και τα αντιμικροβιακά φάρμακα σε λυοφιλοποιημένη μορφή, το καθένα σε δύο συγκεντρώσεις, με όρια ευαισθησίας που χρησιμοποιούνται για τους κοινούς μικροοργανισμούς, χαρακτηρίζοντας το υπό μελέτη στέλεχος ως ευαίσθητο, μετρίως ευαίσθητο ή ανθεκτικό. Τα αποτελέσματα είναι συγκρίσιμα με αυτά των πρότυπων μεθόδων προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης αντιβιοτικού (MIC).

Κύριο πλεονέκτημα αυτών των εμπορικών kit είναι η δυνατότητα που παρέχουν στον έλεγχο μεμονωμένων στελεχών με εφαρμογή στην

καθημερινή κλινική πράξη. Η ικανότητα και η τεχνική του χειριστή παρεμβάλλονται λιγότερο στο αποτέλεσμα σε σχέση με τις μεθόδους αναφοράς που απαιτούν έμπειρο τεχνικά προσωπικό, μια και οι συγκεντρώσεις των φαρμάκων και οι αναλογίες των υποστρωμάτων των κυττελίων είναι προκαθορισμένες και έτοιμες προς χρήση.

Σήμερα για το *Mycoplasma spp.* και το *Ureaplasma spp.* υπάρχουν αρκετές εμπορικές δοκιμασίες με τις οποίες μπορεί να γίνει ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των μικροοργανισμών καθώς και εξέταση της ευαισθησίας τους σε μία σειρά αντιβιοτικών (*Mycoplasma* IST 2 (Biomerieux), *Mycoplasma* IES (Autobio Diagnostics), *Mycoplasma* GU Screen (Bioplus)).

1.2.3 Ορολογικές μέθοδοι

Οι ορολογικές μέθοδοι βασίζονται στις αντιδράσεις που συμβαίνουν μεταξύ αντιγόνων και αντισωμάτων. Γίνονται είτε για διαγνωστικούς σκοπούς, είτε για την εκτίμηση του βαθμού ανοσίας ατόμων ή ομάδας ατόμων προς μια επιδημική ή ενδημική ή νοσοκομειακή νόσο κατόπιν αφανών λοιμώξεων και εμβολιασμών. Οι ορολογικές δοκιμές χρησιμοποιούνται, επίσης, για την αναζήτηση και ταυτοποίηση μικροβιακών αντιγόνων εφόσον διαθέτουμε τα αντισώματα. Η βασική αρχή όλων των ορολογικών δοκιμών είναι η ένωση του αντιγόνου με το αντίσωμα και η βασική αρχή κάθε μιας από τις ποικίλες ορολογικές εξετάσεις είναι να κάνει ορατό το αποτέλεσμα της ενώσεως αυτής, αυξάνοντας ταυτόχρονα την ευαισθησία και την ειδικότητα της μεθόδου. Το αντιγόνο μπορεί να είναι ολόκληρο το μικροβιακό κύτταρο ή να είναι ουσίες του κυτταρικού τοιχώματος ή ουσίες που παράγει και εκκρίνει ο μικροοργανισμός, όπως είναι οι τοξίνες και τα ένζυμά του. Το αντίσωμα από την άλλη μεριά είναι πάντα μια ανοσοσφαιρίνη (IgM, IgG) (Αρσένη, Α.).

Ωστόσο, ο ορολογικός έλεγχος για το *Mycoplasma* και το *Ureaplasma* δεν έχει διαγνωστική αξία γιατί τα αντισώματα υπάρχουν και σε μη νοσούντες φορείς και επιπλέον δε διαπιστώνεται σε καμία περίπτωση τετραπλασιασμός του τίτλου τους (Αρσένη, Α., 1994).

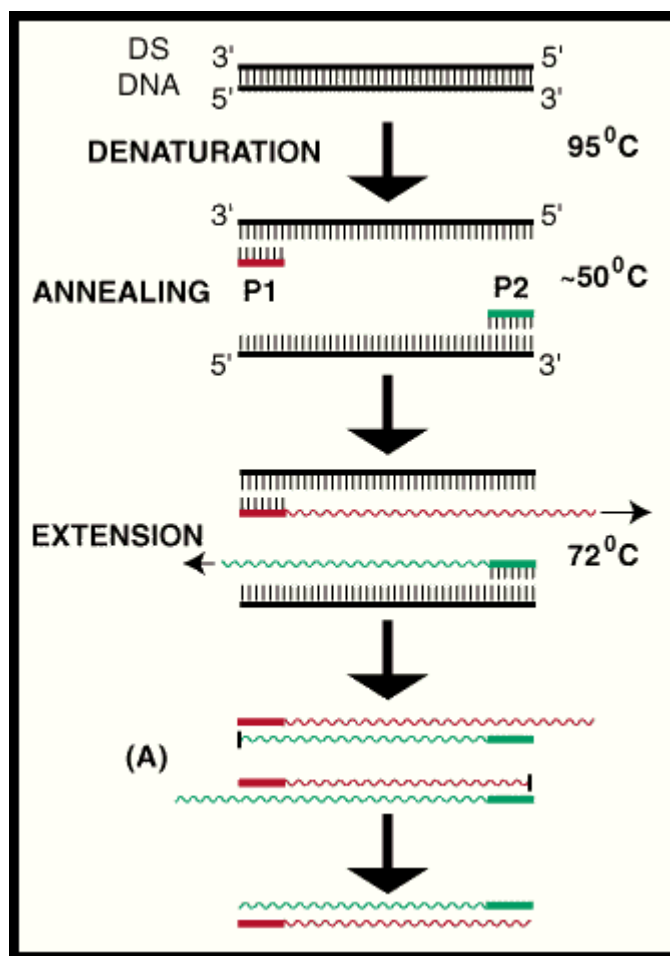
1.2.4 Μοριακές μέθοδοι

A. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η πιο γνωστή μοριακή μέθοδος που χρησιμοποιείται στην ανίχνευση των λοιμώξεων από *Mycoplasma* και *Ureaplasma* είναι η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR). Περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1983 από τον Kary Banks Mullis και εφαρμόζεται ευρέως για σκοπούς διαγνωστικούς ή μοριακής επιδημιολογίας (Mullis *et al.*, 1990). Πρόκειται για μία *in vitro* τεχνική, με τη βοήθεια της οποίας είναι εφικτός ο πολλαπλασιασμός συγκεκριμένων τμημάτων DNA. Για τον πολλαπλασιασμό αυτόν είναι απαραίτητες δύο συνθετικές ολιγονουκλεοτιδικές αφετηρίες (primers), οι οποίες είναι μικρά μονόκλινα μόρια DNA, που είναι συμπληρωματικά ως προς τις πλευρικές αλληλουχίες του DNA-στόχου.

Η αντίδραση αποτελείται από πολλαπλές κυκλικές επαναλήψεις, κάθε μία από τις οποίες περιλαμβάνει 3 στάδια (εικόνα 2).

1. Αποδιάταξη (denaturation) και διαχωρισμός της διπλής αλυσίδας του DNA σε υψηλή θερμοκρασία (94-96⁰C).
2. Σύνδεση των ολιγονουκλεοτιδίων (primers) με τις συμπληρωματικές περιοχές του DNA-στόχου σε χαμηλότερη θερμοκρασία (annealing).
3. Επιμήκυνση των 3' άκρων των ολιγονουκλεοτιδίων με τη βοήθεια της θερμοανθεκτικής DNA - πολυμεράσης (Taq πολυμεράση) και σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας στους 72⁰C (extension).



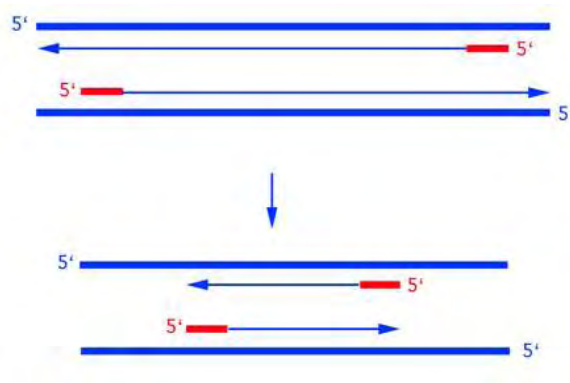
Εικόνα 2. Σχηματική απεικόνιση σταδίων PCR

Η σύνθεση του νέου DNA γίνεται με κατεύθυνση 5'- 3' και το μέγεθος του προϊόντος ποικίλλει. Στο τέλος του πρώτου κύκλου ολοκληρώνεται η σύνθεση των 4 αλυσίδων του DNA, οι οποίες θα αποτελέσουν τα πρότυπα για την σύνθεση των νέων αλυσίδων στον δεύτερο κύκλο κ.ο.κ. Με αυτόν τον τρόπο πραγματοποιείται ο πολλαπλασιασμός του DNA-στόχου 2^n , όπου n είναι ο αριθμός των κύκλων. Τις περισσότερες φορές η αντίδραση ολοκληρώνεται μέσα σε 2-3 ώρες και περιλαμβάνει 20-30 κύκλους.

Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου της PCR έναντι των κλασικών μεθόδων είναι ότι για την ανίχνευση των μικροοργανισμών δεν είναι απαραίτητο οι μικροοργανισμοί να είναι ζωντανοί, η μέθοδος είναι πιο ευαίσθητη και τα αποτελέσματα μπορούν να είναι διαθέσιμα σε μία μόνο ημέρα (Waites *et al.*, 2005).

B. Διπλή PCR (nested PCR)

Το κύριο χαρακτηριστικό της PCR είναι η ιδιαίτερα υψηλή ευαισθησία της μεθόδου. Η ευαισθησία είναι δυνατόν να αυξηθεί χρησιμοποιώντας την διπλή PCR (nested PCR). Το πρωτόκολλο της μεθόδου περιλαμβάνει δύο ζεύγη εκκινητών. Με το πρώτο ζεύγος των εκκινητών (amplified primers) ενισχύεται η αλληλουχία-στόχος, ενώ το δεύτερο ζεύγος των εκκινητών (sequencing primers), στοχεύει σε μία εσωτερική αλληλουχία του στόχου και λειτουργεί μόνο στα ενισχυμένα τμήματα όπου η αλληλουχία είναι απολύτως ακριβής. Έτσι αυξάνεται η ακρίβεια της αρχικής PCR. Το τελικό αποτέλεσμα διακρίνεται για την υψηλού βαθμού ακρίβεια, ειδικότητα και ευαισθησία. Ίσως το μόνο μειονέκτημα της διπλής PCR αποτελεί η πιθανή επιμόλυνση από τους πρόσθετους χειρισμούς των δειγμάτων.



Εικόνα 3. Διπλή PCR

Γ. PCR Πραγματικού Χρόνου (Real –Time PCR)

Η Real-Time PCR είναι μία ποσοτική PCR, η οποία καθιστά δυνατή τη μέτρηση του αριθμού των αντιγράφων (PCR προϊόντα) που παράγονται κατά την αντίδραση της PCR. Βασίζεται στην ανίχνευση και ποσοτικοποίηση του φθορισμού που εκπέμπεται από ειδικά φθοριοχρώματα. Η Real-Time PCR εκτός από το ζεύγος των εκκινητών, απαιτεί και έναν φθορίζων δείκτη, ο

οποίος είναι ένα ολιγονουκλεοτίδιο που βοηθάει στην οπτικοποίηση του αριθμού των προϊόντων της PCR.

Τυπικά, η αντίδραση PCR μπορεί να χωριστεί σε τέσσερις χαρακτηριστικές φάσεις: η πρώτη φάση είναι κρυμμένη κάτω από το «θόρυβο» του φθορισμού, η δεύτερη περιλαμβάνει την εκθετική ενίσχυση, η τρίτη τη γραμμική ενίσχυση και απότομη αύξηση του φθορισμού, ενώ η τέταρτη φάση χαρακτηρίζεται από την εξασθένηση του ρυθμού της εκθετικής συσσώρευσης προϊόντος (Kainz *et al.*, 2000). Η ποσότητα του παραγόμενου προϊόντος είναι ευθέως ανάλογη με την αρχική ποσότητα του στόχου στην αντίδραση μόνο κατά τη διάρκεια της εκθετικής φάσης ενίσχυσης (Pfaffl *et al.*, 2002).

Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου έναντι της απλής PCR αλλά και άλλων μοριακών μεθόδων είναι η ιδιαίτερα μεγάλη ευαισθησία που έχει, στην οποία οφείλεται η ανίχνευση αντιγράφων νουκλεϊκών αλληλουχιών λιγότερων από πέντε, ο μικρότερος χρόνος που απαιτείται για την αντίδραση με παράλληλη ανάλυση του αποτελέσματος, η υψηλή ακρίβεια, η επαναληψιμότητα εξαιτίας του αυτοματισμού της αντίδρασης και της ανάλυσης, η αποφυγή επιμολύνσεων, λόγω της εκτέλεσης της αντίδρασης σε ένα κλειστό υψηλής τεχνολογίας σύστημα ώστε να μην απαιτούνται χειρισμοί μετά την PCR για την ανάλυση του προϊόντος και να ελαχιστοποιούνται έτσι οι επιμολύνσεις στο εργαστήριο και τέλος η δυνατότητα ποσοτικοποίησης. Λόγω αυτών των πλεονεκτημάτων χρησιμοποιείται στην ανίχνευση και τυποποίηση πλήθους παθογόνων μικροοργανισμών (Espy *et al.*, 2006).

1.3 ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η ανίχνευση *Mycoplasma spp.* και *Ureaplasma spp.* σε κλινικά δείγματα που απομονώθηκαν από ασθενείς που προσήλθαν στα εξωτερικά ιατρεία της γυναικολογικής και ουρολογικής κλινικής του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας σε περίοδο ενός εξαμήνου, Ιούλιος 2013 - Δεκέμβριος 2013. Οι μικροοργανισμοί *Mycoplasma spp.* και *Ureaplasma spp.* την

τελευταία δεκαετία έχουν συγκεντρώσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας αφού συσχετίζονται με ποικίλες σεξουαλικά μεταδιδόμενες λοιμώξεις που εντοπίζονται στο ουρογεννητικό σύστημα. Η εισαγωγή των μοριακών μεθόδων στην εργαστηριακή διάγνωση διευκόλυνε την ανίχνευσή τους καθώς και την συγκέντρωση στοιχείων για τον επιπολασμό των ουρογεννητικών λοιμώξεων από αυτούς τους μικροοργανισμούς. Η ανίχνευση των μικροοργανισμών πραγματοποιήθηκε με τρεις διαφορετικές μεθόδους: με την εμπορική δοκιμασία Mycoplasma IES (Autobio Diagnostics) και δύο μοριακές μεθόδους, την PCR και την Real-Time PCR. Με το kit Mycoplasma IES έγινε συγκεκριμένα ποσοτικοποίηση του *U.urealyticum* και του *M.hominis* στα κλινικά δείγματα. Με την PCR πραγματοποιήθηκε ανίχνευση και διαχωρισμός του μικροοργανισμού σε *Mycoplasma spp* και *Ureaplasma spp*. Τέλος, με την Real-Time PCR πραγματοποιήθηκε ανίχνευση και ταυτοποίηση του μικροοργανισμού σε επίπεδο είδους.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Συλλογή και προέλευση των δειγμάτων

Το υλικό της μελέτης αποτέλεσαν 52 κλινικά δείγματα που προέρχονται από εξωτερικούς ασθενείς με συμπτώματα από το ουρογεννητικό σύστημα. Οι ασθενείς προσήλθαν στα εξωτερικά ιατρεία της γυναικολογικής και ουρολογικής κλινικής του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας σε περίοδο ενός εξαμήνου, Ιούλιος 2013 - Δεκέμβριος 2013. Από τα 52 κλινικά δείγματα που απομονώθηκαν τα 24 ήταν ουρηθρικά επιχρίσματα ανδρών, τα 16 κολπικά επιχρίσματα γυναικών και τα 12 σπέρμα ανδρών.

2.2 Ανίχνευση *Ureaplasma* και *Mycoplasma* με εμπορική δοκιμασία *Mycoplasma* IES

Σε πρώτο στάδιο, σε όλα τα δείγματα εφαρμόσθηκε η εμπορική δοκιμασία *Mycoplasma* IES (Autobio Diagnostics). Το πρωτόκολλο αυτό επιτρέπει την καλλιέργεια, ενδεικτική απαρίθμηση και εξέταση ευαισθησίας των υποειδών *Ureaplasma urealyticum* και *Mycoplasma hominis* στα αντιβιοτικά.

Το *Mycoplasma* IES συνδυάζει έναν εκλεκτικό καλλιεργητικό ζωμό με μια ταινία η οποία περιλαμβάνει 30 εξετάσεις. Ο ζωμός προσφέρει ιδανικές συνθήκες ανάπτυξης για το *Mycoplasma* και *Ureaplasma* (pH, υποστρώματα, συνδυασμός πολλών αυξητικών παραγόντων). Αν κάποια καλλιέργεια είναι θετική, τότε τα ειδικά υποστρώματα και ο δείκτης ερυθρό της φαινόλης που περιέχονται στο ζωμό (ουρία για το *Ureaplasma* και αργινίνη για το *Mycoplasma*) θα αλλάξουν χρωματισμό λόγω αύξησης του pH.

ΥΛΙΚΑ

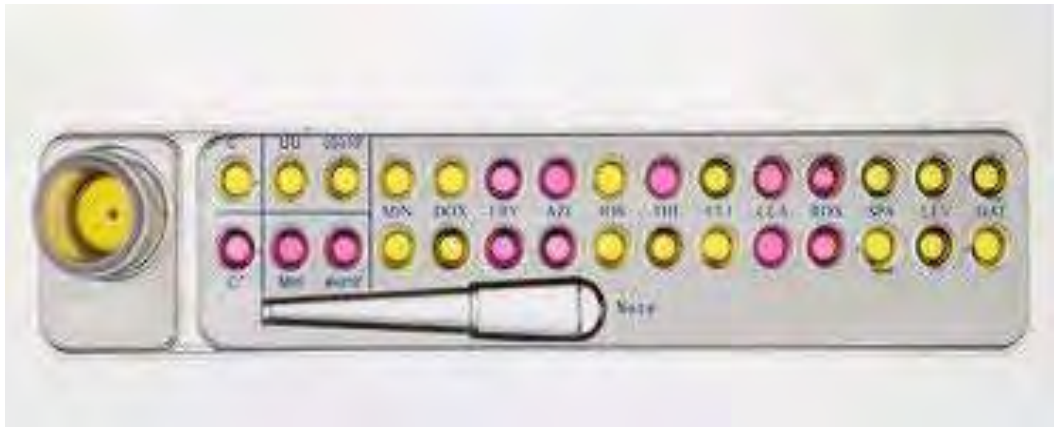
- ✓ Στυλεοί εμποτισμένοι με το δείγμα
- ✓ Φιάλες Mycoplasma R1: Κάθε φιαλίδιο περιέχει 3,1 ml ζωμού που ενσωματώνει τα σταθερά διατροφικά στοιχεία, που απαιτούνται για την προετοιμασία του δείγματος. Αναστέλλει την ανάπτυξη των περισσότερων Gram (+) και Gram (-) βακτηρίων και χρησιμοποιείται για την ανασύσταση του αντιδραστηρίου R2.
- ✓ Φιάλες Mycoplasma R2: Κάθε φιαλίδιο περιέχει 1 ml λυοφιλοποιημένου ζωμού ουρίας – αργινίνης.
- ✓ Ταινία Mycoplasma IES: Η ταινία περιλαμβάνει 30 εξετάσεις και διαιρείται σε 3 τμήματα (εικόνα 4):
 1. Ταυτοποίηση (κυπέλια αρ.1 έως 4)
 - κυπέλιο αρ. 1 και 2: έλεγχος ανάπτυξης
 - κυπέλιο αρ. 3 (UU): ταυτοποίηση του *Ureaplasma urealyticum*
 - κυπέλιο αρ. 4 (MH): ταυτοποίηση του *Mycoplasma hominis*

Κυπέλια	Εξετάσεις	Κύρια υποστρώματα
Αρ. 1 και 2	0 (έλεγχος)	Ερυθρό της φαινόλης
Αρ. 3	UU	Ερυθρό της φαινόλης – Λινκομυκίνη
Αρ. 4	MH	Ερυθρομυκίνη

2. Ενδεικτική απαρίθμηση (κυπέλια αρ. 5 και 6)

Το τμήμα αυτό προσδιορίζει αν η ποσότητα του μυκοπλάσματος στο δείγμα είναι ίση ή μεγαλύτερη ενός ορίου το οποίο ορίζεται στις 10^4 CFU (μονάδα σχηματισμού αποικίας).

Κυπέλια	Εξετάσεις	Κύρια υποστρώματα
Αρ. 5	$UU \geq 10^4$	Ερυθρό της φαινόλης – Λινκομυκίνη Ανασταλτικός παράγοντας
Αρ. 6	$MH \geq 10^4$	Ερυθρομυκίνη – Ανασταλτικός παράγοντας



Εικόνα 2.1 Ταινία Mycoplasma IES

3. Εξετάσεις ευαισθησίας (Κυπέλια αρ. 7 έως 30)

Τα κυπέλια αυτά χρησιμοποιούνται για την εξέταση της ευαισθησίας του στελέχους με 12 αντιβιοτικά σε 2 συγκεντρώσεις:

Κυπέλια	Αντιβιοτικά και συντομογραφίες		Συγκεντρώσεις mg/l	
Αρ. 7 και 8	Μινοκυκλίνη	MIN	2	8
Αρ. 9 και 10	Δοξυκυκλίνη	DOX	4	8
Αρ. 11 και 12	Ερυθρομυκίνη	ERY	2	8
Αρ. 13 και 14	Αζιθρομυκίνη	AZI	1	4
Αρ. 15 και 16	Τζοσαμυκίνη	JOS	2	8
Αρ. 17 και 18	Θιαμφενικόλη	THI	2	8
Αρ. 19 και 20	Κλινταμυκίνη	CLI	1	4
Αρ. 21 και 22	Κλαριθρομυκίνη	CLA	1	4
Αρ. 23 και 24	Ροξιθρομυκίνη	ROX	1	4
Αρ. 25 και 26	Σπαρφλοξασίνη	SPA	1	4
Αρ. 27 και 28	Λεβοφλαξίνη	LEV	1	4
Αρ. 29 και 30	Γατιφλοξασίνη	GAT	1	4

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Ενοφθαλμισμός του δείγματος και επεξεργασία των φιαλιδίων

1. Αφήνουμε το φιαλίδιο του Mycoplasma R1 να έρθει σε θερμοκρασία δωματίου

2. Μετά τη λήψη του δείγματος, τοποθετούμε αμέσως το στυλεό στο διάλυμα Mycoplasma R1.
3. Μεταφέρουμε 3ml από το ενοφθαλισμένο διάλυμα Mycoplasma R1 μέσα στο φιαλίδιο του Mycoplasma R2.
4. Έντονη ανάδευση σε vortex για να εξασφαλιστεί ότι η λυοφιλοποιημένη φάση έχει διαλυθεί πλήρως.

Προετοιμασία της ταινίας και επώαση

1. Αφήνουμε την ταινία να έρθει σε θερμοκρασία δωματίου και απορρίπτουμε το φακελίσκο αφυγραντή.
2. Εμβολιάζουμε 100 μίτου ζωμού μέσα σε κάθε ένα από τα 30 κυπέλια της ταινίας χρησιμοποιώντας πιπέτα
3. Προσθέτουμε 2 σταγόνες παραφινέλαιου σε κάθε κυπέλιο
4. Τοποθετούμε την καλύπτρα επάνω στην ταινία
5. Επωάζουμε την ταινία και τον εναπομείναντα ζωμό στο φιαλίδιο Mycoplasma R2 για 24h στους 36 – 38⁰C.

Αξιολόγηση της ταινίας

Διαβάζουμε την χρωματική μεταβολή των κυπελίων. Αν το χρώμα αλλάξει σε πορτοκαλί με κόκκινο αποδεικνύεται η ανάπτυξη μυκοπλάσματος ή ουρεοπλάσματος. Αν το χρώμα δεν αλλάξει ή γίνει κίτρινο τότε το δείγμα ή είναι αρνητικό ή ευαίσθητο σε κάποιο αντιβιοτικό. Αν ο ζωμός είναι θολερός, δεν είναι δυνατή η ερμηνεία της εξέτασης.

2.3 Εξαγωγή DNA από δείγματα

Η εξαγωγή του DNA από τα δείγματα πραγματοποιήθηκε με το εμπορικό kit Quick gDNA MiniPrep (ZYMO Research). Το υλικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν οι ζωμοί όπως προέκυψαν μετά την μεταχείριση των αρχικών στυλεών με το Mycoplasma IES (κεφάλαιο 2.2). Η εκχύλιση έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο του παρασκευαστή το οποίο παρατίθεται παρακάτω:

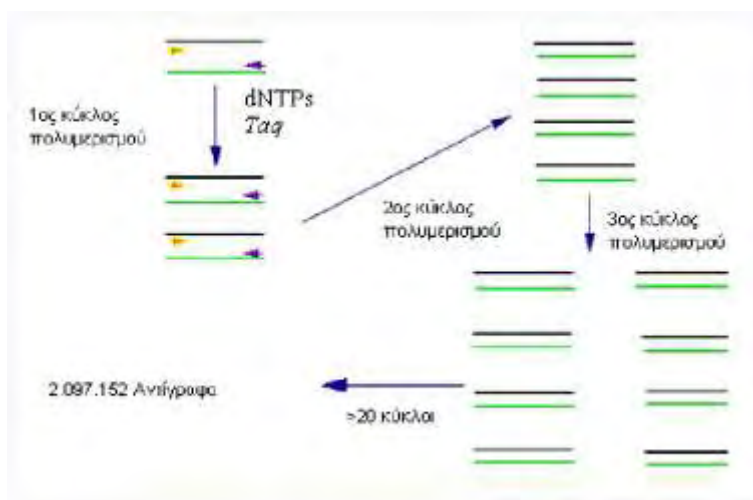
1. Ανάμιξη 200 μl ζωμού με 800 μl Lysis Buffer (αναλογία 4:1), ανάμιξη σε vortex και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min
2. Μεταφορά του δείγματος σε μία στήλη Zymo – Spin μέσα σε φιαλίδιο που παρέχονται από το kit (800+200 μl) και φυγοκέντρηση στις 11.400 rpm για 1 min
3. Μεταφορά της στήλης Zymo - Spin σε καθαρό φιαλίδιο, προσθήκη 200 μl Pre-Wash Buffer και φυγοκέντρηση στις 11400 rpm για 1 min
4. Μεταφορά της στήλης Zymo – Spin σε καθαρό φιαλίδιο και προσθήκη 500 μl Wash Buffer και φυγοκέντρηση στις 11.400 rpm για 1 min
5. Προσθήκη 50 μl DNA Elution Buffer, επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min και φυγοκέντρηση στις 14.680 rpm για 30 sec

Το διάλυμα που έχει διέλθει από την μεμβράνη είναι το DNA και αποθηκεύεται στους -20°C .

2.4 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR)

Η πιο ευρέως γνωστή τεχνική από τις NAATs (μέθοδοι ενίσχυσης νουκλεϊκών οξέων) είναι η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) (Mullis *et al.*, 1987, Saiki *et al.*, 1985). Η τεχνική της PCR χρησιμοποιεί δύο σχεδιασμένες ολιγονουκλεοτιδικές αλληλουχίες οι οποίες ονομάζονται εκκινητές και είναι συμπληρωματικές σε συγκεκριμένες περιοχές DNA που βρίσκονται στον οργανισμό-στόχο. Οι περιοχές αυτές πρέπει να είναι εύκολα προσβάσιμες για τους εκκινητές και αυτό επιτυγχάνεται με πολύ υψηλές θερμοκρασίες, οι οποίες αποδιατάσσουν τη διπλή έλικα του DNA σε εκείνη την περιοχή. Οι εκκινητές προσδένονται στα άκρα της αλληλουχίας-στόχου και οριοθετούν το τμήμα του DNA που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί. Στο τελευταίο στάδιο της αντίδρασης, το οποίο συνήθως πραγματοποιείται στους 72°C , η Taq πολυμεράση, μια θερμοσταθερή DNA πολυμεράση, αντιγράφει τους δύο κλώνους ξεκινώντας από τους εκκινητές. Αυτά τα τρία βήματα αποτελούν έναν κύκλο της PCR, στο τέλος του οποίου ο αριθμός των μορίων DNA που φέρουν την αλληλουχία-στόχο έχει διπλασιαστεί. Κατόπιν, η διαδικασία επαναλαμβάνεται, με αποτέλεσμα ο αριθμός των μορίων DNA που φέρουν την αλληλουχία-στόχο να τετραπλασιάζεται, στη συνέχεια να

οκταπλασιάζεται και ούτω καθεξής. Συνήθως η διαδικασία πραγματοποιείται για 25-40 κύκλους, οπότε δημιουργούνται εκατομμύρια αντίγραφα της αλληλουχίας-στόχου (Εικόνα 2.2). (Black *et al.*, 1997).



Εικόνα 2.2. Κύκλος της αντίδρασης PCR

Η αντίδραση της PCR ολοκληρώνεται στο ίδιο μείγμα αντιδραστηρίων, για το οποίο απαιτούνται:

- ✓ DNA στόχος
- ✓ Εκκινητικά μόρια (primers)
- ✓ Τριφωσφορικά δεοξυροβονουκλεοτίδια
- ✓ Ένζυμο DNA πολυμεράση
- ✓ Ιόντα Mg^{2+} απαραίτητα για την ενζυμική δράση
- ✓ Κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα pH~8,2 για την δράση του ενζύμου.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

ΥΛΙΚΑ

- 10x Taq Buffer with KCl (thermo scientific)
- 10x Taq Buffer with $(NH_4)_2SO_4$ (thermo scientific)
- $MgCl_2$ (25mM)
- Νουκλεοτίδια (dNTPs)
- Taq DNA πολυμεράση (thermo scientific)

- H₂O αποστειρωμένο
- Εκκινητές (primers) (πίνακας 1)

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία παρουσιάζονται στον πίνακα 1.

Εκκινητής	Αλληλουχία	Γονίδιο-στόχος
My-ins Mycoplasma Ureaplasma	5'-GTAATACATAGGTCGCAAGCGTTATC-3'	16S rRNA
MGSO-2-Bi Mycoplasma	5'-CACCATCTGTCACTCTGTTAACCTC-3	16S rRNA
UGSO-Bi Ureaplasma	5'-CACCACCTGTCATATTGTTAACCTC-3	16S rRNA

Πίνακας 2.1. Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην εργασία

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ενισχύουν τμήμα 520 bp του γονιδίου 16S rRNA για *Mycoplasma* και *Ureaplasma* (Yoshida *et al.*, 2003). Η μέθοδος της PCR με τα δύο ζεύγη εκκινητών εφαρμόστηκε και στα 52 δείγματα και ανιχνεύει *Mycoplasma* και *Ureaplasma* χωρίς να μπορεί να διαχωρίσει τα είδη. Στους πίνακες 2.2 και 2.3 παρουσιάζονται τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν, καθώς και οι θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες PCR.

Αντιδραστήρια	Όγκος	Τελική συγκέντρωση
Buffer με KCl (10x optimized)	3.5 μ l	1x
Buffer με $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (10x optimized)	1.5 μ l	1x
dNTPs (10mM)	3 μ l	0,2 mM
MgCl₂ (25mM)	4 μ l	2mM
Forward primer (100μmol/μl)	0.5 μ l	0.5 μ M
Reverse primer (100μmol/μl)	0.5 μ l	0,25 μ M
Πολυμεράση Taq (1U/μl)	0.2 μ l	5 U/ μ l
DNA	10 μ l	10-50 ng
ddH₂O	26.8 μ l	
Συνολικός όγκος	50 μ l	

Πίνακας 2.2. Αντίδραση PCR

Αρχική αποδιάταξη	95 °C για 10 min	
Αποδιάταξη	94 °C για 30 sec	50 κύκλους
Υβριδοποίηση	55°C για 30 sec	
Επιμήκυνση	72 °C για 1 min	
Τελική επιμήκυνση	72 °C για 7 min	

Πίνακας 2.3. Συνθήκες πραγματοποίησης της PCR

2.5 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτική αγαρόζης

Η μέθοδος που χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό και την αναγνώριση των θραυσμάτων DNA είναι η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Η τεχνική αυτή είναι απλή, γρήγορη και ικανή να διαχωρίζει μίγματα θραυσμάτων DNA που δεν μπορούν να διαχωριστούν με άλλες τεχνικές.

Σύμφωνα με αυτήν την τεχνική, τα θραύσματα DNA αναγκάζονται να κινηθούν μέσω των πόρων που σχηματίζονται σε πήκτωμα αγαρόζης, υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Η ηλεκτροφορητική ικανότητα του DNA στο πήκτωμα αγαρόζης εξαρτάται κυρίως από τέσσερις παραμέτρους: το μέγεθος του DNA, τη συγκέντρωση της αγαρόζης, τα στερεοδιάταξη του DNA και την ένταση του ηλεκτρικού ρεύματος. Η θέση του DNA στο πήκτωμα προσδιορίζεται με υπεριώδες φως και τη χρήση μικρής ποσότητας βρωμιούχου αιθιδίου, μιας φθορίζουσας χρωστικής που παρεμβάλλεται μεταξύ των αζωτούχων βάσεων του DNA. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε πήκτωμα αγαρόζης 2%. Πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση στα δείγματα DNA που εκχυλίστηκαν από τα κλινικά δείγματα που απομονώθηκαν και στα προϊόντα των PCR για τον έλεγχο της παρουσίας του επιθυμητού σε μέγεθος προϊόντος. Χαρακτηριστικές εικόνες ηλεκτροφόρησης παρατίθενται στο παράρτημα της παρούσας εργασίας.

Η μεθοδολογία παρατίθεται αναλυτικά παρακάτω:

ΥΛΙΚΑ

- ✓ WFI (Water For Injection – στείρο απυρετογόνο H₂O για τις αραιώσεις)
- ✓ TBE Buffer (Tris – Boric Acid – EDTA), 10x (Lonza)
- ✓ Agarose SeaKem LE (Lonza)
- ✓ Ethidium bromide Soln, (EtBr₂) 10mg/ml (Research Organics)
- ✓ 6x DNA Loading Dye Solution – κυανό της βρωμοφαινόλης (Fermentas)
- ✓ Gene Ruler 100bp DNA Ladder (Invitrogen)
- ✓ Λάμπα UV (MiniBisPro, Bio – Imaging Systems)
- ✓ Συσκευή ηλεκτροφόρησης (Classic CSSU78, Thermo ElectronCo)
- ✓ Τροφοδοτικό Τάσης (EC105 – LVD, Thermo ElectronCo)

- ✓ Φούρνος μικροκυμάτων
- ✓ Κωνική φιάλη 250ml
- ✓ Εκμαγείο και «χτενάκια» στερεοποίησης πηκτώματος
- ✓ Αυτόματα σιφώνια (πιπέτες), αποστειρωμένα ρύγχη και parafilm

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

- Αραίωση του TBE Buffer 10x σε συγκέντρωση 1x, με ανάμιξη 10ml TBE 10x και 90ml νερό (WFI).
- Σε κωνική φιάλη των 250 ml αναμιγνύονται 50 ml TBE Buffer 1x και 1g αγαρόζης έτσι ώστε να προκύψει διάλυμα αγαρόζης 2%w/v. Το διάλυμα αναμιγνύεται ζωηρά με κυκλική ανακίνηση της κωνικής φιάλης.
- Το διάλυμα θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων έως ότου διαλυθεί η αγαρόζη και με βρασμό να διαυγάσει το διάλυμα. Στη συνέχεια αφήνεται να κατέβει η θερμοκρασία περίπου στους 55⁰C (κωνική ανεκτή στην παρειά) ώστε το διάλυμα να μην επηρεάσει το πλαστικό εκμαγείο.
- Προστίθεται 6 μl βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr₂). Το βρωμιούχο αιθίδιο παρεμβάλλεται μεταξύ των ζευγών βάσεων του δίκλωνου DNA, φθορίζοντας σε μήκος κύματος 290nm.
- Τοποθετούνται τα «χτενάκια» στο εκμαγείο, για την δημιουργία βυθισμάτων υποδοχής του DNA, και αποχύνεται προσεκτικά το διάλυμα της αγαρόζης.
- Αφού στερεοποιηθεί εντελώς η αγαρόζη, αφαιρούνται προσεκτικά τα «χτενάκια» και το πήκτωμα είναι πλέον έτοιμο για ηλεκτροφόρηση του DNA, με εμβάπτιση του σε διάλυμα TBE Buffer 1x της συσκευής ηλεκτροφόρησης.
- Αναμειγνύονται 5 μl από ένα δείγμα DNA με 2 μl χρωστικής (κυανό της βρωμοφαινόλης) Loading Dye Soln και ακολουθεί η προσθήκη των δειγμάτων DNA στα βυθίσματα του πηκτώματος. Για τον προσδιορισμό του μήκους των προϊόντων της PCR είναι απαραίτητη η προσθήκη στο πήκτωμα ενός μάρτυρα μοριακού βάρους. Χρησιμοποιήθηκε 100 bp DNA Ladder (Invitrogen).

- Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε σταθερή τάση 160 Volts και ένταση 50 mA για 20 λεπτά. Το ηλεκτροφορηθέν πήκτωμα αγαρόζης τοποθετήθηκε σε συσκευή υπεριώδους φωτός, UV Photo MiniBisPro, Bio – Imaging Systems και φωτογραφήθηκε με Olympus Digital Camera που είναι ενσωματωμένη στη συσκευή.

2.6 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real – Time PCR)

Η Real- Time PCR αποτελεί σημαντικό εργαλείο στην έρευνα σήμερα, καθώς συνδυάζει τον πολλαπλασιασμό τμημάτων νουκλεϊνικών οξέων, με τη σύγχρονη παρακολούθηση της αντίδρασης σε πραγματικό χρόνο, την ανίχνευση των παραγόμενων προϊόντων και την ποσοτικοποίηση τους κατά απόλυτες και σχετικές τιμές. Πρόκειται για μέθοδο με υψηλή ευαισθησία, επαναληψιμότητα και ευρεία κλίμακα ποσοτικοποίησης (Pfaffl *et al.*, 2004). Μεγάλο πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η ταχύτητα με την οποία αποδίδει αποτελέσματα, γεγονός που οφείλεται στην αποφυγή των τεχνικών εκείνων που απαιτούνται για την ανίχνευσή των προϊόντων, όπως είναι η ανάλυση με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, η υβριδοποίηση, οι αντιδράσεις ανοσοεντοπισμού (Mackay *et al.*, 2004), αλλά και η μείωση του κινδύνου επιμολύνσεων και ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων από τους χειρισμούς των ανωτέρω τεχνικών.

Στη Real-Time PCR η ανίχνευση και η παρακολούθηση των προϊόντων εν τη γενέση τους επιτυγχάνεται με τη χρήση σημασμένων μορίων εκκινητών (ειδική σήμανση) ή φθορίζοντων μορίων που δεσμεύονται στην επιθυμητή αλληλουχία (μη ειδική σήμανση). Τα μόρια-σημαντές παράγουν φθορίζον σήμα, η ποσότητα του οποίου είναι ανάλογη με την ποσότητα του προϊόντος που ενισχύεται με την αντίδραση. Υπάρχουν αρκετές μέθοδοι για τη σήμανση και την ανίχνευση των προϊόντων της Real -Time PCR, οι σημαντικότερες από τις οποίες είναι οι ειδικοί σημασμένοι ανιχνευτές (TaqMan), τα ειδικά δίκλινα μόρια DNA που βασίζονται στη μεταφορά ενέργειας με απορρόφηση

ενέργειας (Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET) και οι μη ειδικές παρεμβαλλόμενες φθορίζουσες χρωστικές (SYBR Green I) (Pfaffl *et al.*,2004).

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Στην παρούσα εργασία η Real-Time PCR πραγματοποιήθηκε στη συσκευή RotorGene 6000 (Corbett Research). Η συσκευή διαθέτει κεφαλή 72 θέσεων για σωληνάκια PCR προτυλενίου των 0.1 ml και περιστρέφεται με ταχύτητα 500rpm. Σύμφωνα με τον κατασκευαστή, η συγκεκριμένη ταχύτητα περιστροφής εξασφαλίζει διαφορές θερμοκρασίας μεταξύ των δειγμάτων, μικρότερες του 0.01 K (Wilhelm *et al.*, 2003).



Εικόνα 2.3. Κυκλοποιητής Corbett Research

Τα πρωτόκολλα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στην ανίχνευση των *Mycoplasma* και *Ureaplasma* είναι τα *Ureaplasma parvum* / *Urealyticum* Real – TM (Sacace Biotechnologies), *Mycoplasma genitalium* Real – TM (Sacace Biotechnologies) και *Mycoplasma hominis* Real – TM (Sacace Biotechnologies). Συνεπώς σε αντίθεση με την κλασική PCR που προηγήθηκε, με την Real – Time PCR μπορέσαμε να ανιχνεύσουμε και να ταυτοποιήσουμε το είδος του μυκοπλάσματος σε κάθε δείγμα. Τα 3 πρωτόκολλα εφαρμόστηκαν και στα 52 δείγματα και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και οι συνθήκες του θερμοκυκλοποιητή

παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες για κάθε ένα μικροοργανισμό και είναι σύμφωνοι με τις οδηγίες του παρασκευαστή.

1. *Mycoplasma hominis*

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

Πίνακας 2.4. Αντίδρασης της Real – Time PCR

όπου N ο συνολικός αριθμός των δειγμάτων

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

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

Πίνακας 2.5. Συνθήκες πραγματοποίησης της Real – Time PCR

2. *Mycoplasma genitalium*

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

Πίνακας 2.6. Αντίδρασης της Real – Time PCR

όπου N ο συνολικός αριθμός των δειγμάτων

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

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

Πίνακας 2.7. Συνθήκες πραγματοποίησης της Real – Time PCR

3. *Ureaplasma parvum* και *Ureaplasma Urealyticum*

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

Πίνακας 2.8. Αντίδρασης της Real – Time PCR

όπου N ο συνολικός αριθμός των δειγμάτων

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

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

Πίνακας 2.9. Συνθήκες πραγματοποίησης της Real – Time PCR

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Αποτελέσματα της ανίχνευσης και ταυτοποίησης των μικροοργανισμών με τις τρεις μεθόδους

Εξετάστηκαν 52 δείγματα (24 ουρηθρικά επιχρίσματα, 16 τραχηλικά επιχρίσματα, 12 δείγματα σπέρματος) από ασθενείς του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας με κλινική υποψία λοίμωξης από *Mycoplasma* ή *Ureaplasma*. Τα δείγματα αναλύθηκαν τόσο με την εμπορική δοκιμασία *Mycoplasma* IES όσο και με την PCR και την Real-Time PCR. Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, 22 από τα 52 δείγματα ήταν αρνητικά και με τις τρεις μεθόδους ενώ 30 δείγματα ήταν θετικά με κάποια από τις 3 μεθόδους. Επίσης, υπάρχουν δείγματα στα οποία συνυπάρχουν οι μικροοργανισμοί των δύο ειδών. Στον πίνακα 3.1 παρουσιάζονται τα θετικά και τα αρνητικά δείγματα και για τις τρεις μεθόδους καθώς και η ευαισθησία τους και η ειδικότητά τους. Η ευαισθησία της Real-Time PCR είναι 100%. Από τα 30 θετικά δείγματα της Real-Time PCR, η PCR έδωσε θετικό αποτέλεσμα σε 16 δείγματα (ευαισθησία 53,3%) από αυτά ενώ το *Mycoplasma* IES σε 15 δείγματα (ευαισθησία 50%).

Τεχνική		Αριθμός Δειγμάτων	Ευαισθησία	Ειδικότητα
Mycoplasma IES	Θετικά	15	50%	100%
	Αρνητικά	37		
PCR	Θετικά	16	53,3%	100%
	Αρνητικά	36		
Real-Time PCR	Θετικά	30	100%	100%
	Αρνητικά	22		

Πίνακας 3.1. Σύγκριση της ειδικότητας και της ευαισθησίας των τριών μεθόδων στη διάγνωση λοιμώξεων από *Mycoplasma* και *Ureaplasma*

Συγκεκριμένα, με τη μέθοδο Mycoplasma IES από τα 15 θετικά δείγματα, τα 14 (26.9%) ήταν θετικά για *Ureaplasma (U.urealyticum)* ενώ 1 (1.92%) ήταν θετικό και για *Mycoplasma (M.hominis)* και για *Ureaplasma*. Με την PCR, 11 (21,1 %) δείγματα ήταν θετικά και για τα δύο είδη μικροοργανισμών ενώ 5 (9,6%) δείγματα ήταν θετικά μόνο για *Ureaplasma*. Τέλος, με την Real-Time PCR από τα 30 θετικά δείγματα, τα 15 ήταν θετικά για *Mycoplasma hominis*, το 1 για *Ureaplasma urealyticum*, τα 6 για *Ureaplasma parvum*, σε κανένα δείγμα δεν ανιχνεύθηκε *Mycoplasma genitalium* ενώ σε 5 δείγματα ανιχνεύθηκε *Mycoplasma hominis* και *Ureaplasma urealyticum* και σε 3 δείγματα *Mycoplasma hominis* και *Ureaplasma parvum*.

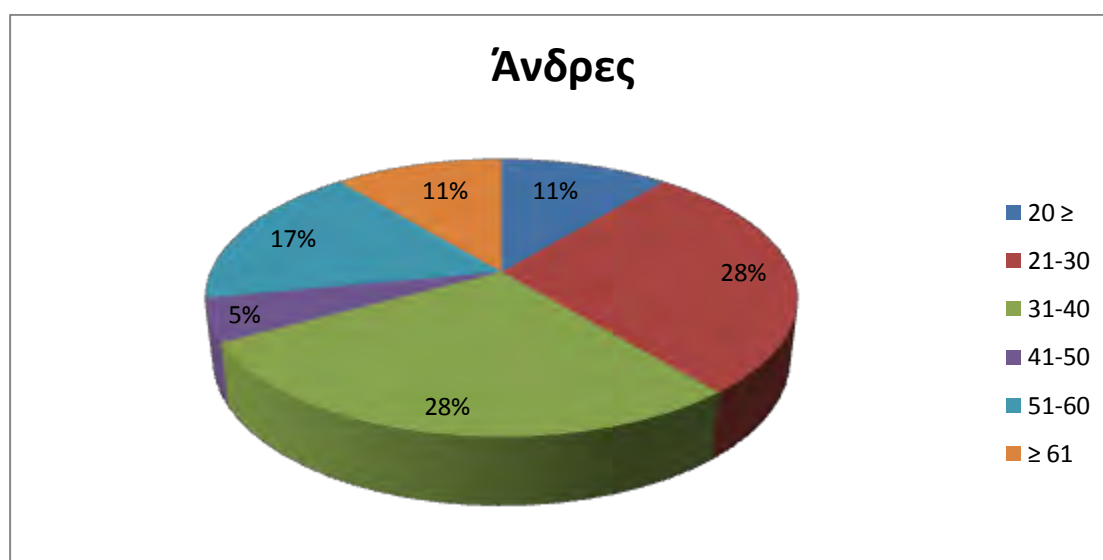
Αριθμός δειγμάτων	<i>M.hominis</i>	<i>M.genitalium</i>	<i>U.urealyticum</i>	<i>U.parvum</i>
15	+	-	-	-
0	-	+	-	-
1	-	-	+	-
6	-	-	-	+
5	+	-	+	-
3	+	-	-	+
22	-	-	-	-
52	23	0	6	9

Πίνακας 3.2. Αποτελέσματα Real-Time PCR

Στα δείγματα αυτά λόγω κλινικής υποψίας είχε ζητηθεί και καλλιέργεια για παθογόνα βακτήρια. Στα περισσότερα δείγματα ανευρέθηκε ανάπτυξη φυσιολογικής χλωρίδας ενώ σε 5 δείγματα υπήρξε συνύπαρξη των *Mollicutes* με άλλους παθογόνους μικροοργανισμούς (*Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Staphylococcus aureus*).

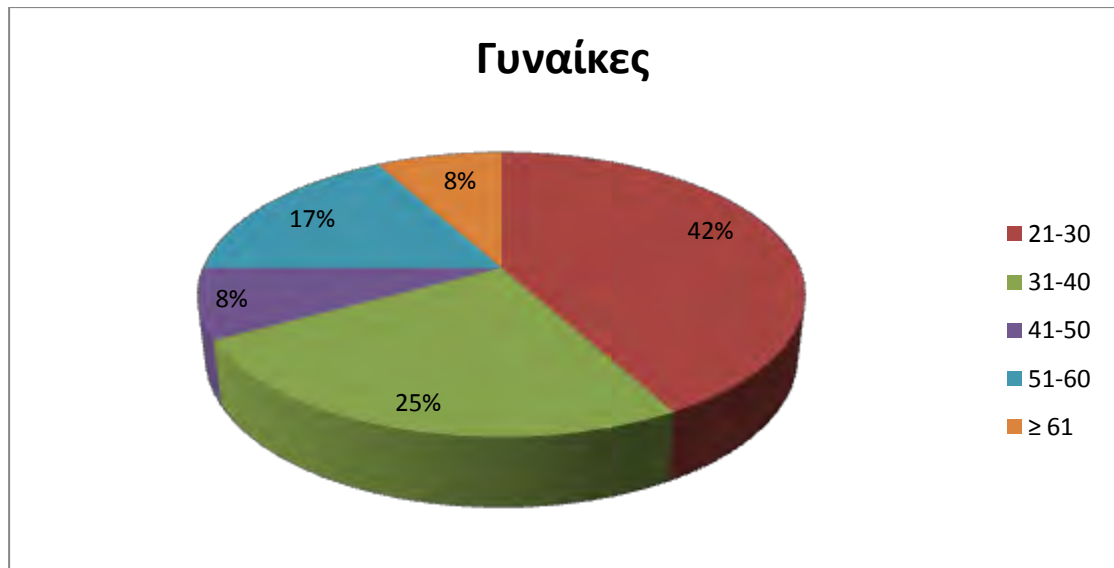
3.2 Αποτελέσματα επιδημιολογικής μελέτης

Από τα 52 κλινικά δείγματα που εξετάστηκαν τα 36 ανήκαν σε άνδρες και τα 16 σε γυναίκες. Βασιζόμενοι στα αποτελέσματα της Real-Time PCR, από τα 36 ουρηθρικά επιχρίσματα ή σπέρματα ανδρών, τα 18 (69.2%) ήταν θετικά είτε για *Mycoplasma spp.* είτε για *Ureaplasma spp.*. Στην ηλικιακή ομάδα κάτω των 20 ετών ανήκαν 4 δείγματα με 2 (50%) θετικά, στην ομάδα 21-30 ετών 7 δείγματα με 5 (71%) θετικά, στις ηλικίες 31-40 ετών 7 δείγματα με 5 (71%) θετικά, στην ομάδα 41-50 ετών 6 δείγματα με 1 (17%) θετικό, στην ομάδα 51-60 ετών 7 δείγματα με 3 (43%) θετικά, ενώ στους άνδρες ≥ 61 ετών ελήφθησαν 5 δείγματα και 2 (40%) ήταν θετικά.



Σχήμα 3.1. Απεικόνιση των ποσοστών των θετικών δειγμάτων των ανδρών ανά ηλικία

Στις γυναίκες από τα 16 τραχηλικά επιχρίσματα που εξετάστηκαν, τα 12 (30.8%) ήταν θετικά για *Mycoplasma spp.* ή *Ureaplasma spp.*. Στην ηλικιακή ομάδα 21-30 ετών ανήκαν 6 δείγματα με 5 (83%) θετικά, στην ομάδα 31-40 ετών 5 δείγματα με 3 (60%) θετικά, στις ηλικίες 41-50 ετών 2 δείγματα με 1 (50%) θετικό, στην ομάδα 51-60 ετών 2 δείγματα τα οποία ήταν και τα δύο θετικά (100%), ενώ στους άνδρες ≥ 61 ετών ελήφθησαν 2 δείγματα και 1 (50%) δείγμα ήταν θετικό.



Σχήμα 3.2. Απεικόνιση των ποσοστών των θετικών δειγμάτων των γυναικών ανά ηλικία

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα εργασία ασχοληθήκαμε με τα μυκοπλάσματα και τα ουρεοπλάσματα που αποικίζουν το ουρογεννητικό σύστημα και προσδιορίσαμε την συχνότητα ανίχνευσής τους σε κλινικά δείγματα του ουρογεννητικού συστήματος που προέρχονταν από το Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας σε περίοδο ενός εξαμήνου, Ιούλιος 2013 - Δεκέμβριος 2013. Η ανίχνευση των μικροοργανισμών πραγματοποιήθηκε με τρεις διαφορετικές μεθόδους διάγνωσης, μία συμβατική μέθοδο και δύο μοριακές. Συνεπώς πέραν του προσδιορισμού της συχνότητας ανίχνευσης των μικροοργανισμών μπορέσαμε να συγκρίνουμε και τις μεθόδους μεταξύ τους ως προς την ειδικότητα και την ευαισθησία τους.

Με την εμπορική δοκιμασία Mycoplasma IES, για το 2013, η συχνότητα ανίχνευσης του *U.urealyticum* είναι 26.9%, του *M.hominis* 0% και η συνύπαρξη των δύο 1,92%.

Μικροοργανισμός	Ποσοστό ανίχνευσης
<i>U.urealyticum</i>	18,4%
<i>M.hominis</i>	0%
<i>U.urealyticum/</i> <i>M.hominis</i>	0%

Πίνακας 4.1. Ποσοστά ανίχνευσης Μυκοπλάσματος και Ουρεοπλάσματος με την εμπορική δοκιμασία Mycoplasma IES στην περιοχή της Θεσσαλίας το 2012.

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματά μας με τον πίνακα 4.1 παρατηρούμε ότι η συχνότητα αποικισμού του *U.urealyticum* αυξήθηκε στην περιοχή της Θεσσαλίας μέσα σε ένα χρόνο. Το ίδιο παρατηρήθηκε σε μικρότερο βαθμό και για το *M.hominis* αφού συνυπήρχε σε ένα δείγμα με το *U.urealyticum*. Σε παρόμοια μελέτη που έγινε στη χώρα μας και αφορούσε συμπτωματικές γυναίκες, το 20,8% των γυναικών ήταν θετικές στο *U.urealyticum* ενώ το 1,9% ήταν θετικό στο *M.hominis* πάντα σε συνύπαρξη με το *U.urealyticum* (Baka *et al.*, 2012). Ανάλογη μελέτη των Imudia *et al.*, 2008, στις ΗΠΑ καταδεικνύει την ανίχνευση του *U.urealyticum* σε ποσοστό 20,1% και του *M.hominis* σε

ποσοστό 1,3%. Επίσης, στην Ιταλία οι Lukic *et al.*, 2006, χρησιμοποιώντας παρόμοιο εμπορικό kit ανίχνευσαν το *U.urealyticum* σε ποσοστό 19% σε ασυμπτωματικές γυναίκες.

Με την PCR, τα ποσοστά ανίχνευσης των μικροοργανισμών δεν διέφεραν πολύ από την εμπορική δοκιμασία. Με την PCR τα θετικά δείγματα ήταν 16, τα 15 που ήταν θετικά και με το εμπορικό kit και ένα ακόμα επιπλέον. Η κύρια διαφορά μεταξύ των δύο μεθόδων είναι τα ποσοστά ανίχνευσης των μικροοργανισμών σε επίπεδο γένους. Συγκεκριμένα με την PCR, η συχνότητα ανίχνευσης του γένους *Ureaplasma* είναι 9,6%, του γένους *Mycoplasma* 0% ενώ η συνύπαρξή και των δύο ανιχνεύθηκε σε ποσοστό 21,1%. Σε παρόμοια μελέτη των Gdoura *et al.*, 2007, τα ποσοστά ανίχνευσης των δύο γενών διαφέρουν σημαντικά με τα δικά μας αποτελέσματα. Το γένος *Ureaplasma* ανιχνεύθηκε σε ποσοστό 19,2%, το γένος *Mycoplasma* ανιχνεύθηκε σε ποσοστό 15,8% ενώ και τα δύο μαζί σε ποσοστό 5,8%.

Με την μέθοδο της Real-Time PCR πραγματοποιήθηκε ανίχνευση αλλά και ταυτοποίηση των μικροοργανισμών ως προς το είδος τους. Συγκεκριμένα, το 50% των θετικών κλινικών δειγμάτων ανήκαν στο είδος *M.hominis*, το 3,3% στο είδος *U.urealyticum*, το 20% στο είδος *U.parvum*, σε κανένα δείγμα δεν ανιχνεύθηκε *M.genitalium*, ενώ στο 16,7% ανιχνεύθηκε η παρουσία του *M.hominis* και του *U.urealyticum* και στο 10% η παρουσία του *M.hominis* και του *U.parvum*. Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε άλλες περιοχές είχαν εντελώς διαφορετικά αποτελέσματα. Οι Takahashi *et al.*, 2006, ανίχνευσαν το *M.hominis* σε ποσοστό 4%, το *M.genitalium* σε ποσοστό 1%, το *U.urealyticum* σε ποσοστό 12% και το *U.parvum* σε ποσοστό 23%. Επίσης, στην Τυνησία, το *U.urealyticum* ανιχνεύθηκε στο 15% των κλινικών δειγμάτων, το *U.parvum* στο 4,2%, το *M.hominis* σε ποσοστό 10,8% και το *M.genitalium* σε ποσοστό 5%. Η διαφοροποίηση των αποτελεσμάτων σχετίζεται τους παράγοντες που επηρεάζουν τον αποικισμό των μικροοργανισμών. Αυτοί είναι η ηλικία, το κοινωνικό-οικονομικό επίπεδο, η σεξουαλική δραστηριότητα με πολλαπλούς συντρόφους καθώς επίσης και η εθνικότητα. Φαίνεται πως οι αφρικανοί και οι αμερικάνοι εμφανίζουν μεγαλύτερα ποσοστά ανίχνευσης των μικροοργανισμών (Cassell *et al.*, 1993).

Ο μικροοργανισμός *M.genitalium* δεν ανιχνεύθηκε στα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στην εργασία. Γενικά ο μικροοργανισμός αν και είναι διαδεδομένος και συσχετίζεται με την μη γονοκοκκική ουρηθρίτιδα, αφού είναι το τρίτο συχνότερο αίτιο στο 15-25% των περιπτώσεων, πάντα έχει τα μικρότερα ποσοστά ανίχνευσης σε σχέση με τους υπολοίπους μικροοργανισμούς. Οι Ito et al., 2013, ανίχνευσαν σε ποσοστό 0,9% *M.genitalium*, 29,6% *M.hominis*, 27,8% *U.urealyticum*, και 20,1% *U.parvum*. Σε μελέτη που έγινε στην Αθήνα ανιχνεύθηκε σε ποσοστό 18% σε 150 δείγματα (Karanikolas et al., 2009).

Επίσης, παρατηρήσαμε ότι το *U.parvum* επικρατεί έναντι του *U.urealyticum*. Στην Βόρεια Ελλάδα οι Kotrotsiou et al., 2013, ανίχνευσαν το *Ureaplasma spp.* σε ποσοστό 16,1%, από τα οποία το 96,4% ήταν *U.parvum* ενώ το 3,6% ήταν *U.urealyticum*. Οι Jalal et al., 2013, επίσης απομόνωσαν το *U.parvum* σε ποσοστό 37% ενώ το *U.urealyticum* σε ποσοστό 16%.

Όπως αναφέραμε και πιο πάνω, ο αποικισμός των ουρεοπλασμάτων και των μυκοπλάσμάτων εξαρτάται από την ηλικία, τη σεξουαλική δραστηριότητα και το ορμονικό προφίλ. Στα αποτελέσματα της εργασίας μας με τη μέθοδο της Real-Time PCR ,παρατηρούμε ότι οι ηλικιακές ομάδες 21-30 ετών και 31- 40 ετών και στους άνδρες και στις γυναίκες συγκεντρώνουν τα μεγαλύτερα ποσοστά ανίχνευσης των μικροοργανισμών. Αυτό δεν είναι τυχαίο αφού σε αυτές τις ηλικιακές ομάδες τα άτομα έχουν έντονη σεξουαλική δραστηριότητα και με πολλαπλούς συντρόφους γεγονός που αυξάνει την πιθανότητα μετάδοσης των μικροοργανισμών. Παρόμοια παρατήρηση έγινε και από τους Kotrotsiou et al., 2013, όπου η πλειονότητα των φορέων του *U.urealyticum* ήταν γυναίκες σε αναπαραγωγική ηλικία. Επίσης, οι Iwasaka et al., 1986, είχαν ανιχνεύσει το *U.urealyticum* σε ποσοστό 40% σε σεξουαλικά ανενεργές γυναίκες, 67% σε σεξουαλικά ενεργές γυναίκες σε αναπαραγωγική ηλικία και 25% σε γυναίκες με εμμηνόπαυση.

Στην Ελλάδα οι μελέτες που έχουν γίνει για την συχνότητα ανίχνευσης των μυκόπλασμάτων και των ουρεοπλασμάτων δεν είναι πολλές και σε αυτές χρησιμοποιήθηκε κυρίως κάποια εμπορική δοκιμασία όπως είναι το Mycoplasma IES ή η καλλιέργεια και όχι η Real-Time PCR. Συνεπώς, τα

αποτελέσματά μας με την Real-Time δεν είναι συγκρίσιμα με τις μελέτες της υπόλοιπης Ελλάδας. Οι Kechagia *et al*, 2008, στην Αθήνα έλεγξαν 369 γυναίκες με κολπίτιδα με την εμπορική δοκιμασία Mycoplasma IST 2 Kit (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France). Το 37,1% των γυναικών ήταν θετικό είτε στο *M.hominis*, είτε στο *U.urealyticum*, είτε και στα δύο μαζί, πολλές φορές σε συνδυασμό με άλλους μικροοργανισμούς του γεννητικού συστήματος. Από αυτές, το 47,44% ήταν θετικό μόνο για *U.urealyticum*, το 0,72% μόνο για *M.hominis*, το 2,92% είχε και τα δύο ενώ στο 48,90% συνυπήρχαν τα γεννητικά μυκοπλάσματα με άλλους μικροοργανισμούς. Επίσης, οι Baka *et al.*, 2009, στην Αθήνα, ανίχνευαν σε γυναίκες με χρόνια ουρηθρικό σύνδρομο το *U.urealyticum* σε ποσοστό 52,9% και το *M.hominis* σε ποσοστό 3,3% με την μέθοδο της καλλιέργειας. Ωστόσο, μπορούμε να παρατηρήσουμε την εξέλιξη του επιπολασμού των μυκοπλασμάτων και ουρεοπλάσμάτων στην περιοχή της Θεσσαλίας τα τελευταία 6 χρόνια από δεδομένα του ερευνητικού εργαστηρίου της Μικροβιολογίας του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας. Παρατηρούμε με την πάροδο των χρόνων μία σταδιακή αύξηση στην ανίχνευση του *M.hominis* η οποία κορυφώνεται το 2013 ενώ παράλληλα τα ποσοστά ανίχνευσης του *U.parvum* μειώνονται.

Έτος	<i>M.hominis</i>	<i>M.genitalium</i>	<i>U.urealyticum</i>	<i>U.parvum</i>
2009	8,70%	0%	6,52%	84,78%
2010	2,5%	0%	20%	77,5%
2011	18,53%	7,40%	16,66%	57,41%
2012	19,10%	3,82%	8,92%	68,15%
2013	56,10%	2,44%	17,07%	24,39%

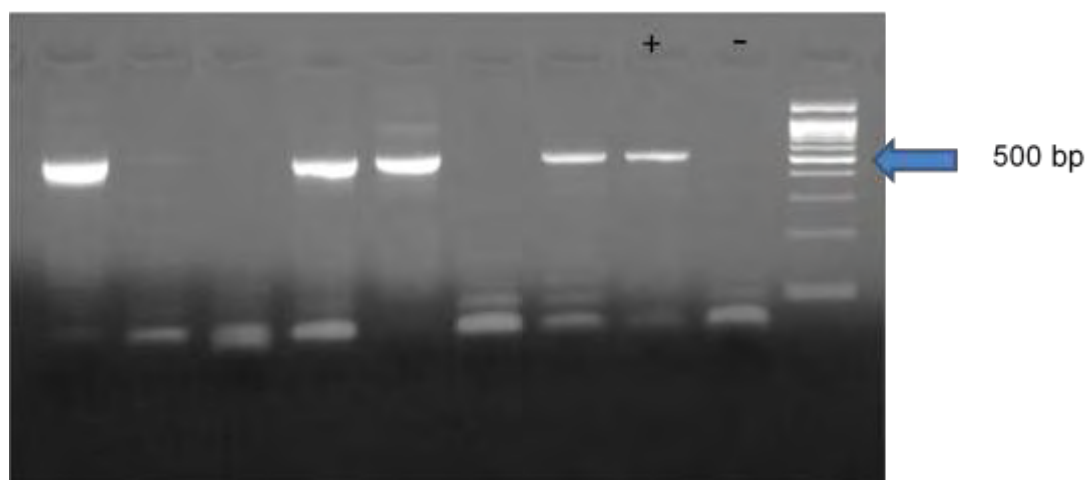
Με την Real-Time PCR, σύμφωνα με τα ευρήματα της εργασίας μας η συχνότητα των μικροοργανισμών στο ουρογεννητικό σύστημα σε άνδρες και γυναίκες είναι 57,7%. Μερικά από αυτά τα άτομα φέρουν τους μικροοργανισμούς σε πολύ χαμηλή συγκέντρωση και γι'αυτό δεν ήταν θετικά με την εμπορικό kit Mycoplasma IES και την PCR. Η διαφορά αυτή οφείλεται στην ιδιαίτερα μεγάλη ευαισθησία που έχει η Real-Time PCR έναντι της απλής PCR και ακόμα περισσότερο έναντι της εμπορικής δοκιμασίας. Στην

υψηλή ευαισθησία της οφείλεται η ικανότητά της να ανιχνεύει αντίγραφα νουκλεϊκών αλληλουχιών λιγότερων από πέντε (Espy *et al.*, 2006). Πέραν της μεγάλης ευαισθησίας της η Real-Time PCR χαρακτηρίζεται από ταχύτητα, υψηλή ακρίβεια, επαναληψιμότητα καθώς και έλλειψη κινδύνων επιμόλυνσης. Τα παραπάνω χαρακτηριστικά την καθιστούν χρήσιμο εργαλείο στην διαγνωστική προσέγγιση του μυκοπλάσματος και του ουρεοπλάσματος. Οι Choe *et al.*, 2013, σύγκριναν την Real-Time PCR με άλλες διαθέσιμες μεθόδους που χρησιμοποιούνται στην εργαστηριακή διάγνωση επτά σεξουαλικά μεταδιδόμενων λοιμώξεων συμπεριλαμβανομένου τα μυκοπλάσματα και τα ουρεοπλάσματα. Παρατήρησαν ότι η Real-Time PCR έχει 100% ευαισθησία και υψηλή ειδικότητα σε σχέση με τις άλλες μεθόδους. Παρόλο που έχει μεγαλύτερο κόστος, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως ένα ταχύτερο διαγνωστικό εργαλείο στην ταυτόχρονη διάγνωση πολλαπλών σεξουαλικά μεταδιδόμενων λοιμώξεων. Οι Xiao *et al.*, 2010, σχεδίασαν εκκινητές για μία Real-Time PCR με τους οποίους μπορούσαν να διαχωρίσουν το *Ureaplasma* spp. στα δύο είδη του. Διαπίστωσαν ότι η Real-Time PCR θα μπορούσε να αντικαταστήσει την απλή PCR και για κλινικούς διαγνωστικούς σκοπούς και θα μπορούσε να ήταν μία κατάλληλη εναλλακτική της καλλιέργειας. Επίσης, οι Pascual *et al.*, 2010, σχεδίασαν μία Real-Time PCR για την ανίχνευση του *M.hominis* και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι έχει υψηλή ευαισθησία, είναι σταθερή και δεν επηρεάζεται από εσωτερικές και εξωτερικές μεταβλητές.

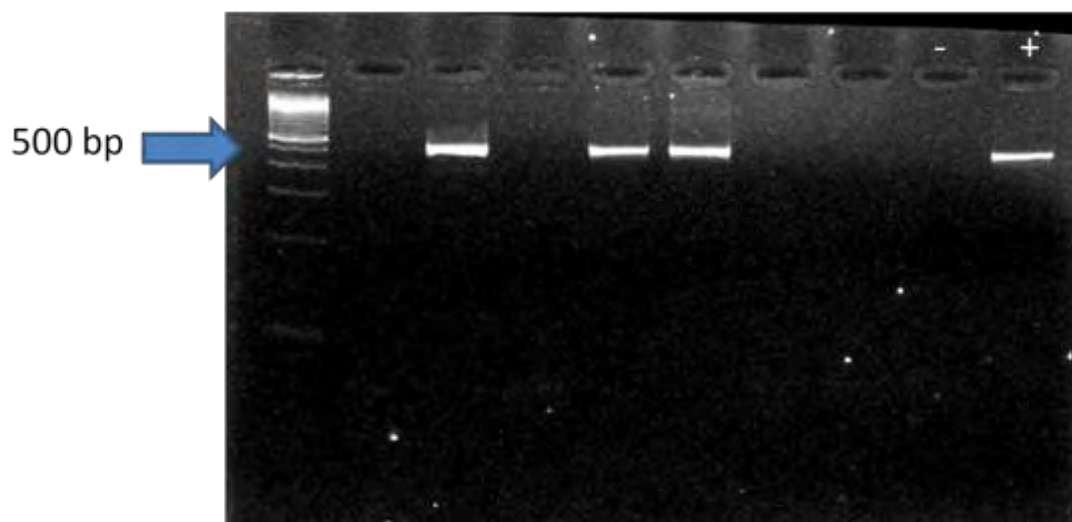
Συνεπώς, η συχνότητα ανίχνευσης του μυκοπλάσματος και του ουρεοπλάσματος είναι αρκετά υψηλή στην περιοχή της Θεσσαλίας στην Ελλάδα αν και είναι διαφορετική σε σύγκριση με άλλες χώρες ως προς το είδος του μικροοργανισμού που ανιχνεύεται. Στο σύνολο όμως των μικροοργανισμών τα ποσοστά είναι παραπλήσια. Επίσης, η Real-Time PCR είναι μία μέθοδος με υψηλή ευαισθησία και η εισαγωγή της στο κλινικό διαγνωστικό εργαστήριο είναι απαραίτητη. Ωστόσο, οι συμβατικές μέθοδοι δεν πρέπει να παρακαμφθούν αφού ο συνδυασμός και των δύο μπορεί να δώσει το καλύτερο διαγνωστικό αποτέλεσμα.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Χαρακτηριστικές εικόνες ηλεκτροφόρησης γονιδίων σε πήκτωμα αγαρόζης 2% των υπό μελέτη μικροοργανισμών.



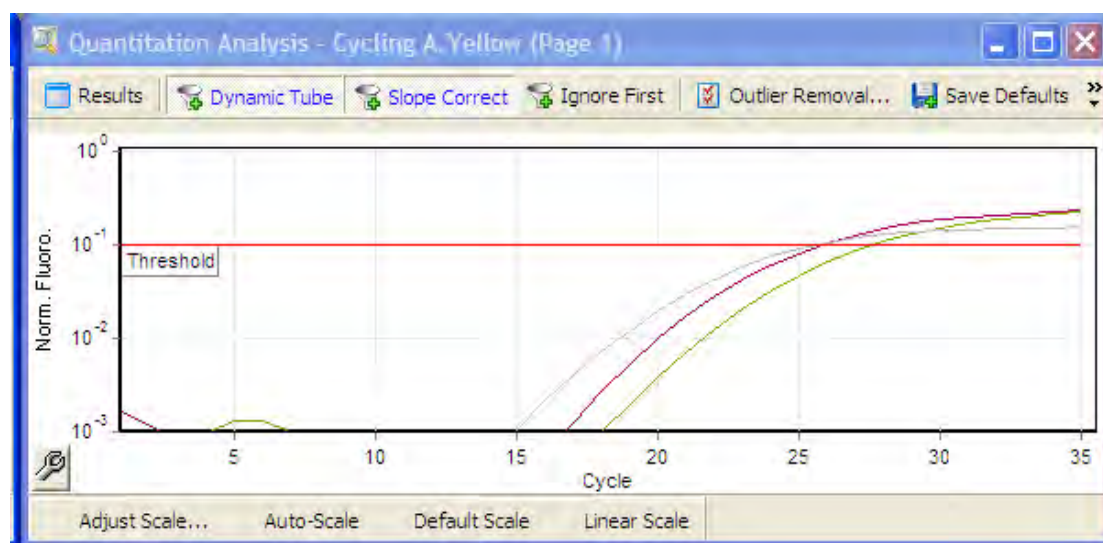
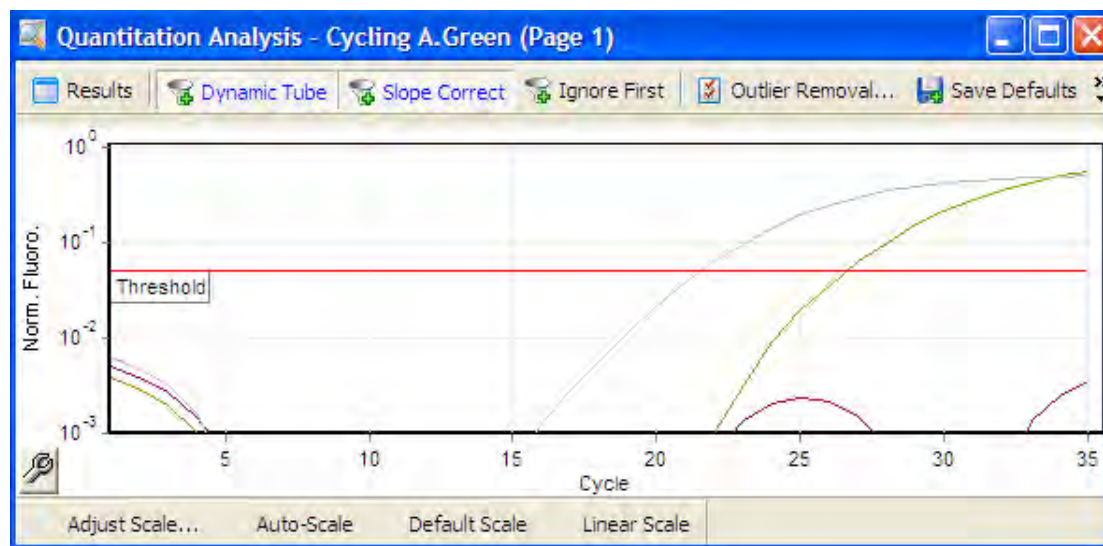
Εικόνα 1 . Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης τμήματος του γονιδίου 16S rRNA για *Ureaplasma* μεγέθους 520 bp σε 7 δείγματα.



Εικόνα 2. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης τμήματος του γονιδίου 16S rRNA για *Mycoplasma* μεγέθους 520 bp σε 7 δείγματα.

Χαρακτηριστικές εικόνες από την Real-Time PCR για κάθε ένα μικροοργανισμό

Mycoplasma hominis



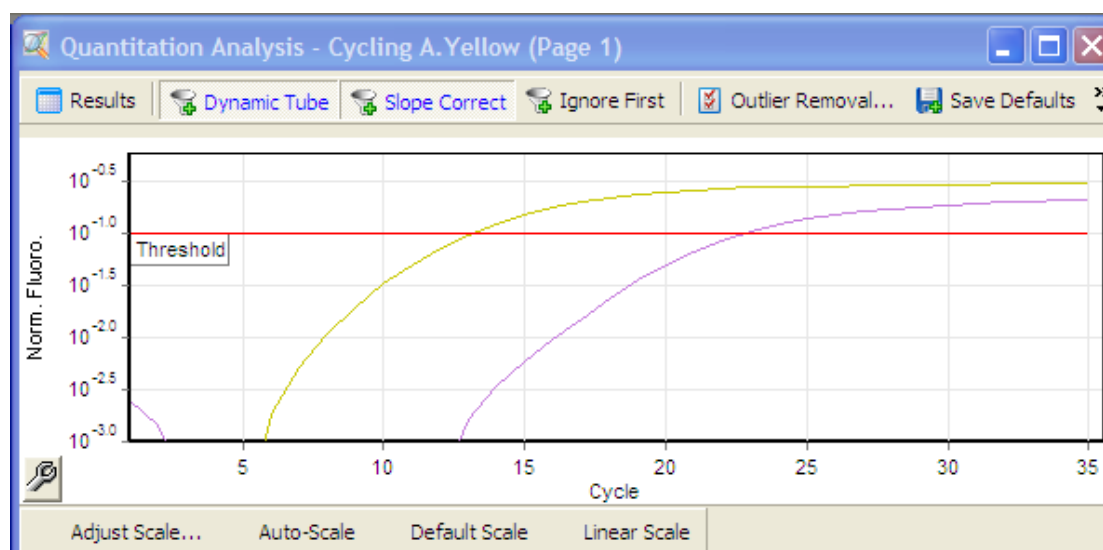
Εικόνες 3 και 4. Απεικόνιση αποτελεσμάτων Real-Time PCR. Στην πάνω φωτογραφία η καμπύλη δείχνει την ανίχνευση του *M.hominis*. Όταν η καμπύλη είναι πάνω από την γραμμή του threshold τότε το δείγμα είναι θετικό. Στην κάτω φωτογραφία η καμπύλη δείχνει το IC του μικροοργανισμού δηλαδή αν υπάρχει ή όχι DNA. Όταν η καμπύλη είναι πάνω από το threshold τότε υπάρχει DNA. Η καμπύλη με το πράσινο χρώμα είναι ένα θετικό δείγμα για *M.hominis*, η μοβ ένα αρνητικό δείγμα για *M.hominis* ενώ η γκρι καμπύλη είναι ο θετικός μάρτυρας.

Mycoplasma genitalium



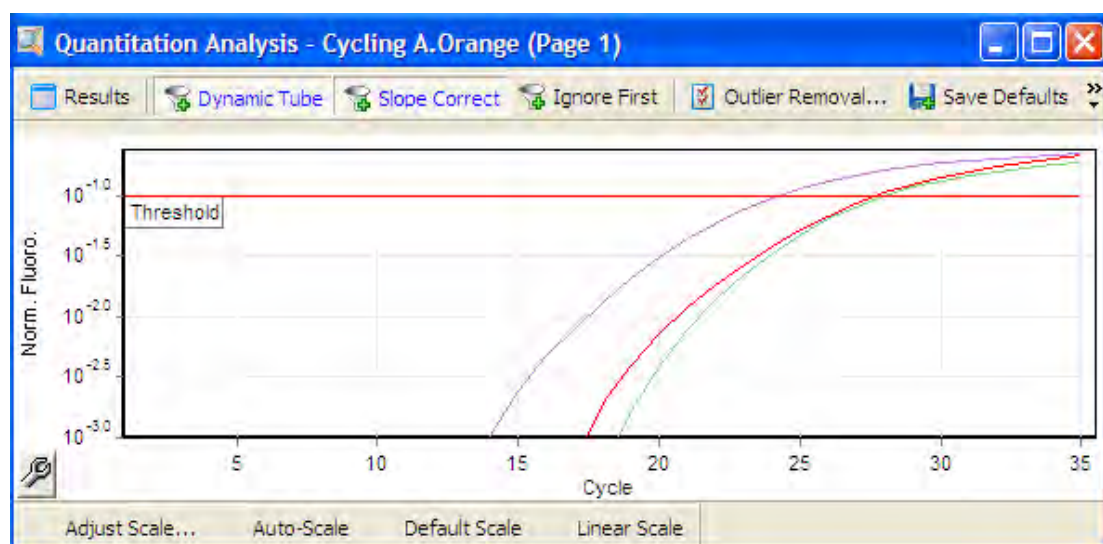
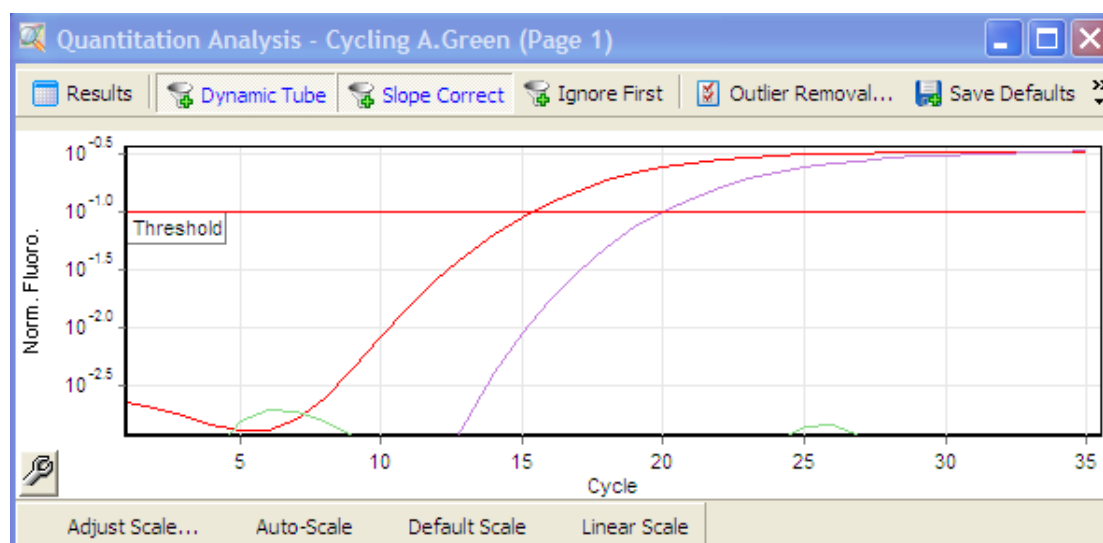
Εικόνες 5 και 6. Απεικόνιση αποτελεσμάτων Real-Time PCR. Στην πάνω φωτογραφία η καμπύλη δείχνει την ανίχνευση του *M.genitalium*. Όταν η καμπύλη είναι πάνω από την γραμμή του threshold τότε το δείγμα είναι θετικό. Στην κάτω φωτογραφία η καμπύλη δείχνει το IC του μικροοργανισμού δηλαδή αν υπάρχει ή όχι DNA. Όταν η καμπύλη είναι πάνω από το threshold τότε υπάρχει DNA. Η καμπύλη με το πράσινο χρώμα είναι ένα αρνητικό δείγμα για *M.genitalium* ενώ η μπλε καμπύλη είναι ο θετικός μάρτυρας.

Ureaplasma urealyticum



Εικόνες 7 και 8. Απεικόνιση αποτελεσμάτων Real-Time PCR. Στην πάνω φωτογραφία η καμπύλη δείχνει την ανίχνευση του *U. urealyticum*. Όταν η καμπύλη είναι πάνω από την γραμμή του threshold τότε το δείγμα είναι θετικό. Στην κάτω φωτογραφία η καμπύλη δείχνει το IC του μικροοργανισμού δηλαδή αν υπάρχει ή όχι DNA. Όταν η καμπύλη είναι πάνω από το threshold τότε υπάρχει DNA. Η καμπύλη με το κίτρινο χρώμα είναι ένα θετικό δείγμα για *U. urealyticum*, η καμπύλη με το μπλε χρώμα είναι ένα αρνητικό δείγμα ενώ η μοβ καμπύλη είναι ο θετικός μάρτυρας.

Ureaplasma parvum



Εικόνες 9 και 10. Απεικόνιση αποτελεσμάτων Real-Time PCR. Στην πάνω φωτογραφία η καμπύλη δείχνει την ανίχνευση του *U. parvum*. Όταν η καμπύλη είναι πάνω από την γραμμή του threshold τότε το δείγμα είναι θετικό. Στην κάτω φωτογραφία η καμπύλη δείχνει το IC του μικροοργανισμού δηλαδή αν υπάρχει ή όχι DNA. Όταν η καμπύλη είναι πάνω από το threshold τότε υπάρχει DNA. Η καμπύλη με το κόκκινο χρώμα είναι ένα θετικό δείγμα για *U. parvum*, η καμπύλη με το πράσινο χρώμα είναι ένα αρνητικό δείγμα ενώ η μοβ καμπύλη είναι ο θετικός μάρτυρας.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ξένα βιβλιογραφία

1. Abele-Horn, M., Peters, J., Genzel-Boroviczeny, O., Wolff, C., Zimmermann, A., Gottschling, W.: Vaginal *Ureaplasma urealyticum* colonization: influence on pregnancy outcome and neonatal morbidity. *Infection* 1997, 25:286-291.
2. Anagrus, C., Lore, B., Jensen, J.S., *Mycoplasma genitalium*: prevalence, clinical significance and transmission. 2005, *Sex. Transm. Infect.* 81:458-462.
3. Andrade_Rocha, F. T. *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* in men attending for routine semen analysis. Prevalence, incidence by age and clinical settings, influence on sperm characteristics, relationship with the leukocyte count and clinical value. *Urol. Int.* 2003, 71(4): 377-381.
4. Arraiz, R.N., et al., *Mycoplasma genitalium* detection with clinical manifestations in population of the Zulia State, 2008, Venezuela. *Rev. Chil. Infectol.* 25: 256-261.
5. Baczynska, A., et al. Morphology of human Fallopian tubes after infection with *Mycoplasma genitalium* and *Mycoplasma hominis*—in vitro organ culture study. 2007, *Hum. Reprod.* 22:968–979.
6. Baka, S., Kouskouni, E., Antonopoulou, S., Sioutis, D., Papakonstantinou, M., Hassiakos, D., Logothetis, E., Liapis, A., Prevalence of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* in women with chronic urinary symptoms, 2009, *Urology*, 74(1): 62-66.
7. Baka, S., Tsirmpa, I., Tsouma, I., Logothetis, E., Kouskouni, E., Increased quinolone-resistant *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* isolated in reproductive-age women with vulvovaginitis, 22nd European Congress of Clinical Microbiology and

- Infectious Diseases (ECCMID 2012), internet:
http://registration.akm.ch/einsicht.php?XNABSTRACT_ID=142204&XNSPRACHE_ID=2&XNKONGRESS_ID=161&XNMASKEN_ID=900
8. Bébéar, C.M., Grau, O., Charron, A., Renaudin, H., Gruson, D., and Bébéar, C., Cloning and nucleotide sequence of the DNA gyrase (*gyrA*) gene from *Mycoplasma hominis* and characterization of quinolone-resistant mutants selected in vitro with trovafloxacin, *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000 Oct. 44(10): 2719-2727.
 9. Bébéar, C.M., Renaudin, H., Bryskier, A., and Bébéar, C., Comparative Activities of Telithromycin (HMR 3647), Levofloxacin, and other antimicrobial agents against human mycoplasmas, *Antimicrob. Ag. And Chemoth.*, July 2000, p.1980-1982.
 10. Bébéar, C. M., and I. Kempf. 2005. Antimicrobial therapy and antimicrobial resistance, p.535-568. *In* A. Blanchard and G. F. Browning (ed.), *Mycoplasmas: pathogenesis, molecular biology, and emerging strategies for control*. Horizon Bioscience, Wymondham, United Kingdom.
 11. Bjartling, C., Osser, S., Persson, K., The association between *Mycoplasma genitalium* and pelvic inflammatory disease after termination of pregnancy. *BJOG*. 2010, 117: 361–364.
 12. Black, M.C., Current Methods of Laboratory Diagnosis of *Chlamydia trachomatis* Infections. *Clinical Microbiology Reviews*, Jan. 1997, p. 160–184.
 13. Brachlow, A., Chatterjee, A., Stamato, T., Endocarditis due to *Kingella kingae*: A patient report. *Clinic Pediatr Dis*. 2004,43:283–6.
 14. Breugelmans, M., Vancutsem, E., Naessens, A., Laubach, M., Foulon, W.: Association of abnormal vaginal flora and *Ureaplasma* species as risk factors for preterm birth: a cohort study. *Acta Obstet. Gynecol. Scand* 2010, 89:256-260.
 15. Burdett, V., Purification and characterization of tet(M), a protein that renders ribosomes resistant to tetracycline, 1991, *Jour. Of Biolog. Chem.* 266(5): 2872-2877.
 16. Burdett, V., Inamine, J. & Rajagopalan, S. (1982) *Microbiology 1982* (Schlessinger, D., ed) pp. 155-158, American Society for

Microbiology, Washington, D.C.

17. Cassell, G. H., Waites, K. B., Watson, H. L., Crouse, D. T., Harasawa, R. *Ureaplasma urealyticum* Intrauterine Infection: Role in Prematurity and Disease in Newborns. 1993, *Clin. Micro. Rev.* 6(1): 69-87.
18. Chee-Sanford, J. C., R. I. Aminov, I. J. Krapac, N. Garrigues-Jeanjean, and R. I. Mackie. 2001. Occurrence and diversity of tetracycline resistance genes in lagoons and groundwater underlying two swine production facilities. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:1494-1502.
19. Choe, H. S., Lee, D. S., Lee, S. J., Hong, S. H., Park, D. C., Lee, M. K., Kim, T. H., Cho, Y. H., Performance of Anyplex™ II multiplex real-time PCR for the diagnosis of seven sexually transmitted infections: comparison with currently available methods. 2013, *Int. J. Infect. Dis.* 17(12): 1134-1140.
20. Chopra, I., Roberts, M., Tetracycline antibiotics: Mode of action, applications, molecular biology and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2001. 65(2): 232-260.
21. Christiansen, G., Jensen, L.T., Boesen, T., Emmersen, J., Ladefoged, S.A., Schiøtz, L.K., Birkelund, S.: Molecular biology of *Mycoplasma*. *Wien Klin Wochenschr* 1997, 109:557-561.
22. Clausen, H.F., Fedder, J., Drasbek, M., Nielsen, P.K., Toft, B., Serological investigation of *Mycoplasma genitalium* in infertile women. *Hum Reprod*, 2001, 16: 1866–1874.
23. Clegg, A., Passey, M., Yoannes, M., Michael, A., High rates of genital *Mycoplasma* infection in the highlands of Papua New Guinea determined both by culture and by a commercial detection kit. 1997, *J. Clin. Microbiol.*, 35: 197-200.
24. Cohen, C.R., Manhart, L.E., Bukusi, E.A., Astete, S., Brunham, R.C., Association between *Mycoplasma genitalium* and acute endometritis. *Lancet* 2002. 359: 765–766.
25. Connell, S. R., Tracz, D. M., Taylor, D. E., Ribosomal Protection Proteins and Their Mechanism of Tetracycline Resistance, 2003. *Antimicrob. Agents Chemother*, 47:3675-3681.
26. Deguchi, T., Maeda, S., *Mycoplasma genitalium*: another important pathogen of non-gonococcal urethritis. *J Urol*, 2002, 167:1210-1217.

27. Deguchi, T., Yoshida, T., Miyazawa, T. Yasuda, M., Tamaki, M., Ishiko, H., Maeda, S. Association of *Ureaplasma urealyticum* (biovar 2) with nongonococcal urethritis. *Sex. Transm. Dis.* 2004, 31(3): 192-195.
28. Duggar BM. Aureomycin: a product of the continuing search for new antibiotics. *Ann NY Acad Sci* 51: 177–181, 1948.
29. Eickhoff, J. H., N. Frimodt-Moller, S. Walter, and C. Frimodt-Moller. 1999. A double-blind, randomized, controlled multicentre study to compare the efficacy of ciprofloxacin with pivampicillin as oral therapy for epididymitis in men over 40 years of age. *BJU Int.* 84:827–834.
30. Espy, M.J., Uhl, J.R., Sloan, L.M., Buckwalter, S.P., 2006. Real-time PCR in Clinical Microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin. Microbiol. Rev.* 19(1): 165-256.
31. Fagundo, R., Sanchez, A., Jauregui, J., Comportamiento antimicrobiano de aislamientos clinicos de *Mycoplasma hominis* y *Ureaplasma urealyticum* asi como la evolucion de su Resistencia en un period de cinco anos, 2006, *Labciencia*, 14(2): 75-79.
32. Falk, L., H. Fredlund, and J. S. Jensen. 2005. Signs and symptoms of urethritis and cervicitis among women with or without *Mycoplasma genitalium* or *Chlamydia trachomatis* infection. *Sex. Transm. Infect.* 81:73–78.
33. Fenkci, V., Yilmazer, M., Aktepe, O. Have *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* infections any significant effect on female fertility? *Le Infezioni in Medicina*, 2002, 9(5): 965-976.
34. Foulon W., Naessens A., Dewaele M., Lauwers S., Amy J.J.: Chronic *Ureaplasma urealyticum* amnionitis associated with abruption placentae. *Obstet Gynecol* 1986, 68:280-282.
35. Fraser, C.M., Gocayne, J.D., White, O., Adams, M.D., Clayton, R.A., et al. 1995. The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science*, 270: 397-403.
36. Gdoura, R., Kchaou, W., Chaari, C., Znazen, A., Keskes, L., Rebai, T., Hammami, A., *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum*, *Mycoplasma hominis* and *Mycoplasma genitalium* infections and semen quality of infertile men, 2007, *BMC, Infect Dis.* 7: 129.

37. Govender, S., Gqunta, K., le Roux, M., de Villiers, B., Chalkley, L.J., Antibiotic susceptibilities and resistance genes of *Ureaplasma parvum* isolated in South Africa, *J. Antimicrob. Chemother.*, 2012, 67(12):2821-2824.
38. Gregoriou, O., Botsis, D., Papadias, K., Kassanos, D., Liapis, A., Zourlas, P. A. Culture of seminal fluid in infertile men and relationship to semen evaluation. *Int. Gynaecol. Odstet.* 1989, 28(2): 149-153.
39. Grenabo, L., Hedelin, H., Pettersson, S., Urinary infection stones caused by *Ureaplasma urealyticum*: a review. *Scand J. Infect. Dis.* 1988, 53:46-49.
40. Haggerty CL, Totten PA, Astete SG, Lee S, Hoferka SL, et al. (2008) Failure of cefoxitin and doxycycline to eradicate endometrial *Mycoplasma genitalium* and the consequence for clinical cure of pelvic inflammatory disease. *Sex. Transm. Infect.* 84: 338–342.
41. Hamasuna, R., Osada, Y., Jensen, J.S., Isolation of *Mycoplasma genitalium* from First-Void Urine specimens by coculture with Vero cells, *J. Clin. Microbiol.* 2007. 45(3): 847-850.
42. Hannan, P. C. T. 1998. Comparative susceptibilities of various AIDS associated and human genital tract mycoplasmas and strains of *Mycoplasma pneumoniae* to 10 classes of antimicrobial agent in vitro. *J. Med. Microbiol.* 47:1115–1122.
43. Harasawa R, Kanamoto Y: Differentiation of two biovars of *Ureaplasma urealyticum* based on the 16S-23S rRNA intergenic spacer region. *J Clin Microbiol* 1999, 37(12):4135–4138.
44. Hebb, J. K., C. R. Cohen, S. G. Astete, E. A. Bukusi, and P. A. Totten. 2004. Detection of novel organisms associated with salpingitis, by use of 16S rDNA polymerase chain reaction. *J. Infect. Dis.* 190:2109–2120.
45. Horner, P.J., C.B. Gilroy, B.J. Thomas, R.O. Naidoo, and D. Taylor-Robinson. 1993. Association of *Mycoplasma genitalium* with acute non-gonococcal urethritis. *Lancet* 342:582-585.
46. Horner, P.J., B. Thomas, C.B. Gilroy, M. Egger, and D. Taylor-Robinson. 2002. Do all men attending departments of genitourinary medicine need to be screened for non-gonococcal urethritis? *Int. J. STD AIDS* 13: 667-673.

47. Horner, P., et al. 2003. Antibodies to Chlamydia trachomatis heat-shock protein 60 kDa and detection of *Mycoplasma genitalium* and *Ureaplasma urealyticum* are associated independently with chronic nongonococcal urethritis. *Sex. Transm. Dis.* 30: 129-133.
48. Huard, R., C., Luiz Claudio de Oliveira Lazzrini, Butler, W., R., Dick van Soolingen, Ho, J., L., PCR-Based Method To Differentiate the Subspecies of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex on the Basis of Genomic Deletions, *J Clin Microbiol.* 2003 April; 41(4): 1637–1650.
49. Imudia, A. N., Detti, L., Puscheck, E. E., Yelian, F D., Diamond, M P., The prevalence of *ureaplasma urealyticum*, *mycoplasma hominis*, *chlamydia trachomatis* and *neisseria gonorrhoeae* infections, and the rubella status of patients undergoing an initial infertility evaluation, 2008, *J. Assist. Reprod. Genet.* 25(1): 43-46.
50. Ito, S., Kikuchi, M., Seike, K., Tsuchiya, T., Yasuda, M., Yokoi, S., Nakano, M., Deguchi, T., Prevalence of genital mycoplasmas in asymptomatic male partners of women diagnosed as having Chlamydia infections, *J. Infect. Chemother.*, 2013 Dec 11.
51. Iwasaka, T., Wada, T., Kidera, Y., Sugimori, H., Hormonal status and mycoplasma colonization in the female genital tract, 1986, 68(2): 263-266.
52. Jensen, J., Uidum, S.A., Sondergard-Andersen, J., Vuust, J., Lind, K.,: Polymerase chain reaction for the detection of *Mycoplasma genitalium* in clinical samples. *J Clin Microbiol* 1991, 29:46-50.
53. Jensen, J.S., R. Orsum, B. Dohn, S. Uldum, A.M. Worm, and K Lind. 1993. *Mycoplasma genitalium*: a cause of male urethritis? *Genitourin. Med.* 69:265-269.
54. Jensen, J.S., H.T. Hansen, and K. Lind. 1996. Isolation of *Mycoplasma genitalium* strains from the male urethra. *J. Clin. Microbiol.* 34: 286-291.
55. Joshi NJ, Miller D. Doxycycline revisited. *Arch Intern Med* 157: 1421–1428, 1997.
56. Kainz P. The PCR plateau phase - towards an understanding of its limitations. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1494: 23-27.
57. Karabay, O., Topcuoglu, A., Kocoglu, E., Gurel, S., Gurel, H., Ince, N. K., Prevalence and antibiotic susceptibility of genital *Mycoplasma*

- hominis and *Ureaplasma Urealyticum* in a university hospital in Turkey. 2006, 33(1): 36-38.
58. Karanikolas I., Baka S., Demeridou S., Kaparos G., Salomidou P., Genimata V., Arsenis G., Kouskouni E., Symptomatic women with non-gonococcal, non-chlamydial cervicitis show a high incidence of *Mycoplasma genitalium* in Greece, 2009, available in internet: <http://www.blackwellpublishing.com/eccmid19/abstract.asp?id=74296>
59. Kechagia, N., Bersimis, S., Chatzipanagiotou, S., Incidence and antimicrobial susceptibilities of genital mycoplasmas in outpatients women with clinical vaginitis in Athens, Greece. 2008, J. antimicrob. Chemother. 62(1): 122-125.
60. Kenny, G. E., and F. D. Cartwright. 1993. Effect of pH, inoculum size and incubation time on the susceptibility of *Ureaplasma urealyticum* to erythromycin in vitro. Clin. Infect. Dis. 17(Suppl. 1):S215–S218.
61. Kenny, G.E., and Cartwright F.D., Susceptibilities of *Mycoplasma hominis*, *M. pneumoniae*, and *Ureaplasma urealyticum* to GAR-936, Dalfopristin, Dirithromycin, Evernimicin, Gatifloxacin, Linezolid, Moxifloxacin, Quinupristin- Dalfopristin, and Telithromycin Compared to Their Susceptibilities to Reference Macrolides, Tetracyclines, and Quinolones, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2001, p: 2604-2608.
62. Kotrotsiou, Tz., Exindari, M., *Ureaplasma Urealyticum*: so common but so disregarded microorganism, J. Hellenic microbiol. Society, vol.55, 4: 295-303.
63. Kotrotsiou, Tz., Exindari, M., Diza, E., Gioula, G., Melidou, A., Kaplanis, K., Malisiovas, N., Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Ureaplasma urealyticum* in asymptomatic women in Northern Greece, 2013, Hippokratia, 17, 4: 319-321.
64. Kong F, James G, Ma Z, Gordon S, Bin W, Gilbert GL: Phylogenetic analysis of *Ureaplasma urealyticum*—support for the establishment of a new species, *Ureaplasma parvum*. Int J Syst Bacteriol 1999, 49(Pt 4):1879–1889.

65. Kong F, Ma Z, James G, Gordon S, Gilbert GL: Species identification and subtyping of *Ureaplasma parvum* and *Ureaplasma urealyticum* using PCR-based assays. *J Clin Microbiol* 2000, 38(3):1175–1179.
66. Kong F, Ma Z, James G, Gordon S, Gilbert GL: Molecular genotyping of human *Ureaplasma* species based on multiple-banded antigen (MBA) gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol* 2000, 50(Pt 5):1921–1929.
67. Ladefoged, S A and G Christiansen. Physical and genetic mapping of the genomes of five *Mycoplasma hominis* strains by pulsed-field gel electrophoresis. *J. Bacteriol.* 1992, 174(7): 2199.
68. Ladefoged, S. A., Birkelund, S., Hauge, S., Brock, B., Jensen, L. T. & Christiansen, G. (1995). A 135-kilodalton surface antigen of *Mycoplasma hominis* PG21 contains multiple directed repeated sequences. *Infect Immun* 63,212-223.
69. Ladefoged, S.A. Jensen, L.T., Brock, B., Bikerlund, S. & Christiansen, G. 1996. Analysis of 05-kilobase-pair repeats in the *Mycoplasma hominis* Imp gene system and identification of gene products. *J. Bacteriol.* 178: 2775-2784.
70. Lamont R.F., Taylor-Robinson D., Wigglesworth J.S., Furr P.M., Evans R.T., Elder M.G.: The role of mycoplasmas, ureaplasmas and chlamydiae in the genital tract of women presenting in spontaneous early preterm labour. *J. Med. Microbiol.* 1987, 24:253-257.
71. Levy, S. B., and B. Marshall. 2004. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat. Med.* 10:S122-S129.
72. Lukic, A., Canzio, C., Patella, A., Giovagnoli, Mr., Cipriani, P., Frega, A., Moscarini, M., Determination of Cervicovaginal Microorganisms in Women with Abnormal Cervical Cytology: The Role of *Ureaplasma urealyticum*, 2006, *Anticancer Research*, 26: 4843-4850.
73. Lusk, M. J., et al. 2011. *Mycoplasma genitalium* is associated with cervicitis and HIV infection in an urban Australian STI clinic population. *Sex. Transm. Infect.* 87:107–109.
74. Mackay IM. Real-Time PCR in the microbiology laboratory. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10: 190-212.

75. Maeda, S., M. Tamaki, M. Nakano, M. Uno, T. Deguchi, and Y. Kawada. 1998. Detection of *Mycoplasma genitalium* in patients with urethritis. *J. Urol.* 159:405-407.
76. Maniloff, J., and H. J. Morowitz. 1972. Cell biology of the mycoplasmas, *Bacteriol. Rev.*, 36:263-290.
77. Mardh P A, Westrom L. Tubal and cervical cultures in acute salpingitis with special reference to *Mycoplasma hominis* and T -strain mycoplasmas. *Br J Vener Dis* 1970;46:179-86.
78. McCormack W and Rein M.F. Urethritis. In *Principles and Practice of Infectious Diseases*. Mandell, G. L., Bennet, G E., Dolin, R., Churchill Livindstone, New York, 2000: 1208-1217.
79. Mernaugh, G.R., S.F Dallo, S.C. Holt, and J.B. Baseman. 1993. Properties of adhering and nonadhering populations of *Mycoplasma genitalium*. *Clin.Infect.Dis.* 17: S69-S78.
80. Miller BR, Taylor-Robinson D, Furr PM, Toft B, Allen J. Serological evidence that chlamydiae and mycoplasmas are involved in infertility of women. *J Reprod Fertil* 1985. 73:237-40.
81. Moller BR, Taylor-Robinson D, Furr PM., 1984, Serological evidence implicating *Mycoplasma genitalium* in pelvic inflammatory disease. *Lancet* 1: 1102–1103.
82. Morowitz, H. J., and D. C. Wallace. 1973. Genome size and life cycle of thw mycoplasma. *Ann N.Y. Acad. Sci.* 225:62-73.
83. Morrison-Plummer, J., et al. 1987. Molecular characterization of *Mycoplasma genitalium* species-specific and cross-reactive determinants: identification of an immunodominant protein of *M.genitalium*. *Isr.J.Med.Sci.* 23: 453-457.
84. Mullis, K. B., and F. A. Faloona. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 55:335–350.
85. Mullis K.B. 1990. The unusual origin of polymerase chain reaction. *Sci. Am.* 262: 56-65.
86. Munday, P., Furr, P., Taylor-Robinson, D., The prevalence of *Ureaplasma urealiticum* and *Mycoplasma hominis* in the cervix and anal canal of women. *J.Infect.* 1981. 253-257.

87. Musatovova, O., S. Dhandayuthapani, and J.B. Baseman. 2003. Transcriptional starts for cytoadherence-related operons of *Mycoplasma genitalium*. *FEMS Microbiol. Lett.* 229: 73-81.
88. Naessens A., Foulon W., Cammu H., Goossens A., Lauwers S.: Epidemiology and pathogenesis of *Ureaplasma urealyticum* in spontaneous abortion and early preterm labor. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 1987, 66:513-516.
89. Nyvold, C., Birkelund, S. & Christiansen, G. (1997). The *Mycoplasma hominis* P120 membrane protein contains a 216 amino acid hypervariable domain that is recognized by the human immune response. *Microbiology* 143, 675-688.
90. Palmer, H.M., C.B. Gilroy, P.M. Furr, and D. Taylor-Robinson. 1991. Development and evaluation of the polymerase chain reaction to detect *Mycoplasma genitalium*. *FEMS Microbiol. Lett.* 61:199-203.
91. Park, H.R., Kim, Y.H., Lee, H.J., Oh, J.S., Kim, H.J., Usefulness of the Mycofast Test (MYCOFAST Evolution 2) for the Diagnosis of Nongonococcal Genitourinary Infections. 2006, *Korean J. Urol.* 47(10):1117-1123.
92. Pascual, A., Jatou, K., Ninet, B., Bille, J., Greub, G., New Diagnostic Real-Time PCR for Specific Detection of *Mycoplasma hominis* DNA, 2010, *Int. J. Microbiol.* 2010: 317512.
93. Pereyre, S. P. Gonzalez, B. de Barbeyrac, A. Darnige, H. Renaudin, A., Charron, S. Raherison, C. Bebear, and C. M. Bebear, Mutations in 23S rRNA Account for Intrinsic Resistance to Macrolides in *Mycoplasma hominis* and *Mycoplasma fermentans* and for Acquired Resistance to Macrolides in *M. hominis*, *Antimicrob. Ag. And Chemoth.*, Oct. 2002, p.3142-3150.
94. Peterson, S.N., Hu, P.C., Bott, K.F., Hutchison, C.A., 3rd, 1993. A survey of the *Mycoplasma genitalium* genome by using random sequencing. *J Bacteriol.* 175: 7918-7930.
95. Pfaffl, M.W., Horgan G.W. and Dempfle, L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 2002; 30: 1-10.

96. Pfaffl MW. Chapter 3: Quantification strategies in real-time PCR. In: Bustin SA (ed) A-Z of quantitative PCR. International University Line (IUL), La Jolla, CA, USA, 2004: 89-113.
97. Pich, O., R. Burgos, M. Ferrer-Navarro, E. Querol, and J. Pinol. 2008. Role of *Mycoplasma genitalium* MG218 and MG317 cytoskeletal proteins in terminal organelle organization, gliding motility and cytoadherence. *Microbiology*, 154: 3188-3198.
98. Pickering, W. J., Birch, D F., Kincaid-Smith, P. Biochemical and histologic findings in experimental pyelonephritis due to *Ureaplasma urealyticum*. *Infect. Immun.* 1990, 58(10): 3401-3406.
99. Ramirez, C., Casanova, G., Menoca, G., Ortiz, F., Ahued, R., Prevalencia de la infeccion cervico-vaginal por *Mycoplasma hominis* y *Ureaplasma urealyticum* en pacientes ginecologicas del Instituto Nacional de Perinatologia. 2004, *Enf. Inf. Microbiol.*, 24(1): 107-111.
100. Razin, S. 1978. The Mycoplasmas. *Microbiological Reviews*, 42:414-470.
100. Razin, S., Yogen, D., Naot, Y., Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1998, p:1094-1156.
101. Rivera, J. A., Cedillo, M. L., Vega, M., Micoplasmas y su importancia medica. 2001, *Rev. Biomed*, 12(4):262-271.
102. Rivera, J. A., Centeno, M., Santellan, O. M., Rodriguez, N. M., Prevalencia de *Ureaplasma urealyticum* en mujeres. 2004, *Rev. Mex. Pato. Clin.*, 51(1): 33-36.
103. Roberts, M. C., and G. E. Kenny. 1986. Dissemination of the tetM tetracycline resistance determinant to *Ureaplasma urealyticum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 29:350–352.
104. Robertson JA, Stemke GW: Expanded serotyping scheme for *Ureaplasma urealyticum* strains isolated from humans. *J Clin Microbiol* 1982, 15(5):873–878.
105. Rosenstein IJ, Morgan DJ, Sheehan M, Lamont RF, Taylor-Robinson D. Bacterial vaginosis in pregnancy: distribution of bacterial species in different gram-stain categories of the vaginal flora. *J Med Microbiol* 1996, 45:120-126.

106. Saada, A. B., Y. Terespolski, A. Adoni, and I. Kahane. 1991. Adherence of *Ureaplasma urealyticum* to human erythrocytes. *Infect. Immun.* 59:467–469.
107. Saiki, R. K., S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich, and N. Arnheim. 1985. Enzymatic amplification of b-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230:1350–1354.
108. Shepard MC: The recovery of pleuropneumonia-like organisms from Negro men with and without nongonococcal urethritis. *Am J Syphonor Vener Dis*, 1954, 38:113-124.
109. Shepard MC, Lunceford CD, Ford DK, Purcell RH, Taylor-Robinson D, Razin S, Black FT: *Ureaplasma urealyticum* gen. nov. sp. nov.: proposed nomenclature for the human T 7 (T-strain) mycoplasmas. *Int J Syst Bacteriol*, 1974, 24:160–171.
110. Shepard MC, Lunceford CD, Differential agar medium (A7) for identification of *Ureaplasma Urealyticum* (Human T Mycoplasmas) in primary cultures of clinical material. *J. Clin. Microbiol.* 1976. 3: 613-625.
111. Silbergeld, E. K., J. Graham, and L. B. Price. 2008. Industrial food animal production, antimicrobial resistance, and human health. *Annu. Rev. Public Health* 29:151-169.
112. Simms I, Eastick K, Mallinson H, Thomas K, Gokhale R, et al. (2003). Associations between *Mycoplasma genitalium*, *Chlamydia trachomatis* and pelvic inflammatory disease. *J Clin Pathol* 56: 616–618.
113. Smith, D. G., W. C. Russell, and D. Thirkell. 1994. Adherence of *Ureaplasma urealyticum* to human epithelial cells. *Microbiology* 140:2893–2898.
114. Speer, B. S., Shoemaker, N. B., Salyers, A. A., 1992. Bacterial resistance to tetracycline: mechanisms, transfer, and clinical significance. *Clin. Microbiol. Rev.* 5: 387-399.
115. Svenstrup, H.F., P.K. Nielsen, M. Drasbek, S. Birkelund, and G. Christiansen. 2002. Adhesion and inhibition assay of *Mycoplasma genitalium* and *Mpneumoniae* by immunofluorescence microscopy. *J. Med. Microbiol.* 51: 361-373.

116. Svenstrup, H. F., J. Fedder, J. Abraham-Peskir, S. Birkelund, and G. Christiansen. 2003. *Mycoplasma genitalium* attaches to human spermatozoa. *Hum. Reprod.* 18:2103–2109. Svenstrup, H.F., J.S. Jensen, K. Gevaert, S. Birkelund, and G. Christiansen. 2006. Identification and characterization of immunogenic proteins of *Mycoplasma genitalium*. *Clin.Vaccine Immunol.* 13: 913-922.
117. Svenstrup HF, Fedder J, Kristoffersen SE, Trolle B, Birkelund S, et al. (2008). *Mycoplasma genitalium*, *Chlamydia trachomatis*, and tubal factor infertility—a prospective study. *Fertil Steril* 90: 513–520.
118. Takahashi, S., Takeyama, K., Miyamoto, S., Ichihara, K., Maeda, T., Kunishima, Y. et al., Detection of *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* and *Ureaplasma parvum* DNAs in urine from asymptomatic healthy young Japanese men. *J. Infect. Chemother.* 2006, 12(5): 269-271.
119. Taylor-Robinson, D., McCormack, W.M., The genital mycoplasmas. *N Engl Med* 1980, 302:1003-1010.
120. Taylor-Robinson, D., et al. 1981. Urogenital mycoplasma infections of man: a review with observations on a recently discovered mycoplasma. *Isr.J. Med. Sci.* 17: 524-530.
121. Taylor-Robinson D, Furr PM: Update on sexually transmitted mycoplasmas. *Lancet* 1998, 351(Suppl 3):12-15.
122. Taylor-Robinson, D., and Jensen, J.S., *Mycoplasma genitalium*: from Chrysalis to Multicolored Butterfly, 2011. *Clinic.Microb. Rev.* p: 498-514.
123. Taylor-Robinson, D., Jensen, J. S., Svenstrup, H., Stacey, C. M., Difficulties experienced in defining the microbial cause of pelvic inflammatory disease. 2012, *Int. J. STD AIDS*, 23(1): 18-24.
124. Teng K, Li M, Yu W, Li H, Shen D, Liu D: Comparison of PCR with culture for detection of *Ureaplasma urealyticum* in clinical samples from patients with urogenital infections. *J Clin Microbiol* 1994, 32(9):2232–2234.
125. Thomsen AC. Mycoplasmas in human pyelonephritis: demonstration of antibodies in serum and urine. *J Clin Microbiol.*,1978, 8:197-202.
126. Totten, P.A., M.A. Schwartz, K.E. Sjostrom, G.E. Kenny, H.H.Handsfield, J.B. Weiss, and W.L. Whittington. 2001. Association of

- Mycoplasma genitalium* with nongonococcal urethritis in heterosexual men. *J. Infect. Dis.* 183:269-276.
127. Tully, J.G., Taylor-Robinson, D., Cole, R.M., Rose, D.L.,: A newly discovered mycoplasma in the human urogenital tract. *Lancet* 1981:1288-1291.
128. Tully, J.G., Taylor-Robins, D., Rose, L., Cole, R.M., Boye, J.M., *Mycoplasma genitalium*, a new species from the human urogenital tract. *Int Syst Bacteriol* 1983, 33:387-396.
129. Tully, J.G., D. Taylor-Robinson, D.L. Rose, P.M. Furr, C.E. Graham, and M.F. Barile. 1986. Urogenital challenge of primate species with *Mycoplasma genitalium* and characteristics of infection induced in chimpanzees. *J. Infect. Dis.* 153: 1046-1054.
130. Uno, M., et al. 1997. *Mycoplasma genitalium* in the cervixes of Japanese women. *Sex. Transm. Dis.* 24:284–286.
131. Waites, K. B., Rikihisu, Y., Tylor-Robinson, D. J., *Mycoplasmas and obligate intracellular bacteria*, Murray P R., Jo Baron, E., Jorgensen, J H., Phaller, M. A., Yolken, R. H., *Manual of Clinical Microbiology*, 8th Edition, vol. 1, ASM Press Washington DC, 2003, 972-990.
132. Waites, K. B., Katz, B., Schelonka, R. L., *Mycoplasmas and Ureaplasmas as Neonatal Pathogens*, *Clin. Microb. Rev.* 2005, p. 757–789.
133. Wasinger, V.C., S.J. Cordwell, A. Cerpa-Poljak, J.X. Yan, A.A. Gooley, M.R. Wilkins, M.W. Duncan, R. Harris, K.L. Williams, and I. Humphery-Smith. 1995. Progress with gene-product mapping of the mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis.* 16: 1090-1094.
134. Wilhelm J. and Pingoud A. Real-Time polymerase chain reaction. *Chem BioChem* 2003; 4: 1120-1128.
135. Xiao L, Glass JI, Paralanov V, Yooseph S, Cassell GH, Duffy LB, Waites KB, Detection and characterization of human *Ureaplasma* species and serovars by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2010, 48(8):2715–2723.
136. Yoon B.H., Romero R., Park J.S., Chang J.W., Kim Y.A., Kim J.C., Kim K.S.: Microbial invasion of the amniotic cavity with *Ureaplasma urealyticum* is associated with a robust host response in fetal, amniotic,

- and maternal compartments. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1998, 179:1254-1260.
137. Yoshida, T., Maeda, S., Deguchi, T., Ishiko, H., Phylogeny-based rapid identification of *Mycoplasma* and *Ureaplasma* from urethritis patients. *J. Clin. Microb.* 2002, p.105-110.
138. Yoshida, T., Maeda, S., Deguchi, T., Miyazawa, T., Ishiko, H., Rapid detection of *Mycoplasma genitalium*, by PCR-microtiter plate hybridization assay. *J Clin Microbiol* 2003, 41:1850-5. 40:105–10.
139. Zhang, Q. & Wise, K. 5. (1996). Molecular basis of size and antigenic variation of a *Mycoplasma hominis* adhesin encoded by divergent *vaa* genes. *Infect Immun* 64, 2737-2744.
140. Zheng X, Teng LJ, Watson HL, Glass JI, Blanchard A, Cassell GH: Small repeating units within the *Ureaplasma urealyticum* MB antigen gene encode serovar specificity and are associated with antigen size variation. *Infect Immun* 1995, 63(3):891–898.
141. Zuo, C. X., Huang, J. H., Chen, J., Lu, J. Y., Xiang, Y. P., Female urogenital *Mycoplasma* infection nad drug sensitivity statuw in Changsha. 2006, *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 26(6): 831-836.

Ελληνική βιβλιογραφία

1. Αρσένη, Α., Κλινική μικροβιολογία και εργαστηριακή διάγνωση λοιμώξεων, 1994, τόμος 2, 4^η έκδοση, εκδόσεις ΖΗΤΑ.
2. Φωκάς, Σπ., Φωκάς, Στ., Μαρκάτου, Φ., Κλινική Μικροβιολογία, Τόμος 1, Αθήνα 2003.