



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ κ. Α. Ν. ΜΑΝΙΑΤΗΣ**

**ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΗ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΟΧΗΣ
ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ
ΣΤΑ ΣΤΕΛΕΧΗ *Neisseria gonorrhoeae* ΠΟΥ ΑΠΟΜΟΝΩΝΟΝΤΑΙ ΣΤΗΝ
ΕΛΛΑΔΑ.**

**ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΟΣ ΚΑΙ ΓΟΝΟΤΥΠΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ
ΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ
ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΑΝΤΟΧΗΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΣΤΑΘΗ ΜΑΡΙΑ

Βιολόγος

ΛΑΡΙΣΑ 2008

*Αφιερώνω την προσπάθεια αυτή
στους αγαπημένους μου γονείς Νάσο και Ισμήνη*

και στην φίλη Εύα...

Η ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

**ΑΝΤΩΝΙΟΣ ΜΑΝΙΑΤΗΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ Π.Θ.
ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΓΟΥΡΓΟΥΛΙΑΝΗΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ Π.Θ.
ΑΓΓΕΛΙΚΗ ΡΟΥΣΣΑΚΗ-ΣΟΥΛΤΣΕ, ΑΝ. ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ Π.Θ.**

Η ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

**ΑΝΤΩΝΙΟΣ ΜΑΝΙΑΤΗΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ Π.Θ.
ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΓΟΥΡΓΟΥΛΙΑΝΗΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ Π.Θ.
ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΚΟΥΚΟΥΛΗΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ Π.Θ.
ΑΓΓΕΛΙΚΗ ΡΟΥΣΣΑΚΗ-ΣΟΥΛΤΣΕ, ΑΝ. ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ Π.Θ.
ΣΠΥΡΙΔΩΝ ΠΟΥΡΝΑΡΑΣ, ΕΠΙΚ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Π.Θ.
ΧΡΗΣΤΟΣ ΧΑΤΖΗΧΡΙΣΤΟΔΟΥΛΟΥ, ΕΠΙΚ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Π.Θ.
ΕΥΑ ΤΖΕΛΕΠΗ, ΕΡΕΥΝΗΤΡΙΑ Α΄ Ε.Ι.Π.**

*Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα (Ν.5343/32 άρθρο 202 παράγραφος 7)*

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε κατά την χρονική περίοδο 2001-2005 στο Εργαστήριο Βακτηριολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ, υπό την αιγίδα του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας με επιβλέποντα τον Καθηγητή Μικροβιολογίας κ. Αντώνη Μανιάτη.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή κ. Αντώνη Μανιάτη για την ανάθεση και παρακολούθηση του θέματος της διατριβής, τα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, καθ. κ. Αγγελική Ρουσάκη και καθ. κ. Κωνσταντίνο Γουργουλιάνη, για την καθοδήγησή τους, καθώς και τα υπόλοιπα μέλη της εξεταστικής επιτροπής.

Στη διάρκεια της εργασίας αυτής ήμουν εξαιρετικά τυχερή να λάβω βοήθεια και να υποστηριχτώ από την υπεύθυνο του Εργαστηρίου Βακτηριολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ Δρ. Εύα Τζελέπη. Το αδιάλειπτο ενδιαφέρον, η δική της προσωπική συμμετοχή στην προσπάθεια, η ενθάρρυνση, συμπαράσταση και η κρίση αποτέλεσαν κίνητρο και ανταμοιβή μου στην εργασία αυτή. Η Δρ Τζελέπη είναι αυστηρή συνεργάτης αλλά ακούραστη, δίκαιη και άριστη δασκάλα. Την ευχαριστώ από καρδιάς.

Ευχαριστώ θερμά την ερευνήτρια Δρ. Βιβή Μυριαγκού, τον επίκουρο καθηγητή Μικροβιολογίας κ. Λεωνίδα Τζουβελέκη, καθώς και τον δερματολόγο-αφροδισιολόγο Δρ. Κυριάκο Κυριάκη, για τις πολύτιμες συμβουλές, τις εύστοχες παρατηρήσεις και όλο το ενδιαφέρον που μου έδειξαν κατά την εκπόνηση της διατριβής.

Ακόμα, όλους τους συναδέλφους, διδάκτορες και υποψήφιους διδάκτορες, ευχαριστώ για την άψογη συνεργασία και, πάνω απ' όλα, για τη φιλία και τις όμορφες στιγμές που περάσαμε δουλεύοντας μαζί στο εργαστήριο.

Τέλος, από το περιβάλλον του Τζανείου Νοσοκομείου Πειραιά, όπου εργάζομαι και εργαζόμουν παράλληλα με την εκπόνηση της διατριβής, αισθάνομαι ότι οφείλω να ευχαριστήσω τις ιατρούς Δρ. Δήμητρα Γιαννέλη και Δρ. Γεωργία Παναγιωτίδου, που με ενθάρρυναν και με κάθε τρόπο με υποστήριζαν να την πραγματοποιήσω.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	σελ.
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
I. ΓΕΝΙΚΑ ΓΙΑ ΤΟΝ ΓΟΝΟΚΟΚΚΟ	8
Ιστορική Αναδρομή.....	8
Ταξινόμηση.....	10
Μορφολογία.....	10
II. ΔΟΜΗ ΕΞΩΤΕΡΙΚΗΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΟΚΟΚΚΟΥ	11
Ινίδια.....	13
Πρωτεΐνη Por I (PI).....	14
Πρωτεΐνη Ora (PII).....	15
Πρωτεΐνη Rmp (PIII).....	15
Πρωτεΐνες H8.....	16
Πρωτεΐνες που καταστέλλονται από σίδηρο ή οξυγόνο.....	16
Πρωτεάσες IgA ₁	17
Λιποολιγοσακχαρίτης (LOS).....	18
III. ΓΟΝΟΚΟΚΚΙΚΕΣ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ	19
Πρωτοπαθείς Λοιμώξεις.....	19
Τοπικές και Συστημικές Επιπλοκές Γονοκοκκικών Λοιμώξεων.....	21
Παθογενετικός Μηχανισμός της Γονόρροιας.....	23
IV. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΓΟΝΟΡΡΟΙΑΣ	24
ΑΜΕΣΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ.....	24
Μικροσκοπική εξέταση.....	24
Καλλιέργεια.....	25
ΟΡΟΛΟΓΙΚΕΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ.....	27
Αναζήτηση αντιγόνων.....	27
Αναζήτηση αντισωμάτων.....	28
Αναζήτηση νουκλεϊνικών οξέων.....	28

Περιεχόμενα

	σελ.
V. ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ ΓΟΝΟΚΟΚΚΟΥ	29
ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ	29
Οροτυπία.....	29
Αυξοτυπία.....	31
ΓΟΝΟΤΥΠΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ	32
Ανάλυση πλασμιδιακού περιεχομένου.....	32
Ανάλυση πολυμορφισμού περιοριστικών θραυσμάτων (RFLP).....	32
Ανάλυση γενωμικού DNA με ηλεκτροφόρηση σε παλλόμενο πεδίο (PFGE).....	33
VI. ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΗΣ ΓΟΝΟΡΡΟΙΑΣ	34
VII. ΑΝΤΟΧΗ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ	37
ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΗ ΑΝΤΟΧΗ	39
ΑΝΤΟΧΗ ΟΦΕΙΛΟΜΕΝΗ ΣΕ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΙΚΑ ΓΟΝΙΔΙΑ	42
ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ	43
Αντοχή στις Πενικιλίνες.....	43
Αντοχή στις Τετρακυκλίνες.....	45
Αντοχή στις Νεότερες Κινολόνες.....	45
Αντοχή στη Σπεκτινομυκίνη.....	49
Αντοχή στις Μακρολίδες.....	49
Μειωμένη Ευαισθησία στις Κεφαλοσπορίνες.....	50
Πολλαπλή Διασταυρούμενη Αντοχή.....	51
VIII. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΓΟΝΟΡΡΟΙΑΣ	52
Επιδημιολογική παρακολούθηση της αντοχής στη <i>N. gonorrhoeae</i>	52
Παγκόσμια Επίπτωση και Γεωγραφική Κατανομή της Γονόρροιας.....	53
Σεξουαλική Συμπεριφορά και Μεταδοτικότητα της Γονόρροιας.....	56
Πληθυσμιακές Ομάδες Υψηλού Κινδύνου.....	56

Περιεχόμενα

	σελ.
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ.....	59
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	61
Βιολογικό Υλικό.....	61
Συλλογή Επιδημιολογικών Δεδομένων.....	62
Ταυτοποίηση Στελεχών Γονοκόκκου.....	62
Καλλιέργεια και Συντήρηση Στελεχών Γονοκόκκου.....	64
Ανίχνευση Πενικιλινασοπαραγωγών Στελεχών (Δοκιμασία νιτροσεφίνης).....	65
Προσδιορισμός Επιπέδων Ευαισθησίας Στα Αντιβιοτικά.....	65
Οροτυπία.....	67
Αυξοτυπία.....	68
Ανάλυση Πλασμιδιακού Περιεχομένου.....	77
Ανάλυση Γενωμικού DNA σε Ηλεκτροφόρηση Παλλόμενου Πεδίου.....	79
Μικρής Κλίμακας Απομόνωση Γενωμικού DNA (Miniprep).....	83
Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR).....	84
<i>Ανίχνευση και πολλαπλασιασμός tetM γονιδίου</i>	85
<i>Ανίχνευση και πολλαπλασιασμός τμημάτων των γονιδίων gyrA και parC</i>	86
Χαρακτηρισμός <i>tetM</i> γονιδίου με RFLP.....	86
Ανίχνευση και χαρακτηρισμός γονιδίων <i>gyrA</i> και <i>parC</i>	87
Στατιστική Ανάλυση.....	87
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	
ΠΛΗΘΥΣΜΙΑΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ ΓΟΝΟΡΡΟΙΑΣ.....	88
1. Επίπτωση Γονόρροιας.....	88
2. Σύνθεση νοσήσαντος πληθυσμού.....	90
ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ	
1. Ευαισθησία Στελεχών Γονοκόκκου στα Αντιβιοτικά.....	93
2. Χαρακτηρισμός πλασμιδιακής αντοχής.....	100
<i>Τύποι πλασμιδίων αντοχής στην πενικιλίνη</i>	100
<i>Τύποι πλασμιδίων αντοχής στην τετρακυκλίνη – Χαρακτηρισμός tetM γονιδίων...</i>	101

Περιεχόμενα

	σελ.
3. Χαρακτηρισμός Μηχανισμού Αντοχής στις Κινολόνες.....	103
4. Συμβατική Τυποποίηση Στελεχών Γονοκόκκου.....	110
<i>Αυξότυποι PPNG , TRNG και QRNG Στελεχών.....</i>	<i>110</i>
<i>Κατανομή Γονοκοκκικού πληθυσμού σε ορότυπους.....</i>	<i>111</i>
<i>Συσχέτιση αποτελεσμάτων συμβατικής τυποποίησης με φαινότυπους ευαισθησίας και επιδημιολογικά δεδομένα.....</i>	<i>115</i>
5. Μοριακή Τυποποίηση Επιλέκτων Στελεχών Γονοκόκκου με PFGE.....	121
<i>Παλσότυποι στελεχών με πλασμιδιακή αντοχή στην τετρακυκλίνη.....</i>	<i>122</i>
<i>Παλσότυποι PPNG στελεχών οροτύπου Boys.....</i>	<i>123</i>
<i>Παλσότυποι ευαίσθητων στελεχών οροτυπικού συμπλέγματος B[r][p]yust.....</i>	<i>125</i>
<i>Παλσότυποι πολυανθεκτικών στελεχών των οροτύπων B[r]opyst.....</i>	<i>125</i>
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	127
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	137
SUMMARY.....	139
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	141

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

I. ΓΕΝΙΚΑ ΓΙΑ ΤΟ ΓΟΝΟΚΟΚΚΟ

Η *Neisseria gonorrhoeae* ή γονόκοκκος είναι το αίτιο της γονόρροιας και είναι υπεύθυνη για κλινικές νοσολογικές καταστάσεις, όπως ουρηθρίτιδα, τραχηλίτιδα, σαλπινγίτιδα, βακτηριαίμια, αρθρίτιδα κ.ά. Εμφανίζει ομοιότητες με το δεύτερο παθογόνο είδος του γένους των ναισσεριών, τη Ναϊσέρια της μηνιγγίτιδας (*Neisseria meningitis*). Παρά τις ομοιότητές τους, τα δύο είδη έχουν αυστηρά διακριτή παθογόνο δράση. Η *N. gonorrhoeae* προσβάλλει το ουρογεννητικό σύστημα, ενώ η *N. meningitis* το ανώτερο αναπνευστικό και τις μήνιγγες.

ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

Η γονόρροια είναι μία από τις παλαιότερα γνωστές στην ανθρωπότητα νόσους. Περιγραφές των κλινικών της εκδηλώσεων υπάρχουν σε αρχαία κινεζικά, αραβικά, ελληνικά, ινδικά και ρωμαϊκά κείμενα. Για παράδειγμα, το 2600 π.Χ ο Κινέζος αυτοκράτορας Huang-Ty γράφει ένα ιατρικό δοκίμιο που περιλαμβάνει μια εξαιρετική περιγραφή της γονόρροιας.

Αναφορές για την ύπαρξη της γονόρροιας περιέχονται και στα κείμενα της Βίβλου. Το 1300 π.Χ., ο Μωυσής, συσχετίζοντας μία επιδημία –πιθανόν γονόρροιας– με τα «πορνεία των θυγατέρων του Μωάβ», έλυσε το πρόβλημα με αμείλικτο και δραστικό τρόπο: αποχή ή θάνατος. Με αυτό τον τρόπο απέτρεψε την εξάπλωση της γονόρροιας, καθώς και άλλων σεξουαλικά μεταδιδόμενων ασθενειών, στον εβραϊκό λαό. Επίσης οι Εβραίοι, λόγω της κλειστής κοινωνίας που είχαν, εντόπισαν εμπειρικά μερικές από τις αιτίες εμφάνισης των σεξουαλικά μεταδιδόμενων νόσων και για να τις αποτρέψουν καθιέρωσαν την περιτομή (Handsfield 1997).

Ο Ιπποκράτης ήταν ο πρώτος που περιέγραψε εκτενώς την γονόρροια. Ονόμασε την οξεία γονόρροια «στραγγουρία» και θεώρησε ότι ήταν αποτέλεσμα «των ηδονών της Αφροδίτης». Ο Γαληνός (130 μ.Χ), εκλαμβάνοντας εσφαλμένα το πυώδες έκκριμα που χαρακτηρίζει την γονοκοκκική ουρηθρίτιδα για σπέρμα, έδωσε στη νόσο την ονομασία «γονόρροια» από τις λέξεις «γόνος» και «ροή». Ο Ρωμαίος γιατρός Κέλσος, επίσης φαίνεται να γνώριζε καλά την γονόρροια και τα συμπτώματά της.

Η γνώση της γονόρροιας στην Ευρώπη ήταν ανεπαρκής κατά την περίοδο του Μεσαίωνα. Ο όρος «clap», που χρησιμοποιείται ακόμα και σήμερα στα αγγλικά ως

συνώνυμο της γονόρροιας, πρωτοεμφανίστηκε το 1378. Η ετυμολογία του όρου είναι ασαφής. Πιθανολογείται ότι σχετίζεται με την κακόφημη περιοχή Le Clapier του Παρισιού.

Μετά από την άφιξη της σύφιλης στην Ευρώπη, τον Μεσαίωνα, και μέχρι τα μέσα του 19^{ου} αιώνα επικρατούσε σύγχυση της γονόρροιας με την σύφιλη. Πολλοί επιστήμονες υποστήριζαν ότι η γονόρροια ήταν ενδιάμεσο στάδιο της σύφιλης (Sparling 1999). Οι μεγάλοι χειρουργοί Ambroise Pare (16^{ος} αιώνας) και John Hunter (18^{ος} αιώνας) θεωρούσαν τη σύφιλη και τη γονόρροια διαφορετικές εκδηλώσεις μιας ενιαίας νόσου. Τις απόψεις αυτές βάσιζαν στα αποτελέσματα ενός πειράματος του John Hunter, ο οποίος αυτοεμβολιάστηκε με ουρηθρικό έκκριμα ασθενούς με γονοκοκκική ουρηθρίτιδα. Ο ασθενής έτυχε να πάσχει και από μη διαγνωσμένη σύφιλη, με αποτέλεσμα ο διάσημος γιατρός να μολυνθεί και από τις δύο ασθένειες και να οδηγηθεί στο συμπέρασμα ότι είναι ταυτόσημες. Η διάκριση μεταξύ των δύο νόσων επιτεύχθηκε το 1838 από τον γιατρό Philippe Ricord, ο οποίος μελέτησε 2500 ασθενείς προκειμένου να αποδείξει ότι η σύφιλη και η γονόρροια είναι διαφορετικά νοσήματα (Handsfield 1997, Hook & Handsfield 1999). Η οριστική διάκριση της γονόρροιας επιτεύχθηκε εν τέλει με την αναγνώριση του παθογόνου της αιτίου από τον Albert Neisser το 1879. Ο Neisser προσδιόρισε και απεικόνισε τα τυπικά χαρακτηριστικά του βακτηρίου από εκκρίματα ασθενών με ουρηθρίτιδα και νεογνική οφθαλμία, χρησιμοποιώντας τις νέες, για την εποχή εκείνη, μικροσκοπικές μεθόδους. Το βακτήριο ονομάστηκε αρχικά από τον Neisser «μικρόκοκκος», ενώ η ονομασία γονόκοκκος πλάστηκε αργότερα από τον συνεργάτη του Neisser, τον Paul Ehrlich. Ο Neisser, που ονομάστηκε από τους φοιτητές του «πατέρας του γονόκοκκου», μελέτησε και περιέγραψε εκτενώς όλη την οικογένεια των Ναϊσσεριών. Το 1882, οι Leistikow και Loffler απομόνωσαν το γονόκοκκο σε καλλιέργεια. Η πρώτη αντιγονοκοκκική θεραπεία εφαρμόστηκε από τον C.S.F. Crede, ο οποίος εισήγαγε την ενστάλαξη νιτρικού αργύρου στα μάτια νεογέννητου με σκοπό να αποτρέψει την τύφλωση –πρακτική που χρησιμοποιείται ακόμα και σήμερα (Benedek 2005). Ο εικοστός αιώνας έφερε τη νέα, ασφαλή και ιδιαίτερα αποτελεσματική θεραπεία για την γονόρροια, τα αντιβιοτικά. Οι σουλφοναμίδες χρησιμοποιήθηκαν για πρώτη φορά το 1936, ενώ λίγο αργότερα, το 1943, η χρήση της πενικιλίνης, αφενός έλυσε το πρόβλημα και, αφετέρου, βοήθησε στη διάκριση της γονοκοκκικής από τη μη γονοκοκκική ουρηθρίτιδα, η οποία, σε αντί-

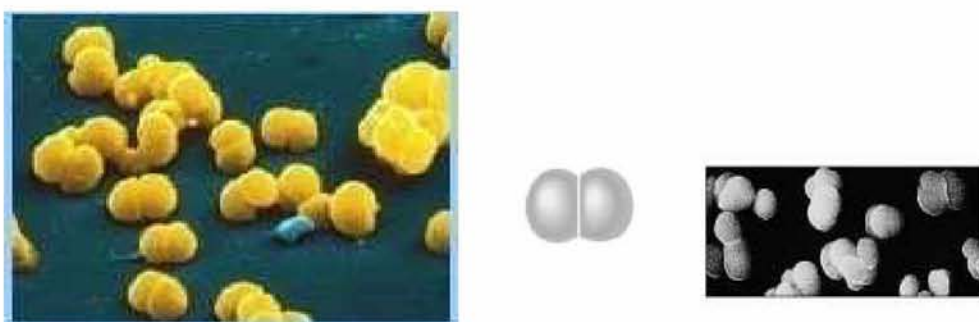
θεση με τη γονόρροια, δεν θεραπευόταν από το αντιβιοτικό. Η επόμενη μεγάλη εξέλιξη αυτού του αιώνα σε σχέση με την γονόρροια, αφορά την κατανόηση των παθογόνων μηχανισμών του γονόκοκκου. Το πρώτο βήμα προς την κατεύθυνση αυτή έγινε το 1963, με τις μελέτες του Kellogg που αποκάλυψαν διαστελεχικές διαφορές στη μολυσματικότητα των γονοκόκκων, ανάλογα με τη μορφολογία των αποικιών τους (Kellogg 1963).

ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

Το γένος *Neisseria* ανήκει στην οικογένεια *Neisseriaceae*. Σύμφωνα με πρόσφατη ταξινόμική κατάταξη, η οποία βασίστηκε σε μελέτες DNA-rRNA ομολογίας, η οικογένεια αυτή περιλαμβάνει τα γένη *Neisseria*, *Kingella*, *Eikenella*, *Simonsiella* και *Alysiella*, καθώς και μέλη των CDC ομάδων EF-4a, EF-4b και M-5. Στο γένος *Neisseria* περιλαμβάνονται 13 είδη, από τα οποία δύο, κυρίως, είναι παθογόνα: η *N. gonorrhoeae* και η *N. meningitidis* (Evangelista et al 1993).

ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ

Οι γονόκοκκοι είναι gram-αρνητικοί διπλόκοκκοι, με διάμετρο 0,8-1,0 μm περίπου. Είναι ακίνητοι και δεν παράγουν σπόρους. Μεμονωμένοι, οι κόκκοι έχουν νεφροειδές σχήμα με εφαπτόμενες τις επίπεδες ή κοίλες πλευρές τους (Εικόνα 1).



Εικόνα 1: Μορφολογία γονοκόκκων σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο

Ο Kellogg, το 1963, παρατήρησε ότι οι γονόκοκκοι παρουσιάζουν ποικιλία στην μορφολογία των αποικιών τους όταν αναπτύσσονται σε διαυγές άγαρ. Με μικροσκοπική παρατήρηση σε διερχόμενο φως διέκρινε τέσσερις τύπους. Οι αποικίες

τύπου 1 και 2 (T1 και T2 κατά Kellogg) είναι μικρές, κυρτές και γυαλιστερές και φέρουν ινίδια στην επιφάνειά τους (P^+). Οι αποικίες τύπου 3 και 4 (T3 και T4 κατά Kellogg) είναι μεγαλύτερες πιο επίπεδες και συνίσταται από πιο γηρασμένα κύτταρα που δεν φέρουν ινίδια (P^-) (Kellogg 1963). Οι νεαρότερες αποικίες είναι συνήθως P^+ , ενώ όταν ανακαλλιεργούνται χωρίς επιλογή μεταπίπτουν συνήθως σε P^- . Μερικές P^- αποικίες έχουν την ικανότητα να μεταστρέφονται στη συνέχεια και πάλι σε P^+ . Ο Kellogg απέδειξε επίσης ότι, μετά από 69 ανακαλλιέργειες, οι P^+ αποικίες τύπου 1 διατηρούσαν την μολυσματικότητά τους (virulence), ενώ οι P^- αποικίες τύπου 4 την έχαναν. Πρόσφατες μελέτες έχουν επιβεβαιώσει ότι οι P^- αποικίες έχουν μειωμένη ικανότητα να προκαλούν λοίμωξη (Cohen & Cannon 1999).

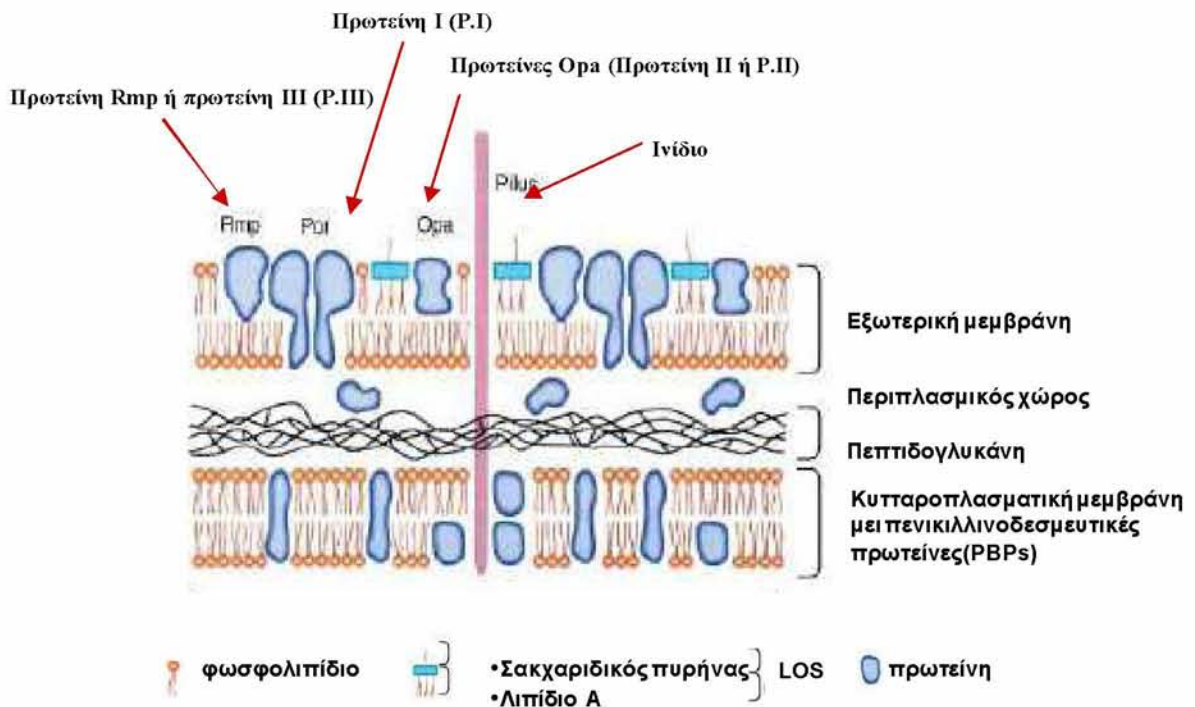
Ένας δεύτερος τύπος ποικιλομορφίας των αποικιών έχει σχέση με τον βαθμό διαφάνειάς τους (opacity), κατά την παρατήρησή τους σε μικροσκόπιο χαμηλής ισχύος σε διαυγή υλικά και με κατάλληλο φωτισμό (Swanson 1978). Οι αδιαφανείς (O από τη λέξη opaque) αποικίες είναι πιο σκούρες και κοκκιώδεις από τις διαφανείς (T, transparent). Οι διαφορές τους σχετίζονται με την παρουσία μιας οικογένειας πρωτεϊνών (PII ή πρωτεΐνες Ora) της εξωτερικής μεμβράνης του γονοκόκκου (Walstad 1977). Τα κύτταρα των αδιαφανών αποικιών εκφράζουν στην εξωτερική μεμβράνη τις πρωτεΐνες Ora. Οι αδιαφανείς αποικίες απομονώνονται κυρίως από άνδρες με γονοκοκκική ουρηθρίτιδα, αλλά και από τραχηλικά επιχρίσματα γυναικών, στη μέση του εμμηνορυσιακού κύκλου (Sparling 1967). Οι διαφανείς αποικίες, που είναι ανθεκτικότερες στο φυσιολογικό ορό, απομονώνονται συχνότερα από τον τράχηλο στο τέλος του εμμηνορυσιακού κύκλου, καθώς επίσης από αίμα, αρθρικό υγρό και σάλπιγγες (Hook & Holmes 1985).

II. ΔΟΜΗ ΕΞΩΤΕΡΙΚΗΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΟΚΟΚΚΟΥ

Η παρατήρηση γονοκόκκων σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο έδειξε ότι η εξωτερική τους μεμβράνη παρουσιάζει την τυπική δομή ενός gram αρνητικού βακτηρίου, που περιλαμβάνει ένα λεπτό στρώμα πεπτιδογλυκάνης και κυτταροπλασματική μεμβράνη. Σε αντίθεση με τους μηνιγγιτιδόκοκκους, οι οποίοι περιέχουν ένα πολυσακχαριδικό καψίδιο, σημαντικό για την μολυσματικότητά τους, οι γονοκόκκοι δεν διαθέτουν αντίστοιχο. Παρόλ' αυτά, διαθέτουν ένα επιφανειακό πολυφωσφορικό «ψευτοκαψίδιο», του οποίου ο ρόλος δεν είναι σαφής. Το στρώμα πεπτιδογλυκάνης των γονοκόκκων

Εισαγωγή

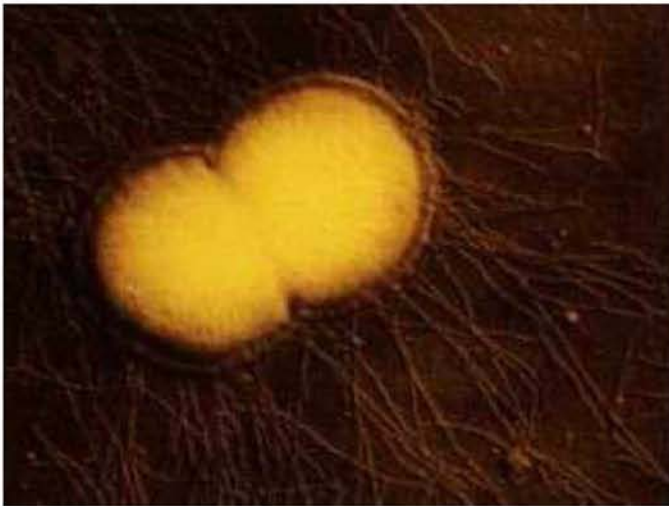
είναι παρόμοιο με το αντίστοιχο των άλλων gram αρνητικών βακτηρίων. Περιέχει ένα σκελετό μουραμινικού οξέος και N-ακετυλο-γλυκοζαμίνης, αλλά διαφέρει στο βαθμό της O-ακετυλίωσης. Η ιδιαιτερότητα αυτή μπορεί να σχετίζεται με την ευπάθεια των θραυσμάτων της γονοκοκκικής πεπτιδογλυκάνης σε βιοαποδόμηση, καθώς και με την φλεγμονώδη δράση της και άλλες βιολογικές ιδιότητες (Εικόνα 2) (Hook & Holmes 1985).



Εικόνα 2: Διαγραμματική αναπαράσταση του γονοκοκκικού κυτταρικού τοιχώματος (Hook & Holmes 1985)

ΙΝΙΔΙΑ

Τα πιο σημαντικά, από άποψη παθογένειας, συστατικά στοιχεία του γονόκοκκου είναι τα επιφανειακά μόρια που σχετίζονται με την προσκόλληση, προσβολή και βλάβη του κυττάρου του ξενιστή ή συνιστούν στόχους της ανοσολογικής άμυνας του ξενιστή. Τα ινίδια είναι τα επιφανειακά συστατικά που έχουν μελετηθεί εκτενέστερα. Κατά την παρατήρηση σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, τα ινίδια διατάσσονται σε μεμονωμένες λεπτές ίνες ή συσσωματώματα ινών (fibrillar aggregates) και καλύπτουν όλη την εξωτερική επιφάνεια του μικροοργανισμού (Εικόνα 3).



Εικόνα 3. Παρατήρηση ινιδίων γονοκόκκου σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο
(*textbookofbacteriology.net*)

Τα ινίδια είναι πιθανό ότι αποτελούν πολυμερή μιας υπομονάδας 18kDa (Buchanan 1975). Κρυσταλλογραφικές μελέτες έχουν αποκαλύψει αρκετά στοιχεία για τη δομή αυτής της υπομονάδας. Ολόκληρη η αμινοξική αλληλουχία πολλών ποικιλιών ινιδίων έχει καθοριστεί (Forest et al. 1996). Έχουν ένα κοινό αμινοτελικό άκρο και πολλές μεταβλητές περιοχές στο μέσο ή στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης. Το αμινοτελικό άκρο είναι σχεδόν όμοιο στο γονόκοκκο, στο μηνιγγιτιδόκοκκο και σε άλλους μικροοργανισμούς, όπως στο *Bacteroides nodocus*, *Moraxella bovis* και *Pseudomonas aeruginosa*.

Τα ινίδια παρουσιάζουν δύο τύπους ποικιλομορφίας: Αντιγονική ποικιλομορφία, στην οποία τα στελέχη αλλάζουν τον αντιγονικό τύπο των ινιδίων τους ($P^+_a \rightarrow P^+_b$) και ποικιλομορφία φάσης στην οποία τα στελέχη μεταπίπτουν από την Pil^+ φάση στην Pil^- φάση και αντίστροφα ($P^+ \leftrightarrow P^-$) (Swanson et al 1987).

ΠΡΩΤΕΪΝΗ Por I (P.I)

Η πρωτεΐνη I Por I (porin protein), πίο γνωστή ως πρωτεΐνη I (P.I), είναι η κυριότερη πρωτεΐνη της εξωτερικής μεμβράνης του γονοκοκκικού κυττάρου. Η P.I, η οποία συμμετέχει σε πολλές λειτουργίες του γονοκοκκικού κυττάρου, λειτουργεί κυρίως ως πορίνη και ποικίλει από στέλεχος σε στέλεχος ως προς την βασική δομή, την αντιγονικότητα, και το μοριακό της μέγεθος (34-36 kDa). Συνιστάμενη από μια απλή πολυπεπτιδική αλυσίδα, απαντά ως τριμερές κοντά στον λιπο-ολιγοσακχαριτη (LOS) και στην πρωτεΐνη Rmp (**R**eduction **m**odifiable **p**rotein), στοιχεία με τα οποία αλληλεπιδρά, σχηματίζοντας μαζί τους μεμβρανικά συμπλέγματα (Hitchcock 1984, Swanson 1982). Ο κύριος ρόλος της είναι ο σχηματισμός υδροφιλικών πόρων εγκάρσια της εξωτερικής μεμβράνης (OM). Λειτουργεί ως κανάλι εισόδου ανιόντων (anion-specific channel) διαμέσου της εξωτερικής μεμβράνης. Απαντά σε δύο τύπους, την PI-A ή Por A (34 kDa) και την PI-B ή Por B (35,5-36 kDa), οι οποίοι, αν και εμφανίζουν ομολογία 80%, διακρίνονται μεταξύ τους τόσο χημικά όσο και ανοσολογικά (Knapp et al. 1984). Η PI-B πρωτεΐνη είναι ευαίσθητη στην *in situ* λύση από εξωγενείς πρωτεάσες, όπως η τρυψίνη, η α-χυμοθρυψίνη και η πρωτεινάση K, καθώς και από ουδετερόφιλες πρωτεάσες, όπως η ελαστάση και η καθεψίνη G (Judd 1989). Η PI-B διαπερνά την εξωτερική κυτταρική μεμβράνη τουλάχιστον δύο φορές. Αντίθετα, η PI-A είναι ανθεκτική στην *in situ* πρωτεόλυση και διατάσσεται στην κυτταρική μεμβράνη κατά τέτοιο τρόπο, ώστε ένα μικρό τμήμα της (15-20 αμινοξέα) να είναι εκτεθειμένο στην επιφάνεια του βακτηρίου (Blake & Gotschlich 1982). Κάθε στέλεχος γονοκόκκου διαθέτει Por A ή Por B. Πολύ σπάνια συνυπάρχουν και οι δύο τύποι στο ίδιο κύτταρο. Σε αυτό έχουν βασιστεί τα οροτυπικά συστήματα τυποποίησης με μονοκλωνικά αντισώματα, τα οποία έχουν σχεδιαστεί έναντι επιτόπων των δύο πορινικών τύπων. Η δομή της πρωτεΐνης P.I είναι ανάλογη με της αντίστοιχης πορίνης των άλλων gram αρνητικών βακτηρίων. Η σύγκριση των αμινοξικών αλληλουχιών των πρωτεϊνών PorA και PorB αποκαλύπτει συγκεκριμένες κοινές περιοχές, καθώς και περιοχές με σημαντικές διαφορές. Οι διαφορετικές περιοχές πιθανόν αντιστοιχούν σε αντιγονική ποικιλομορφία (Cooke 1997). Τα *PIA* και *PIB* γονίδια είναι αλληλόμορφα. Μελέτες γενετικής μεταμόρφωσης έχουν προσδιορίσει γενετικούς τόπους, όπως ο *nmp* (**n**ew **m**embrane **p**rotein) που περιλαμβάνουν δομικά γονίδια για την P.I και επηρεάζουν τη φαινομενική μοριακή μάζα της P.I (Carbonetti 1988, Judd 1989). Ο γενετικός τόπος

nmp συνδέεται στενά με άλλους γενετικούς τόπους, όπως ο *sac* (serum antibody complement) που επηρεάζει την αντοχή στον ορό, καθώς και ο *renB* που σχετίζεται με χαμηλού επιπέδου, μη ειδική αντοχή στην πενικιλίνη και τετρακυκλίνη (Cannon & Sparling 1984). Η P.I πρωτεΐνη έχει επίσης συσχετιστεί με τον αυξότυπο των στελεχών γονοκόκκου και τον τύπο της IgA1 πρωτεάσης. Ο ρόλος της P.I στην παθογένεια δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως (Brunham 1985).

ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ Ora (Πρωτεΐνη II)

Οι πρωτεΐνες Ora (Opacity proteins) συνιστούν μια ομάδα συγγενών πρωτεϊνών, στις οποίες αρχικά είχε δοθεί η συλλογική ονομασία πρωτεΐνη II (P.II). Το μέγεθός τους κυμαίνεται από 24-28 kDa, ενώ όταν θερμανθούν στους 100⁰ C η πρωτεϊνική τους διάταξη αλλάζει, οπότε παρουσιάζουν μεγαλύτερη μοριακή μάζα κατά την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE) (Walstad 1977, Swanson 1982). Ένα στέλεχος μπορεί να παράγει τουλάχιστον δέκα διαφορετικές ποικιλίες πρωτεϊνών της οικογένειας Ora. Οι πρωτεΐνες Ora παρουσιάζουν ποικιλομορφία φάσης ($Ora^+ \leftrightarrow Ora^-$) και αντιγονική ποικιλομορφία ($Ora A \rightarrow Ora B \rightarrow Ora C \rightarrow \dots$), αντίστοιχη με εκείνη των ινιδίων. Οι πρωτεΐνες Ora μειώνουν τη διαύγεια των αποικιών, δηλαδή ελαττώνουν τη διαπερατότητα των αποικιών στο φως, ενώ όλοι οι Ora^- κλώνοι είναι διαφανείς. Οι διαφορές αυτές αντανακλούν την ποικιλότητα της έκφρασης των πρωτεϊνών Ora. Πιστεύεται ότι η παρουσία διαφορετικών πρωτεϊνών Ora σχετίζεται με διαφορετικά στάδια της γονοκοκκικής λοίμωξης. Γενικά, οι γονόκοκκοι που σχηματίζουν διαφανείς αποικίες και δεν διαθέτουν Ora πρωτεΐνες έχουν συσχετιστεί με μεγαλύτερη παθογονικότητα (Sugasawara 1983, Fischer & Rest 1988).

ΠΡΩΤΕΪΝΗ Rmp (ΠΡΩΤΕΪΝΗ P.III (P.III))

Ο γονόκοκκος, όπως και ο μηνιγγιτιδόκοκκος, έχουν μία αντιγονικά συντηρημένη πρωτεΐνη Rmp (από τα αρχικά των λέξεων Reduction modifiable protein). Η Rmp, η οποία ονομαζόταν παλαιότερα πρωτεΐνη III (P.III) ποικίλλει σε μοριακό βάρος (30- 31 kDa) κατά την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης υπό αναγωγικές συνθήκες. Το γονίδιο *rmp* που κωδικοποιεί για την αντίστοιχη πρωτεΐνη Rmp έχει κλωνοποι-

ηθεί και αναλυθεί ως προς την νουκλεοτιδική του αλληλουχία.. Η πρωτεΐνη Rmp έχει ιδιαίτερη σημασία στην παθογένεια του γονόκοκκου, επειδή έχει την ικανότητα να προκαλεί την παραγωγή IgG αντισωμάτων ικανών να παρεμποδίζουν την προσήλωση αντισωμάτων μέσω του συμπληρώματος σε άλλα επιφανειακά αντιγόνα (πορίνη ή λιποολιγοσακχαρίτης) με αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται η βακτηριοκτόνος δράση του ανθρώπινου ορού (Blake & Gotschlich 1982, Gotschlich et al 1987).

Η.8 ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ

Οι πρωτεΐνες Η.8 φαίνεται να παίζουν ιδιαίτερο ρόλο στην παθογένεια της γονόρροιας, αν και ο ρόλος αυτός δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί. Η ονομασία Η.8 τους δόθηκε από ένα μονοκλωνικό αντίσωμα που ορίζεται ως Η.8 και αντιδρά με ένα συντηρημένο αντιγόνο, το οποίο απαντά σε όλους τους γονόκοκκους, καθώς και στους μηνιγγιτιδόκοκκους και στις *Neisseria lactamica* και *Neisseria cinerea*, αλλά όχι σε άλλα είδη του γένους *Neisseria* (Cannon et al 1984). Στους γονόκοκκους υπάρχουν τουλάχιστον δύο πρωτεΐνες που περιέχουν επίτοπους σύνδεσης με αντισώματα Η.8. Η πρώτη είναι μια λιποπρωτεΐνη που περιέχει πέντε ατελείς επαναλήψεις του πεπτιδίου Ala-Ala-Glu-Ala-Pro (AAEAP) στο αμινοτελικό της άκρο. Η δεύτερη περιέχει 13 επαναλήψεις του AAEAP πεπτιδίου. Κατά την ανάρρωση, ο ασθενής παράγει αντισώματα έναντι των Η.8 πρωτεϊνών, των οποίων ο ρόλος στην παθογένεια δεν έχει διευκρινιστεί (Kawula et al. 1987). Επίσης, είναι φανερό ότι αντισώματα έναντι του Η.8 αντιγόνου δεν προστατεύουν τον ξενιστή από επαναλαμβανόμενες λοιμώξεις, εφόσον οι ασθενείς που έχουν αναπτύξει αντι-Η.8 αντισώματα μπορούν να νοσήσουν ξανά (Black et al. 1985, Brooks & Lammel 1989).

ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΠΟΥ ΚΑΤΑΣΤΕΛΛΟΝΤΑΙ ΑΠΟ ΣΙΔΗΡΟ Η ΟΞΥΓΟΝΟ (Frp)

Οι περισσότερες πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης του γονόκοκκου, με εξαίρεση τα ινίδια, εκφράζονται υπό κανονικές συνθήκες ανάπτυξης. Ωστόσο, κάποιες πρωτεΐνες εκφράζονται μόνο κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες που αναστέλλουν την ανάπτυξη του γονόκοκκου, όπως έλλειψη σιδήρου, αναερόβιες συνθήκες ή χαμηλό Η (West & Sparling 1985, Clark et al. 1987). Πρωτεΐνες που καταστέλλονται από σίδηρο

(Fgp) παράγονται κατά την έλλειψη σιδήρου. Πολλές από αυτές τις πρωτεΐνες αποτελούν υποδοχείς διαφόρων μορίων που φέρουν σίδηρο, όπως η τρανσφερρίνη, λακτοφερρίνη και αιμοσφαιρίνη. Σχεδόν όλοι οι γονόκοκκοι παράγουν ένα λειτουργικό υποδοχέα για τρανσφερρίνη και αιμοσφαιρίνη, αλλά οι μισοί περίπου δεν παράγουν λειτουργικό υποδοχέα για λακτοφερρίνη (Biswas & Sparling 1995, Chen et al 1996, Anderson et al. 1994). Πρωτεΐνες που καταστέλλονται από οξυγόνο (oxyzen-repressible proteins) παράγονται κάτω από αναερόβιες συνθήκες ανάπτυξης. Πολλές από αυτές παράγονται *in vivo*, αφού έχουν την ικανότητα να αντιδρούν με ορό ασθενών υπό ανάρρωση, όπως αποδείχθηκε με πειράματα ανοσοαποτύπωσης (western blot) (Clark et al. 1987).

IGA₁ ΠΡΩΤΕΑΣΕΣ

Όλοι οι γονόκοκκοι απελευθερώνουν, στον ορό και τις εκκρίσεις, μια πρωτεάση που αναγνωρίζει ως υπόστρωμα την ανοσοσφαιρίνη IgA₁, όχι όμως και την IgA₂. Στο γονόκοκκο υπάρχουν δύο ποικιλίες IgA₁ πρωτεασών που διαφέρουν γενετικά και βιοχημικά, με την ποικιλία της IgA₁ πρωτεάσης να συσχετίζεται με τον αυξότυπο και τον ορότυπο των στελεχών. Κάθε IgA₁ πρωτεάση διασπά την ανοσοσφαιρίνη IgA₁ απελευθερώνοντας τα F_{ab} και F_c τμήματα, με αποτέλεσμα να μειώνεται η ανοσολογική άμυνα του βλεννογόνου. Παρόλα αυτά, δεν υπάρχουν πληροφορίες που να πιστοποιούν ότι η IgA₁ πρωτεάση του γονόκοκκου παίζει σημαντικό ρόλο στην αδρανοποίηση της ανοσολογικής άμυνας (Mulks & Knapp 1987). Το αξιοσημείωτο σε αυτή την διαδικασία είναι ότι η IgA₁ πρωτεάση μειώνει την ικανότητα των γονόκοκκων να αναπτύσσονται μέσα στα επιθηλιακά κύτταρα, προφανώς επειδή κανονικά διασπά μια ενδοκυτταρική πρωτεΐνη (την LAMP1) που σχετίζεται με την φαγοκυτταρική πέψη (Lin et al. 1997, Ayala 2002). Η απώλεια της IgA₁ πρωτεάσης δεν μειώνει την μολυσματικότητα των γονόκοκκων. Με κλωνοποίηση και ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του γονιδίου της IgA₁ πρωτεάσης αποδείχθηκε ότι το κύτταρο συνθέτει αρχικά μια πρόδρομη πρωτεΐνη 169 kDa, η οποία διασπάται πρωτεολυτικά δύο φορές οδηγώντας στη δημιουργία μιας OMP 45 kDa και μιας ώριμης IgA₁ πρωτεάσης 106 kDa. Η πρωτεΐνη των 45 kDa σχηματίζει ένα διάυλο στην εξωτερική μεμβράνη, που επιτρέπει την έξοδο της IgA₁ πρωτεάσης στον εξωκυττάριο χώρο (Pohlner et al. 1987).

ΛΙΠΟΟΛΙΓΟΣΑΚΧΑΡΙΤΗΣ (LOS)

Ο λιποολιγосακχαρίτης συνίσταται από ένα λιπιδικό τμήμα A και έναν πολυσακχαριδικό πυρήνα, ο οποίος αποτελείται από κετοδεοξυοκτανικό οξύ, επτόζη, γλυκόζη, γαλακτόζη, γλυκοζαμίνη και/ή γαλακτοζαμίνη (Griffiss et al. 1987). Οι γονόκοκκοι δεν φέρουν μακριές πολυσακχαριδικές δομές, γι'αυτό και ο λιποολιγосακχαρίτης τους είναι μικρότερος από τον αντίστοιχο LPS των άλλων βακτηρίων. Ένα στέλεχος μπορεί να εκφράσει μέχρι έξι ποικιλίες λιποολιγосακχαρίτη, με μοριακό βάρος που κυμαίνεται από 3 έως 7 kDa (Apicella et al. 1986, Griffiss et al. 1987). Η ποικιλομορφία στο μήκος της αλυσίδας των σακχάρων έχει ιδιαίτερη σημασία στην παθογένεια του γονόκοκκου. Ο «κοντός» λιποολιγосακχαρίτης (M.B. 3.8 kDa) εκφράζεται σε ανθεκτικά στην βακτηριοκτόνο δράση του ορού στελέχη, τα οποία έχουν μεγαλύτερη ικανότητα διείσδυσης σε επιθηλιακά κύτταρα. Ο «μακρύς» λιποολιγосακχαρίτης (M.B. 4.5 kDa) περιέχει επιπλέον μια ομάδα γαλακτοζαμίνης, που παρομοιάζει με την δομή συγκεκριμένων ανθρώπινων γλυκοσφιγγολιπιδίων (Smith et al. 1995, van Putten 1993 & 1995). Στελέχη που εκφράζουν τον «μακρύ» λιποολιγосακχαρίτη “μιμούνται”, κατά κάποιο τρόπο, αυτά τα γλυκοσφιγγολιπίδια, με αποτέλεσμα να διαφεύγουν από τους αμυντικούς μηχανισμούς του ανοσοποιητικού συστήματος. Πολλά γονίδια που συμμετέχουν στη συγκρότηση του ολιγосακχαριδικού πυρήνα υπόκεινται σε αντιγονική ποικιλομορφία. Ο λιποολιγосακχαρίτης έχει βλαπτική επίδραση επί των επιθηλιακών κυττάρων του ανθρώπου μέσω του λιπιδίου A (Griffiss et al. 1987).

III. ΓΟΝΟΚΟΚΚΙΚΕΣ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ

Με όσα σήμερα γνωρίζουμε, η γονόρροια μπορεί να χαρακτηριστεί ως νόσος των βλεννογόνων. Ευαίσθητοι στην προσβολή από γονόκοκκο είναι οι βλεννογόνοι που καλύπτονται από κυλινδρικό, κυβικό, ανώριμο επιθήλιο. Η νόσος μεταδίδεται σχεδόν πάντα με στενή φυσική επαφή και η πιο συχνή θέση λοίμωξης είναι ο βλεννογόνος του γεννητικού σωλήνα, μολονότι και οι βλεννογόνοι του φάρυγγα, του πρωκτού και του επιπεφυκότα είναι επίσης ευπρόσβλητοι (Tapsall 2002). Έτσι ο όρος «γονόρροια» καλύπτει ένα ευρύ φάσμα λοιμώξεων, το οποίο περιλαμβάνει πρωτογενείς λοιμώξεις, όσο και πιθανές επιπλοκές που μπορεί να προκύψουν από τοπική επέκταση ή και αιματογενή διασπορά του βακτηρίου πέρα από το αρχικό σημείο προσβολής. Πολλές από τις πρωτογενείς λοιμώξεις, ιδιαίτερα αυτές των γυναικών, καθώς και εκείνες του πρωκτού ή του φάρυγγα, είναι συχνά ασυμπτωματικές (Hook & Handsfield 1997).

ΠΡΩΤΟΠΑΘΕΙΣ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ

Άνδρες: Η πιο συχνή γονοκοκκική λοίμωξη στους άνδρες είναι η γονοκοκκική ουρηθρίτιδα. Το χαρακτηριστικό της σύπτωμα είναι ένα παχύρευστο, κρεμώδες και πυώδες έκκριμα, το οποίο στην οξεία φάση συχνά είναι άφθονο και ρέει αυτόματα. Η λοίμωξη συνοδεύεται από έντονη δυσουρία. Συχνά συνυπάρχει ερυθρότητα και οίδημα του στομίου της ουρήθρας. Οι ενδοουρηθρικοί αδένες αποτελούν επίσης θέσεις αρχικής λοίμωξης. Η γονοκοκκική πρωκτίτιδα συναντάται συχνά στους αμφιφυλόφιλους και ομοφυλόφιλους άνδρες, ενώ είναι εξαιρετικά σπάνια στους ετεροφυλόφιλους. Συνήθως είναι ασυμπτωματική λοίμωξη ή τα συμπτώματά της δεν είναι αρκετά εμφανή, οπότε μπορεί να περάσουν απαρατήρητα. Όταν υπάρχουν συμπτώματα, περιλαμβάνουν πόνο κατά την απόδευση, τεινισμό, κνησμό στην περιπρωκτική χώρα, πιθανά αιμορραγία και δυσκοιλιότητα, καθώς και παρουσία πύου και βλέννης στα κόπρανα (McMillan et al. 1983). Η παρουσία του γονόκοκκου στον φάρυγγα (φαρυγγική γονόρροια) συνήθως δεν συνοδεύεται από κλινικά συμπτώματα φαρυγγίτιδας. Παρόλ' αυτά, είναι δυνατό να αποτελέσει αίτιο γενικευμένης γονοκοκκικής λοίμωξης (Hook & Hansfield 1999).

Γυναίκες: Η πιο συχνή γονοκοκκική λοίμωξη στις γυναίκες είναι η τραχηλίτιδα, η οποία τις περισσότερες φορές είναι ασυμπτωματική. Η ουρήθρα και οι παραουρηθραίοι αδένες επίσης αποτελούν θέσεις αρχικής λοίμωξης. Τα συμπτώματα μοιάζουν με

αυτά της λοίμωξης του κατώτερου γεννητικού συστήματος και περιλαμβάνουν αυξημένα κολπικά υγρά, δυσουρία, αίσθημα βάρους και άλγους στην πυελική χώρα, μηνορραγίες και μητρορραγίες. Στην κλινική εξέταση παρατηρείται πυώδες έκκριμα από το στόμιο του τραχήλου και της ουρήθρας και από τους πόρους των βαρθολινίων αδένων. Στις γυναίκες είναι απαραίτητη η εργαστηριακή επιβεβαίωση της γονοκοκκικής λοίμωξης λόγω της ομοιότητας των συμπτωμάτων όλων των λοιμώξεων του κατώτερου γεννητικού σωλήνα. Οι επιπλοκές της γονόρροιας κατά την κύηση περιλαμβάνουν αυτόματη αποβολή, πρόωρη ρήξη του αμνιακού σάκκου, πρόωρο τοκετό, οξεία χοριοαμνιονίτιδα καθώς και μόλυνση του νεογνού. Η γονοκοκκική πρωκτίτιδα στις γυναίκες μπορεί να οφείλεται σε αυτοεμβολιασμό από τα μολυσμένα κολπικά υγρά, ή σε σεξουαλική επαφή από το ορθό. Η συμπτωματολογία είναι η ίδια με την πρωκτίτιδα στους άνδρες. Όσον αφορά τη συμπτωματολογία και την εργαστηριακή διάγνωση της γονοκοκκικής φαρυγγίτιδας, ισχύουν και στις γυναίκες όσα αναφέρθηκαν παραπάνω στην φαρυγγίτιδα των ανδρών. Επίσης πρέπει να αναφερθεί ότι θεωρείται σπάνια η μετάδοση του γονοκόκκου από τον φάρυγγα της γυναίκας στην ουρήθρα του άνδρα κατά την διάρκεια της σεξουαλικής επαφής, ενώ το αντίθετο είναι συνηθέστερο (Hook & Hansfield 1999).

Στους ενήλικες και των δύο φύλων μπορεί να προκληθεί επιπεφυκίτιδα, η οποία όμως είναι σπάνια. Είναι συχνότερη ως επαγγελματική νόσος σε εργαστηριακό προσωπικό. Πρόκειται για σοβαρή επιπλοκή που μπορεί να οδηγήσει σε μόνιμες βλάβες στους οφθαλμούς.

Παιδιά: Τα κορίτσια στην προεφηβική ηλικία μπορεί να προσβληθούν από αιδιοκολπίτιδα, επειδή στην ηλικία αυτή το επιθήλιο του κόλπου είναι ανώριμο και το αλκαλικό pH ευνοεί τις ναϊσέριες. Με τις ορμονικές αλλαγές που συνοδεύουν την εφηβεία, το κολπικό επιθήλιο διαφοροποιείται και γίνεται πλουσιότερο σε γλυκογόνο, που μεταβολίζεται από γαλακτοβάκιλλους προς γαλακτικό οξύ, με αποτέλεσμα τη μείωση του pH. Παράλληλα, το παχυνόμενο πλακώδες επιθήλιο κάνει τον κόλπο μη ευπαθή στο γονόκοκκο. Η ουρηθρίτιδα, ή ακόμη και η πρωκτίτιδα, στα μικρά αγόρια είναι σχεδόν πάντα αποτέλεσμα πρώιμης σεξουαλικής επαφής ή βιασμού, ενώ η αιδιοκολπίτιδα στα κορίτσια μπορεί να προκληθεί και από στενή επαφή με πάσχοντα ή έμμεσα από μολυσμένα χέρια, ρούχα, εσώρουχα κλπ (Am Ac Ped 1998).

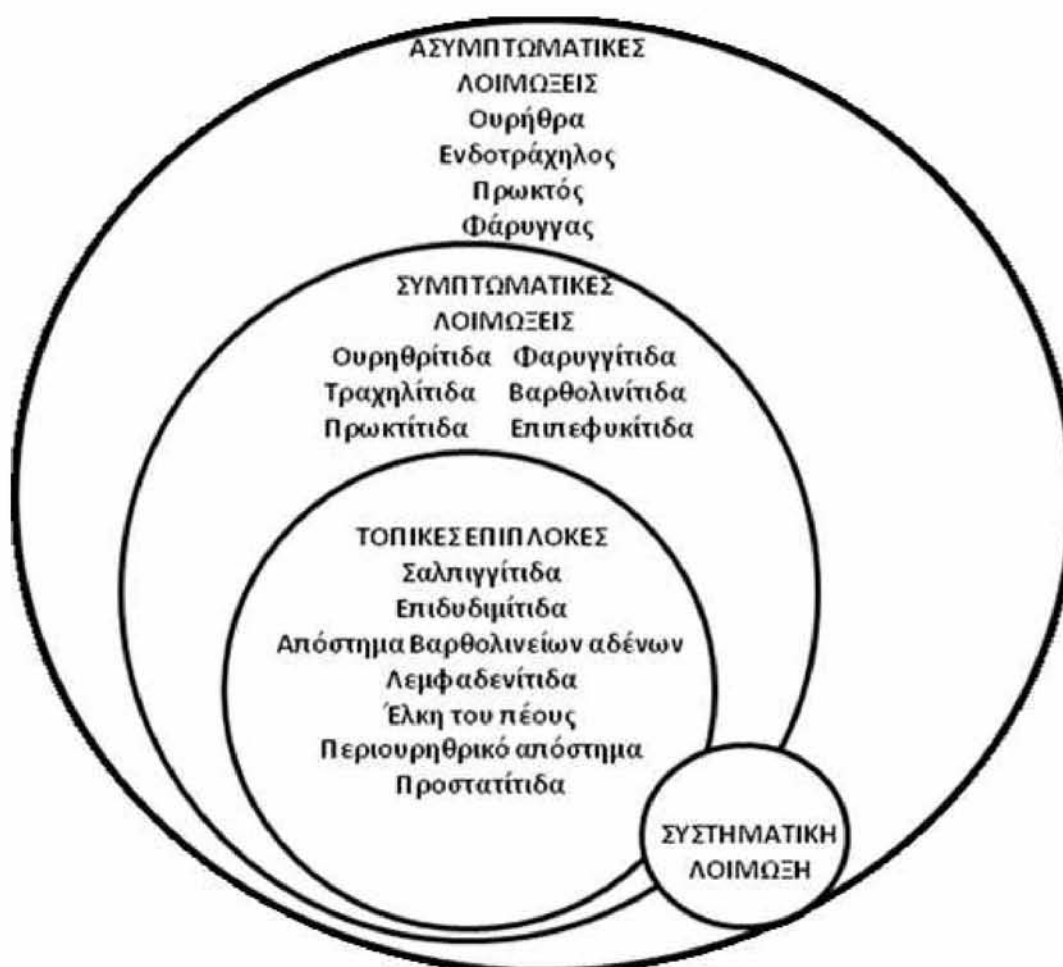
Νεογνά: Η μετάδοση της γονόρροιας από τη μητέρα στο νεογνό μπορεί να γίνει πριν, κατά την διάρκεια ή μετά τον τοκετό (Hook & Handsfield 1999). Η γονοκοκκική νεογνική οφθαλμία συχνά παρουσιάζεται ως οξεία φλεγμονή στον επιπεφυκότα και των δύο οφθαλμών, η οποία εκδηλώνεται 1-7 ημέρες μετά την ρήξη των μεμβρανών. Η επιπεφυκίτιδα που εμφανίζεται 1-4 εβδομάδες μετά τον τοκετό οφείλεται στην παρουσία άλλων παθογόνων, όπως είναι τα: *Clamidia trachomatis*, *Haemophilus influenza*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* ή διάφοροι εντερόκοκκοι. Κάθε επιθηλιακή μεμβράνη μπορεί να αποτελέσει πύλη για αιματογενή διασπορά του γονόκοκκου (νεογνική συστηματική γονοκοκκική λοίμωξη), η οποία καταλήγει σε σηπτική αρθρίτιδα. Σημειώνεται ότι τα νεογνά δεν διαθέτουν IgM ανοσοσφαιρίνες στον ορό οι οποίες είναι βακτηριοκτόνες για τα περισσότερα στελέχη γονοκόκκου παρουσία συμπληρώματος (Gutman 1999, Woods 2005).

ΤΟΠΙΚΕΣ ΚΑΙ ΣΥΣΤΗΜΙΚΕΣ ΕΠΙΠΛΟΚΕΣ ΓΟΝΟΚΚΙΚΩΝ ΛΟΙΜΞΕΩΝ

Άνδρες: Η συνηθέστερη επιπλοκή γονοκοκκικής ουρηθρίτιδας στους άνδρες είναι η επιδιδυμίτιδα, η οποία είναι σπάνια. Εάν συμβεί, εκδηλώνεται με ετερόπλευρο άλγος και οίδημα στους όρχεις. Ο γονόκοκκος συνήθως συνυπάρχει με χλαμύδια και οι εκδηλώσεις της νόσου εμφανίζονται πριν ακόμη εξαφανισθούν τα κλινικά συμπτώματα της ουρηθρίτιδας. Σπάνιες επιπλοκές της γονοκοκκικής ουρηθρίτιδας αποτελούν επίσης, η λεμφαγγειίτιδα, το λεμφοίδημα του πέους, η στένωση της ουρήθρας και η προστατίτιδα (Levens 2003).

Γυναίκες: Το πυελικό φλεγμονώδες σύνδρομο αποτελεί την συχνότερη και σοβαρότερη επιπλοκή τραχηλιτιδος-ουρηθρίτιδος στις γυναίκες. Αφορά το ενδομήτριο, τις σάλπιγγες, τις ωοθήκες και την περιτοναϊκή κοιλότητα και περιλαμβάνει ένα αριθμό φλεγμονωδών παθήσεων για τις οποίες ευθύνονται διάφοροι παθογόνοι μικροοργανισμοί. Επικρατέστερο αίτιο αποτελεί η *N. gonorrhoeae*, μόνη της ή σε συνδυασμό με άλλα αερόβια ή αναερόβια βακτήρια. Ανάλογα με τον εντοπισμό της φλεγμονής έχουμε ενδομητρίτιδα, σαλπιγγίτιδα, αποστήματα των ωοθηκών ή περιτο νίτιδα. Το μεγαλύτερο ποσοστό των φλεγμονών αυτών είναι υποτροπιάζουσες και καταλήγουν σε στειρώση. Άλλες επιπτώσεις είναι οι συμφύσεις και η εξωμήτριος κύηση.

Εκτός από τις τοπικές επιπλοκές, που συνήθως συνδυάζονται με ουρηθρίτιδα ή τραχηλίτιδα, σοβαρότερες είναι η αρθρίτιδα, η σηψαιμία και, σπάνια, η ενδοκαρδίτιδα ή η μηνιγγίτιδα. Οι επιπλοκές αυτές είναι συνήθως απόρροια πρωκτίτιδας ή στοματικών λοιμώξεων και χαρακτηρίζονται ως γενικευμένες (διάχυτες) γονοκοκκικές λοιμώξεις. Συμβαίνουν κυρίως στις γυναίκες και είναι αποτέλεσμα της διέλευσης του γονοκόκκου στην κυκλοφορία του αίματος (LiMaye 2003, Bardin 2003).



Εικόνα 4: Κλινικό φάσμα της γονοκοκκικής λοίμωξης (Hook & Handsfield 1999)

ΠΑΘΟΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΓΟΝΟΡΡΟΙΑΣ

Ο γονόκοκκος προσκολλάται αρχικά μέσω των ινδίων του στα εκκριτικά κύτταρα των βλεννογόνων (όχι στα κροσσωτά κύτταρα), στα οποία εισχωρεί με φαγοκυττάρωση. Στη διαδικασία αυτή εμπλέκονται επιφανειακά μόρια της κυτταρικής μεμβράνης του γονοκόκκου (ινίδια, OMP I & OMP II των O^{++} αποικιών) και των επιθηλιακών κυττάρων του ξενιστή. Ακολουθεί διείσδυση στον υποβλεννογόνο ιστό. Η βλάβη που προκαλεί ο γονόκοκκος στους ιστούς φαίνεται ότι οφείλεται στην τοξική δράση του λιπιδίου A του λιποολιγосακχαρίτη και τμημάτων της πεπτιδογλυκάνης. Στους συμπτωματικούς ασθενείς ακολουθεί φλεγμονώδης αντίδραση με μεγάλο αριθμό πολυμορφοπύρηνων λευκοκυττάρων (PMN), τα οποία έλκονται από μια γονοκοκκική κυτταροτοξίνη είτε από ενεργοποίηση του συμπληρώματος (C_{5a}) ή από χυμοκίνες (IL-8). Τα PMN διηθούν την περιοχή της μόλυνσης και φαγοκυτταρώνουν τα περισσότερα γονοκοκκικά κύτταρα. Λίγα κύτταρα όμως επιζούν και μεγαλώνουν μέσα στα PMN, καταστρέφοντάς τα, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό αθροισμάτων γονοκόκκων που περιβάλλονται από υπολείμματα νεκρών PMN. Τα συμπλέγματα αυτά ονομάζονται *μολυσματικές μονάδες* και πιστεύεται ότι τα κύτταρα γονοκόκκου που βρίσκονται μέσα στις μονάδες αυτές είναι προστατευμένα τόσο από την κυτταρική όσο και από την χυμική ανοσία του ξενιστή.

Οι διάχυτες γονοκοκκικές λοιμώξεις (1-3% των γονοκοκκικών λοιμώξεων) προκαλούνται από την αιματογενή διασπορά του βακτηρίου μακριά από την πρωταρχική θέση λοίμωξης (Hook & Handsfield 1999). Η εγκατάσταση των διάχυτων γονοκοκκικών λοιμώξεων στον οργανισμό μπορεί να οφείλεται στην ανθεκτικότητα ορισμένων στελεχών γονοκόκκου έναντι της βακτηριοκτόνου δράσης του ορού παρουσία συμπληρώματος ή σε ανεπάρκεια του ασθενούς ως προς τα τελικά συστατικά του συμπληρώματος.

Οι ειδικοί μηχανισμοί χυμικής και κυτταρικής ανοσίας του ασθενή επίσης ενεργοποιούνται. Όμως, παρά την ανάπτυξη των ειδικών μηχανισμών, η επανειλημμένη προσβολή από γονόρροια είναι δυνατή, πιθανώς λόγω της μεγάλης αντιγονικής ετερογένειας των επιφανειακών μορίων των γονοκοκκικών στελεχών. Η κυριότερη ιστολογική βλάβη που προκαλείται από την γονόρροια είναι η κηλιδώδης καταστροφή του ουρηθρικού βλενογόνου, λόγω αποφολίδωσης των επιθηλιακών κυττάρων (Edwards & Apicella 2004).

IV. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΓΟΝΟΡΡΟΙΑΣ

Οι εργαστηριακές δοκιμασίες που χρησιμοποιούνται για τη διάγνωση της γονόρροιας περιλαμβάνουν τις δοκιμασίες άμεσου προσδιορισμού των γονοκόκκων ή γονοκοκκικών συστατικών σε κλινικά δείγματα (μικροσκοπική εξέταση, καλλιέργεια) και τις ορολογικές αντιδράσεις (αναζήτηση αντιγόνων, νουκλεϊνικών οξέων και αντισωμάτων).

ΑΜΕΣΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ

Οι βασικές μέθοδοι άμεσου προσδιορισμού είναι η μικροσκοπική εξέταση και η καλλιέργεια. Σε άνδρες ασθενείς με ουρηθρίτιδα, η διάγνωση μπορεί να επιτευχθεί εύκολα με μικροσκοπική εξέταση άμεσου κατά Gram παρασκευάσματος (ευαισθησία και ειδικότητα =90%,βλ. Πίνακα 1) . Σε ασυμπτωματικούς ασθενείς, άνδρες και γυναίκες, όπου απαιτείται η χορήγηση θεραπείας, πρέπει να γίνεται καλλιέργεια. Άλλες μέθοδοι άμεσου προσδιορισμού είναι η μικροσκοπική χρώση με ακριδίνη ή με φθορίζοντα αντισώματα, η ανοσοηλεκτροφόρηση και ο ανοσοφθορισμός (Sparling 1999).

Μικροσκοπική εξέταση Οι πιο απλές και γρήγορες χρώσεις που χρησιμοποιούνται για την μικροσκοπική παρατήρηση του γονοκόκκου είναι η χρώση κατά Gram, η χρώση κυανού του μεθυλενίου και η χρώση με πορτοκαλόχροο της ακριδίνης. Στην καθημερινή διαγνωστική πράξη χρησιμοποιείται κυρίως η χρώση κατά Gram. Επί θετικού αποτελέσματος (κυρίως στο οξύ στάδιο της νόσου), στα μικροσκοπικά παρασκευάσματα Gram παρατηρούνται πολλοί ενδοκυττάριοι διπλόκοκκοι που εντοπίζονται μέσα ή σε στενή επαφή με πολυμορφοπύρρηνα λευκά αιμοσφαίρια. Το αποτέλεσμα θεωρείται αμφίβολο, όταν οι Gram-αρνητικοί διπλόκοκκοι είναι μόνο εξωκυττάριοι, και αρνητικό εφόσον δεν υπάρχουν στο παρασκεύασμα καθόλου Gram-αρνητικοί διπλόκοκκοι. Όταν η νόσηση παρατείνεται, οι εκκρίσεις γίνονται λεπτόρρευστες, περιέχουν λιγότερα πολυμορφοπύρρηνα και είναι δύσκολο να εντοπιστούν διπλόκοκκοι. Στο παρασκεύασμα Gram, η *N. meningitidis* παρουσιάζεται απολύτως όμοια με τη *N. gonorrhoeae*, ενώ οι σαπροφυτικές ναϊστέριες δεν είναι σχεδόν ποτέ ενδοκυττάρια. Η διαγνωστική αξία της χρώσης κατά Gram είναι προσεγγιστική. Η ευαισθησία του άμεσου κατά Gram παρασκευάσματος εξαρτάται από τον τύπο της γονοκοκκικής λοίμωξης και το σημείο λήψης του δείγματος (Πίνακας 1).

Πίνακας 1: Ευαισθησία και ειδικότητα του άμεσου κατά Gram παρασκευάσματος, ανάλογα με τη θέση δειγματοληψίας (Lind 1979)

Ανατομικό σημείο	Ευαισθησία ¹	Ειδικότητα ²
Ουρήθρα (άρρενος)	90-95%	95-100%
Ενδοτράχηλος (θήλειες)	50-70%	95-100%
Ορθό (ασχέτως φύλου)	40-60%	95-100%

¹Ευαισθησία = ποσοστό ασθενών με θετικές καλλιέργειες και θετική Gram

²Ειδικότητα = ποσοστό ασθενών με αρνητικές καλλιέργειες και αρνητική Gram

$$\text{Ευαισθησία Μεθόδου} = \frac{\text{νοσούντες με θετικό test}}{\text{σύνολο νοσούντων που ελέγχθηκαν}} \times 100$$

$$\text{Ειδικότητα Μεθόδου} = \frac{\text{μη-νοσούντες με αρνητικό test}}{\text{σύνολο μη-νοσούντων που ελέγχθηκαν}} \times 100$$

Σε γενικές γραμμές, η θετική Gram έχει ικανή διαγνωστική αξία (ευαισθησία έως και 95%) σε σχέση με την καλλιέργεια, μόνον επί συμπτωματικής ουρηθρίτιδας στους άνδρες, ενώ δίνει πολλά ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα στις ασυμπτωματικές λοιμώξεις και στις γυναίκες με γονόρροια. Γι'αυτό η καλλιέργεια είναι απαραίτητη σε αυτές τις περιπτώσεις (Hook and Hansfield 1999).

Καλλιέργεια Η καλλιέργεια εξακολουθεί να είναι η δοκιμασία αναφοράς (golden standard) για τη διάγνωση της νόσου για δύο λόγους: (α) την ευαισθησία της (70-95%), παρά το ότι οι μοριακές δοκιμασίες αναζήτησης νουκλεϊνικού οξέος (PCR, LCR, TMA) επιτυγχάνουν ήδη παρόμοια ποσοστά ευαισθησίας, και (β) την ειδικότητά της (100%) (Bonin et al 1984, Sparling 1999). Η ευαισθησία της καλλιέργειας για την ανίχνευση του γονόκοκκου εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το είδος των δειγμάτων (θέση και τρόπος δειγματοληψίας), τα υλικά μεταφοράς, τις συνθήκες επώασης και την ταυτοποίηση των αποικιών που απομονώθηκαν. Η ιδανική διαδικασία είναι, μόλις γίνει η λήψη του δείγματος από τον ασθενή, να γίνεται αμέσως η καλλιέργεια στο τρυβλίο.

Εισαγωγή

Με έγκαιρη επώαση στις κατάλληλες συνθήκες (37⁰C, ατμόσφαιρα CO₂ 5-7%, υγρασία ~70%) επιτυγχάνεται το καλύτερο θετικό αποτέλεσμα. Αν αυτό δεν είναι εφικτό και πρέπει να μεταφέρουμε το δείγμα, το καταλληλότερο υλικό μεταφοράς είναι το υλικό Stuart-Amies. Η μεταφορά γίνεται σε θερμοκρασία δωματίου και ο εμβολιασμός από το υλικό μεταφοράς στο υλικό καλλιέργειας πρέπει να γίνει εντός 24 ωρών το αργότερο, αλλιώς το ποσοστό θετικού αποτελέσματος μειώνεται δραματικά. Ο γονόκοκκος μπορεί να αναπτυχθεί σε κοινά θρεπτικά υλικά, όπως το σοκολατόχρωμο άγαρ, υπό την προϋπόθεση ότι αποτελεί τον κυριότερο μικροβιακό πληθυσμό στο δείγμα, όπως συνήθως συμβαίνει στο έκκριμα γονοκοκκικής ουρηθρίτιδας στους άνδρες. Εάν όμως το υπό εξέταση δείγμα προέρχεται από σημείο όπου αναμένεται να υπάρχει πλούσια φυσιολογική χλωρίδα (τράχηλος πρωκτός, φάρυγγας), τότε το θρεπτικό υλικό πρέπει να είναι εμπλουτισμένο και εκλεκτικό. Σε πιθανότητα ασυμπτωματικής γονοκοκκικής λοίμωξης, η δειγματοληψία και η προσπάθεια καλλιέργειας πρέπει να επαναλαμβάνονται σε περίπτωση αρνητικού αποτελέσματος.

Ο γονόκοκκος χρειάζεται για την ανάπτυξή του θρεπτικό υλικό πλούσιο σε κυστεΐνη, σίδηρο και γλυκόζη. Επίσης προστίθεται άμυλο για την απορρόφηση αναστολέων. Στα περισσότερα εργαστήρια, το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιείται είναι το τροποποιημένο Thayer-Martin (MTM, Modified Thayer-Martin). Το MTM είναι σοκολατόχρωμο άγαρ εμπλουτισμένο με τροφικό συμπλήρωμα, όπως το Isovitalex, που περιέχει βιταμίνες, ιχνοστοιχεία, αμινοξέα και υδατάνθρακες. Κατάλληλο θρεπτικό υλικό απομόνωσης του γονόκοκκου είναι επίσης το GC άγαρ, επίσης εμπλουτισμένο με τροφικό συμπλήρωμα. Η επιλογή ενός μίγματος αντιβιοτικών για την αναστολή της φυσιολογικής χλωρίδας είναι δύσκολη, γιατί σε μερικές περιπτώσεις αναστέλλεται και η ανάπτυξη του γονόκοκκου. Ο καταλληλότερος συνδυασμός αντιβιοτικών περιλαμβάνει βανκομυκίνη, για την αναστολή των Gram θετικών βακτηρίων, κολιστίνη για τα Gram-αρνητικά βακτήρια, τριμεθοπρίμη για να παρεμποδίζει τον ερπυσμό των *Proteus* sp. και νυστατίνη ή αμφοτερικίνη για την αναστολή των μυκήτων (Evangelista et al. 1993, Morello et al.1985, Bonin et al 1984).

Μετά την επώαση, ακολουθούν οι δοκιμασίες ταυτοποίησης της *N. gonorrhoeae*. Η ταυτοποίηση των αποικιών που απομονώνονται είναι είτε προσεγγιστική, βάσει μορφολογίας και δοκιμασίας οξειδάσης, είτε οριστική μετά από μικροσκοπική παρατήρηση Gram παρασκευάσματος από το καθαρό καλλιέργημα και ταυτοποίηση

βάσει του μεταβολισμού των σακχάρων. Εκτός από τον γονόκοκκο, θετική αντίδραση οξειδάσης δίνουν και τα άλλα είδη του γένους *Neisseria*., αλλά κάθε είδος παρουσιάζει ένα χαρακτηριστικό φάσμα μεταβολισμού σακχάρων. Έτσι, η δοκιμασία του μεταβολισμού των σακχάρων ταυτοποιεί τη *N. gonorrhoeae* διακρίνοντάς την από τις άλλες ναϊσέριες (Πίνακας 2).

Πίνακας 2: Κύρια χαρακτηριστικά της διαφοροποίησης των συνηθέστερων ειδών του γένους *Neisseria* βάσει της ζύμωσης των σακχάρων και της ικανότητας ανάπτυξης στους 22⁰C (Knapp 1988)

Είδος	Ανάπτυξη (22 ⁰ C)	Μεταβολισμός			
		Γλυκόζη	Μαλτόζη	Σουκρόζη	Λακτόζη
<i>N. meningitidis</i>	-	+	+	-	-
<i>N. gonorrhoeae</i>	-	+	-	-	-
<i>N. lactamica</i>	-	+	+	-	+
<i>N. sicca</i>	+	+	+	+	-
<i>N. flavescens</i>	+	-	-	-	-

ΟΡΟΛΟΓΙΚΕΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ

Σε ασθενείς με γονοκοκκική λοίμωξη παράγονται αντισώματα έναντι των ινιδίων και των διαφόρων συστατικών της εξωτερικής μεμβράνης του γονοκόκκου, τα οποία μπορούν να προσδιοριστούν με αρκετές ορολογικές μεθόδους, όπως η ανοσοενζυμική μέθοδος (ELISA), η καθήλωση συμπληρώματος (complement fixation), η ανοσοκαθίζηση, η βακτηριακή λύση, η αιμοσυγκόλληση, η συγκολλητινο-αντίδραση (latex agglutination), ο ανοσοφθορισμός. Πολλές από αυτές τις τεχνικές έχουν αποδειχθεί ιδιαίτερα χρήσιμες στις μελέτες της ανοσολογικής απόκρισης και της παθογένειας του γονόκοκκου (Easmon & Ison, 1987).

Αναζήτηση αντιγόνων Στις αρχές της δεκαετίας του 1980 αναπτύχθηκε η ανοσοενζυματική μέθοδος (EIA) στερεάς φάσης για την αναζήτηση των αντιγόνων της επιφανείας της *N. gonorrhoeae* (Por, Ora κλπ) με τη χρήση πολυκλωνικών αντισωμάτων. Η μέθοδος αυτή έχει δοκιμαστεί για τη διάγνωση της γονόρροιας σε έκκριμα ουρήθρας και ενδοτραχηλικό επίχρισμα. Η εφαρμογή της σε ευρεία κλίμακα,

κυρίως στις ΗΠΑ, έδειξε ότι είναι εξίσου ευαίσθητη με τη μικροσκοπική κατά Gram και την καλλιέργεια επί ανδρικής γονοκοκκικής ουρηθρίτιδας, αλλά υστερεί όταν εφαρμόζεται σε τραχηλικά δείγματα γυναικών. Το πλεονέκτημά της έναντι της καλλιέργειας συνίσταται στο ότι το δείγμα μπορεί να μεταφερθεί και να διατηρηθεί σε κοινή ψύξη ή κατάψυξη και να εξεταστεί μετά από αρκετά 24ωρα χωρίς να επηρεασθεί η ευαισθησία του. Παρόλα αυτά, λόγω του αρκετά μεγάλου αριθμού ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων και τη μειωμένη της ευαισθησία στις γυναίκες, η ανοσοενζυματική μέθοδος τείνει να εγκαταλειφθεί, τόσο ως εξέταση ρουτίνας, όσο και ως εξέταση διαλογής (screening tests) για επιδημιολογικές μελέτες (CDC 2002-β).

Άλλες δοκιμασίες αναζήτησης αντιγόνων της *N. gonorrhoeae* είναι ο άμεσος ανοσοφθορισμός και οι συγκολλητινο-αντιδράσεις. Είναι άμεσες και γρήγορες δοκιμασίες που χρησιμοποιούνται για επιβεβαίωση της ταυτότητας στελεχών μετά από θετική καλλιέργεια. Η υψηλή ευαισθησία και ειδικότητά τους στηρίζεται στη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων. Το υψηλό κόστος συνεχίζει να αποτελεί περιοριστικό παράγοντα για την ευρύτερη χρήση τους (Ison et al. 1985).

Αναζήτηση αντισωμάτων Οι τεχνικές ανίχνευσης αντισωμάτων έναντι της *N. gonorrhoeae* στον ορό του αίματος περιλαμβάνουν τη σύνδεση συμπληρώματος, ανοσοκαθίζηση, αιμοσυγκόλληση, ανοσοφθορισμό, ανοσοενζυματική μέθοδο, Latex συγκολλητινο-αντίδραση και βακτηριακή λύση. Πολλές από αυτές τις μεθόδους είναι χρήσιμες στην μελέτη της ανοσολογικής απάντησης του ασθενούς και των παθογενετικών μηχανισμών της νόσου. Παρόλα αυτά, πολλές από αυτές τις οροδιαγνωστικές δοκιμασίες έχουν μικρή ευαισθησία (=70%) και ειδικότητα (=80%), ακόμα και σε ασθενείς με απλές, μη-επιπεπλεγμένες γονοκοκκικές λοιμώξεις (CDC 2002-β, Knapp et al. 1984, van Doornum et al. 2001, van Dyck et al. 2001).

Αναζήτηση νουκλεϊνικών οξέων Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί διαγνωστικές τεχνικές που βασίζονται στην ανίχνευση νουκλεϊνικών οξέων απ' ευθείας στα κλινικά δείγματα που λαμβάνονται από διάφορες θέσεις του ουρογεννητικού συστήματος. Οι τεχνικές αυτές χαρακτηρίζονται από υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα, εφάμιλλες εκείνων της καλλιέργειας. Για τη διάγνωση της *N. gonorrhoeae* έχουν εφαρμοστεί DNA-υβριδισμός (μη-πολλαπλασιαστική μέθοδος), αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), αλυσιδωτή αντίδραση λιγάσης (LCR) και πολλαπλασιασμός μεταγραφάσης (TMA) (Evangelista et al 1993, Hook and Hansfield 1999).

V. ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ ΓΟΝΟΚΟΚΚΟΥ

Η τυποποίηση των στελεχών είναι ιδιαίτερης αξίας για το γονόκοκκο, γιατί προσφέρει χρήσιμες πληροφορίες για την επιδημιολογική παρακολούθηση της γονόρροιας, την εμφάνιση και διασπορά ανθεκτικών στα αντιβιοτικά στελεχών, την ανίχνευση επιδημιών που προκαλούνται από κλωνική διασπορά στελεχών και τις επιδημιολογικές μεταβολές που συμβαίνουν σε διάφορες χρονικές περιόδους.

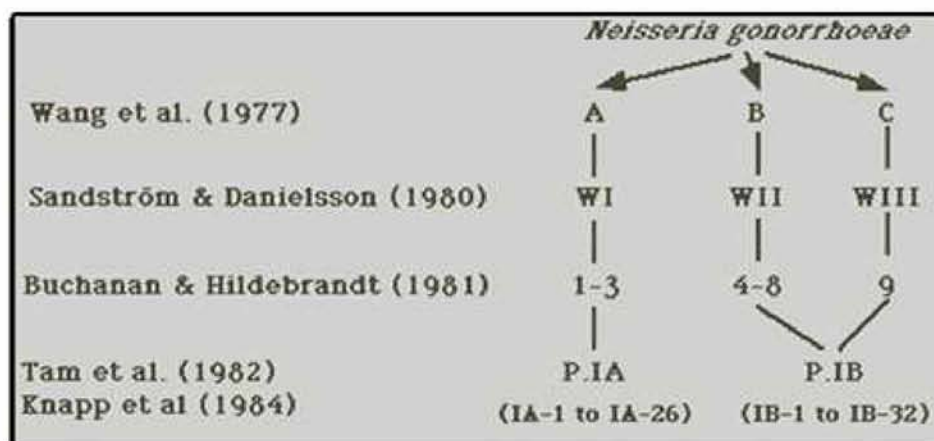
Για την τυποποίηση των γονοκόκκων έχουν αναπτυχθεί ποικίλες μεθοδολογίες, που σε αδρές γραμμές μπορούν να διακριθούν σε φαινοτυπικές (ή συμβατικές, όπως συνήθως αναφέρονται) και σε γονοτυπικές (ή μοριακές) μεθόδους. Στις φαινοτυπικές μεθόδους τυποποίησης περιλαμβάνονται κυρίως η οροτυπία και η αυξοτυπία. Ο φαινότυπος αντοχής/ευαισθησίας στα αντιβιοτικά, επίσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βραχυπρόθεσμος τυποποιητικός δείκτης, αλλά μόνον για στελέχη που απομονώνονται σε σχετικά περιορισμένο χρόνο και τόπο και μόνον μαζί με άλλους τυποποιητικούς χαρακτήρες, γιατί μεταβάλλεται εύκολα (π.χ. με την απόκτηση πλασμιδίων). Στις μοριακές μεθόδους τυποποίησης περιλαμβάνονται μέθοδοι ανάλυσης του χρωμοσωματικού κυρίως, αλλά και του πλασμιδιακού DNA των γονοκόκκων. Τέτοιες μέθοδοι είναι η ανάλυση πλασμιδιακού περιεχομένου, η ανάλυση γενωμικού DNA σε ηλεκτροφόρηση παλλόμενου πεδίου (PFGE), η αποτύπωση γονιδιώματος (genomic fingerprinting), η πολυεστιακή ηλεκτροφόρηση ισοενζύμων (multilocus enzyme electrophoresis), η ανάλυση πολυμορφισμού μήκους σε θραύσματα περιορισμού συγκεκριμένων γονιδίων ή πλασμιδίων (restriction fragment length polymorphism RFLP) κá (Ison 1998, O'Rourke & Stevens 1993, Poh et al. 1992a, & 1992b, Struelens et al. 1996).

ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

Οροτυπία

Ο καθορισμός του ορότυπου ενός στελέχους *N. gonorrhoeae* γίνεται με οροσυγκόλληση και βασίζεται στη χρήση συστημάτων (σειρών) μονοκλωνικών αντισωμάτων (MAbs) που αναγνωρίζουν μεμονωμένους επίτοπους στην κύρια πρωτεΐνη I (PorI) της εξωτερικής μεμβράνης του γονοκοκκικού κυττάρου. Ο ορότυπος κάθε στελέχους προκύπτει από τον συνδυασμό των επιτόπων που αναγνωρίζονται από τα μονοκλωνικά αντισώματα κάθε συστήματος (Bygdeman et al. 1993).

Τα συστήματα Mabs που χρησιμοποιούνται σήμερα για την οροτυπία του γονοκόκκου είναι παρόμοια και εξελίχθηκαν μετά από επανειλημμένες προσπάθειες που έγιναν την τελευταία τριακονταετία, από δύο κυρίως ομάδες ερευνητών, για το σχεδιασμό τους (Εικόνα 5).



Εικόνα 5: Ιστορική αναδρομή της ανάπτυξης των οροτυπικών συστημάτων τυποποίησης για την *N.gonorrhoeae* βάσει της αντιγονικής ειδικότητας της γονοκοκκικής P.I πρωτεΐνης (Sarafian & Knapp 1989).

Αρχικά, χρησιμοποιήθηκαν, από τους Wang και συν., πολυδύναμα αντισώματα έναντι ολόκληρων γονοκοκκικών κυττάρων. Η μέθοδος αυτή κατατάσσει τα στελέχη σε τρεις ομάδες A, B και C (Wang et al. 1977). Στη συνέχεια, οι Sandstrom και Danielsson ταξινόμησαν τα στελέχη γονοκόκκου σε τρεις ορολογικά διακριτές ομάδες WI, WII και WIII, οι οποίες αντιστοιχούσαν στις ομάδες A, B και C του Wang (Sandstrom & Danielsson 1980). Οι Buchanan & Hildebrandt, το 1981, ταξινόμησαν τα γονοκοκκικά στελέχη σε εννέα ορότυπους, αριθμημένους από το 1 έως το 9, χρησιμοποιώντας την ανοσοενζυματική μέθοδο ELISA με μερικώς καθαρισμένη πρωτεΐνη PI (PorI). Οι ορότυποι 1-3, 4-8 και 9 αντιστοιχούσαν στις ορολογικές ομάδες WI, WII και WIII, αντίστοιχα (Buchanan & Hildebrandt 1981, Sandstrom et al. 1982a, Knapp et al. 1984). Σε επόμενο βήμα, η ομάδα του Sandstrom έδειξε ότι η πρωτεΐνη I μπορούσε να διαχωριστεί σε δύο κύριους αντιγονικούς τύπους, IA και IB, που αντιστοιχούν στις ομάδες WI και WII/III (Sandstrom et al. 1982a, 1982b) και παρασκεύασε ένα πλήρες

σύστημα Mabs έναντι επιτόπων των πρωτεϊνών IA και IB (Tam et al. 1982).

Τα Mabs είναι συνδεδεμένα με την πρωτεΐνη A του σταφυλόκοκκου, η οποία έχει την ικανότητα να συνδέεται με το Fc τμήμα της IgG. Κατά την αντίδραση των αντισωμάτων με στελέχη γονοκόκκου, δημιουργούνται συσσωματώματα και τα στελέχη ταξινομούνται σε ομάδες βάσει αυτών των αντιδράσεων. Για την ταξινόμηση των στελεχών γονοκόκκου σε ορότυπους, επιλέχθηκαν έξι P.IA και έξι P.IB ειδικά μονοκλωνικά αντισώματα, που είναι γνωστά ως GS (Genetic System) αντιδραστήρια (Knapp et.al. 1984, Knapp et al. 1985).

Μία παραλλαγή του παραπάνω συστήματος, που επίσης εφαρμόζεται ευρέως σήμερα, είναι το GC σύστημα, το οποίο σχεδιάστηκε αρχικά για τη διάκριση μεταξύ στελεχών που επικρατούσαν σε συγκεκριμένες ομάδες ασθενών (Sandstrom et al. 1985). Το GC σύστημα περιλαμβάνει χρησιμοποιεί πέντε P.IA και εννέα P.IB Mabs και χρησιμοποιεί διαφορετική ονοματολογία (ονοματολογία κατά Bygdeman) για τους ορότυπους των στελεχών (Bygdeman et al. 1985, Danielson et al. 1985, Knapp et al. 1985). Το GC σύστημα είναι γνωστό και ως Ph-σύστημα, επειδή αρχικά είχε αναλάβει την παρασκευή και διάθεσή του η εταιρεία Pharmacia.

Αυξοτυπία

Η μέθοδος της αυξοτυπίας συνίσταται στον προσδιορισμό των αυξοτροφικών απαιτήσεων του γονόκοκκου. Ο προσδιορισμός τους γίνεται με τη χρήση ειδικά σχεδιασμένων μέσων καλλιέργειας με αυστηρά καθορισμένη χημική σύσταση και με την ενσωμάτωση ή παράλειψη σε αυτά αυξητικών παραγόντων (αμινοξέων, βιταμινών κ.ά) που είναι απαραίτητοι για την ανάπτυξη του γονόκοκκου (Catlin 1973). Πρωτότροφα χαρακτηρίζονται τα στελέχη που δεν χρειάζονται καμμία από αυτές τις ουσίες για την ανάπτυξή τους επειδή μπορούν να τις συνθέσουν μόνα τους, ενώ αυξότροφα ως προς τη μία ή την άλλη ουσία χαρακτηρίζονται τα στελέχη που δεν μπορούν να συνθέσουν την ουσία αυτή και γι'αυτό πρέπει να την προσθέσουμε στο μέσο καλλιέργειας. Ορισμένοι αυξότυποι έχουν συσχετιστεί με συγκεκριμένους τύπους γονοκοκκικών λοιμώξεων, καθώς και με την γεωγραφική προέλευση των στελεχών και με την ευαισθησία τους στα αντιβιοτικά. Για παράδειγμα, έχει αναφερθεί η επικράτηση γονοκοκκικών στελεχών με αυξότυπο AHU (στελέχη με τροφική απαίτηση στην αργι-

νίνη, υποξανθίνη και ουρακίλη) στη διάχυτη γονοκοκκική λοίμωξη, καθώς και η χαρακτηριστική ευαισθησία των AHU στελεχών στην πενικιλίνη (Knapp & Holmes 1975, Morello et al. 1976). Άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι στελέχη γονοκόκκου που φέρουν το ασιατικό πλασμίδιο αντοχής (4.5 MDa) στην πενικιλίνη είναι κυρίως πρωτότροφα ή έχουν τροφική απαίτηση για προλίνη (Pro⁻), ενώ αυτά που φέρουν το αφρικανικό πλασμίδιο αντοχής (3.2 MDa) στην πενικιλίνη είναι αυξότροφα στην αργινίνη (Catlin & Pace 1977, Knapp 1978, Morello et al. 1976).

ΓΟΝΟΤΥΠΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

Ανάλυση Πλασμιδιακού Περιεχομένου

Η ανάλυση πλασμιδιακού περιεχομένου γίνεται με ηλεκτροφόρηση του πλασμιδιακού DNA του κυττάρου σε πήκτωμα αγαρόζης και διακρίνει τα στελέχη μεταξύ τους από το συνδυασμό των πλασμιδίων που φιλοξενούν. Τα πλασμίδια περιγράφονται με βάση την κινητικότητα τους στην αγαρόζη (Dillon & Yeung 1989). Η ανάλυση πλασμιδιακού περιεχομένου προσφέρεται για την τυποποίηση των γονοκόκκων, επειδή τα πλασμίδια που απαντούν στην *N.gonorrhoeae* είναι λίγα και συγκεκριμένα, ενώ δύο από αυτά, το συζευκτικό και το κρυπτικό, είναι ενδογενή και απαντούν το μεν κρυπτικό σε >95% των γονοκόκκων, το δε συζευκτικό σε συχνότητα που ποικίλει ανάλογα με τον τύπο των στελεχών. Τα ενδογενή, καθώς και τα περισσότερα από τα πλασμίδια αντοχής που απαντούν στον γονόκοκκο αναγνωρίζονται εύκολα από το μέγεθός τους. Η ανάλυση πλασμιδιακού περιεχομένου ως μεμονωμένη μέθοδος έχει σχετικά χαμηλή διακριτική ικανότητα. Αποδεικνύεται παρόλ' αυτά πολύτιμη σε μερικές περιπτώσεις σπάνιων χαρακτήρων (π.χ. απουσία του κρυπτικού πλασμιδίου). Η χρήση των «πλασμιδιότυπων» σε συνδυασμό με τους ορότυπους και τους αυξότυπους (S/A/Pc τύποι) επιτυγχάνει ικανοποιητική διάκριση των στελεχών γονοκόκκου, αλλά και πάλι αφήνει ένα σημαντικό ποσοστό σε κάθε πληθυσμό γονοκόκκων σε μία ενιαία ομάδα, που δεν συγκροτείται απαραίτητα από όμοια στελέχη.

Ανάλυση Πολυμορφισμού Περιοριστικών Θραυσμάτων (RFLP)

Με αυτή την μέθοδο το χρωμοσωματικό DNA των στελεχών διασπάται με την χρήση περιοριστικών ενδονουκλεασών, οι οποίες αναγνωρίζουν συγκεκριμένες νου-

κλεοτιδικές αλληλουχίες. Τα προϊόντα της πέψης σχηματίζουν ένα σύνολο θραυσμάτων DNA, τα οποία δημιουργούν, κατά τον διαχωρισμό τους στην ηλεκτροφόρηση, ένα χαρακτηριστικό τύπο, που είναι γνωστός ως αποτύπωμα περιοριστικών θραυσμάτων του αντίστοιχου γενώματος (fingerprinting, Restriction Fragment Length Polymorphism –RFLP). Η μέθοδος είναι χρήσιμη για τη σύγκριση του γονιδιώματος ή τμημάτων του γονιδιώματος στελεχών, π.χ. τη σύγκριση πλασμιδίων ή γονιδίων (Dasi 1992, Falk et al. 1984, 1985 και 1988).

Ανάλυση Γενομικού DNA με ηλεκτροφόρηση σε παλλόμενο πεδίο (PFGE)

Η ηλεκτροφόρηση DNA σε παλλόμενο πεδίο (Pulsed Field Gel DNA Electrophoresis –PFGE) βασίζεται στην πέψη του ολικού DNA από ένζυμα περιορισμού που κόβουν το DNA σε σπάνιες θέσεις (rare cutters), με αποτέλεσμα να δημιουργούνται σχετικά λίγα και μεγάλου μεγέθους θραύσματα περιορισμού. Ο διαχωρισμός των μεγάλων αυτών τμημάτων DNA (20-200 kb) απαιτεί ειδικές συνθήκες ηλεκτροφόρησης, οι οποίες επιτυγχάνονται με περιοδική μεταβολή της φοράς του ηλεκτρικού πεδίου κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης (παλλόμενο πεδίο). Ο συνδυασμός των θραυσμάτων DNA που δημιουργούνται είναι μοναδικός για κάθε διαφορετικό στέλεχος και εμφανίζεται στο πήκτωμα της αγαρόζης μετά την ηλεκτροφόρηση ως ένα «σχήμα» (pattern) ζωνών που αντιστοιχούν στον «παλσότυπο» του στελέχους. Η PFGE υπερτερεί της RFLP, ως προς το ότι οι παλσότυποι, συνιστάμενοι από λίγες ζώνες, είναι πολύ πιο εύκολο να συγκριθούν μεταξύ τους από ότι οι πολύπλοκοι RFLP-τύποι. Το μειονέκτημα της PFGE είναι το υψηλό κόστος του εξοπλισμού που απαιτείται για την ηλεκτροφόρηση σε παλλόμενο πεδίο (Ison 1998, Kaufmann & Pitt 1994).

VI. ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΗΣ ΓΟΝΟΡΡΟΙΑΣ

Η θεραπεία σε περιπτώσεις συμπτωματικών γονοκοκκικών λοιμώξεων, όπως είναι συνήθως η γονοκοκκική ουρηθρίτιδα, πρέπει να χορηγείται αμέσως μετά τη διάγνωση προς άμεση ανακούφιση των συμπτωμάτων, αλλά και για να προλαμβάνεται η περαιτέρω διασπορά του μικροβίου. Στις περιπτώσεις αυτές, που είναι και οι περισσότερες, η θεραπεία είναι συνήθως εμπειρική και προηγείται της καλλιέργειας και του αντιβιογράμματος, οπότε υποχρεωτικά βασίζεται σε επιδημιολογικά δεδομένα για την ευαισθησία της *N.gonorrhoeae*. Τα δεδομένα αυτά προέρχονται από την επιδημιολογική επιτήρηση της ευαισθησίας του γονοκόκκου στα αντιβιοτικά.

Προτεινόμενη στρατηγική θεραπείας της γονόρροιας είναι η χρήση μιας και μόνης δόσης, έτσι ώστε να διευκολύνεται η εφαρμογή της θεραπευτικής αγωγής από τους ασθενείς και να αποφεύγονται προβλήματα που έχουν σχέση με την κατανόηση των οδηγιών του γιατρού και την τήρησή τους από τους ασθενείς. Επίσης, κατά την επιλογή του θεραπευτικού σχήματος θα πρέπει να λαμβάνεται υπ' όψη και η πιθανότητα να συνυπάρχουν μαζί με την γονοκοκκική λοίμωξη και λοιμώξεις που οφείλονται σε άλλα παθογόνα. Από το 1985 και εξής, το CDC συνιστά συνδυασμένη αγωγή για την εκρίζωση του γονοκόκκου όσο και των άλλων παθογόνων, π.χ των χλαμυδίων (CDC 1998). Στις ανεπτυγμένες χώρες (Δ. Ευρώπη, ΗΠΑ, Καναδάς), ο συνηθέστερος παθογόνος μικροοργανισμός που απαντά μαζί με το γονόκοκκο σε μεικτές λοιμώξεις είναι η *Chlamydia trachomatis*, ενώ στις αναπτυσσόμενες χώρες της τροπικής ζώνης συχνά συνυπάρχει λοίμωξη με *Haemophilus dycreyi*, καθώς και με *Treponema palidum*. Η συνλοίμωξη με *Treponema palidum* δεν θεωρείται σήμερα πολύ συχνή, εκτός αν ο ασθενής μολύνθηκε σε περιοχή με πρόσφατη έξαρση κρουσμάτων σύφιλης, όπως π.χ στη Ρωσία (Χατζηβασιλείου 2002).

Τα αντιβιοτικά που συνιστώνται σήμερα ως πρώτη επιλογής για τη θεραπεία όλων των γονοκοκκικών λοιμώξεων είναι οι νεότερες κεφαλοσπορίνες (κεφτριαζόνη, κεφοταξίμη ή κεφιξίμη). Πλεονέκτημα της κεφτριαζόνης έναντι των άλλων κεφαλοσπορινών 3^{ης} γενιάς είναι ότι έχει καλύτερη δράση στη φαρυγγική γονόρροια, ενώ μειονέκτημά της αποτελεί ο τρόπος χορήγησής της (ενδομυϊκή χορήγηση). Εναλλακτικά, επί αλλεργίας στα β-λακταμικά αντιβιοτικά, συνιστώνται οι νεότερες κινολόνες και η σπεκτινομυκίνη. Η σπεκτινομυκίνη είναι η μόνη επιλογή, όταν παράλ-

ληλα με τον κίνδυνο αλλεργίας υπάρχει αντένδειξη και για τις κινολόνες, όπως κύηση, ιστορικό σπασμών ή προέλευση της λοίμωξης από περιοχή με υψηλή συχνότητα αντοχής στις κινολόνες. Η σπεκτινομυκίνη έχει πολύ καλή δράση στις γονοκοκκικές λοιμώξεις ουρήθρας, τραχήλου και ορθού, αλλά περιορισμένη στη φαρυγγική εντόπιση, ενώ και αυτή απαιτεί ενδομυκική χορήγηση.

Παράλληλα με το αντιβιοτικό πρώτης εκλογής, χορηγείται συνήθως και μια τετρακυκλίνη (δοξυκυκλίνη) ή μακρολίδη (αζιθρομυκίνη και σε περίπτωση κύησης, ερυθρομυκίνη) για πιθανή συνυπάρχουσα λοίμωξη από χλαμύδια. Οι μακρολίδες και η τετρακυκλίνη αποτελούν παλαιά αντιγονορροϊκά αντιβιοτικά. Σήμερα, η χρήση τους ως φαρμάκου πρώτης εκλογής για την γονόρροια δεν συνιστάται, γιατί η συχνότητα απομόνωσης ανθεκτικών στελεχών σε αυτά τα αντιβιοτικά είναι πολύ υψηλή. Οι αμινογλυκοσίδες έχουν χρησιμοποιηθεί (και συνεχίζουν να χρησιμοποιούνται σε κάποιες χώρες), λόγω του χαμηλού τους κόστους, αλλά δεν ενδείκνυται λόγω της μη τεκμηριωμένης αποτελεσματικότητας τους ως αντιγονορροϊκών αντιβιοτικών. Η χλωραμφαινικόλη και θειαμφαινικόλη επίσης έχουν κατά καιρούς χρησιμοποιηθεί, αλλά σήμερα δεν συνιστώνται για αντιγονορροϊκή θεραπεία, λόγω της χαμηλής δραστηριότητας τους κατά της *N. gonorrhoeae*, αλλά και λόγω των υψηλών ποσοστών και επιπέδων αντοχής του γονοκόκκου σε αυτές. Η πενικιλίνη G, η οποία υπήρξε το άριστο αντιβιοτικό για τη θεραπεία της γονόρροιας στο παρελθόν, όπως και οι συνδυασμοί πενικιλινών με κλαβουλανικό οξύ, δεν συνιστώνται πλέον για εμπειρική θεραπεία, λόγω της υψηλής συχνότητας, στα περισσότερα μέρη του κόσμου αντοχής στην πενικιλίνη που μπορεί να οφείλεται όχι μόνο στην παραγωγή πενικιλιλίνης, αλλά και σε άλλους μηχανισμούς που δεν αναστέλλονται από το κλαβουλανικό οξύ. Όσον αφορά τις νεότερες κινολόνες, η σιπροφλοξακίνη και η οφλοξακίνη είναι οι ευρύτερα χρησιμοποιούμενες κινολόνες, αλλά στην κλινική πράξη έχουν εφαρμοστεί και η νορφλοξακίνη, λομεφλοξακίνη και ενοξακίνη (Tapsall 2002, CDC 1998).

Τα θεραπευτικά σχήματα που προτείνονται σήμερα για τη θεραπεία της γονόρροιας συνοψίζονται στον Πίνακα 3 (CDC 1998).

Πίνακας 3: Προτεινόμενα θεραπευτικά σχήματα για την εμπειρική αντιμετώπιση της γονόρροιας[@]

Αντιβιοτικό	Δοσολογία
Κεφαλοσπορίνες	
Ceftriaxone	125 mg εφάπαξ, ενδομυϊκώς ή 400 mg per os εφάπαξ
Cefoxitin	
Κινολόνες	
Ciprofloxacin	500 mg per os εφάπαξ ή 400 mg per os εφάπαξ
Ofloxacin	
Εναλλακτικά σχήματα	
Spectinomycin	2g ενδομυϊκώς εφάπαξ
Συνυπάρχουσα λοίμωξη με <i>C. trachomatis</i> (τη επόμενη της αντιγονοκοκκικής θεραπείας)	
Doxycycline	100 mg δις ημερησίως για 7 ημέρες ή 500 mg τετράκις ημερησίως για 7 ημέρες ή 1g per os εφάπαξ
Tetracycline	
Azithromycin	
Erythromycin (επί αντένδειξης στις τετρακυκλίνες)	500 mg δις ημερησίως για 14 ημέρες
Εγκυμοσύνη (Απαγορεύονται τετρακυκλίνες και κινολόνες)	
Cefoxitin ή Ceftriaxone	
Spectinomycin σε ιστορικό αλλεργίας	
Erythromycin (συνυπάρχουσα λοίμωξη με <i>C. trachomatis</i>)	

[@] CDC, 1998

VII. ANTOXH KAI MHXANISMΟΙ ANTOXHΣ ΣΤΑ ANTIBIOTIKA

Ο γονόκοκκος σε σύγκριση με άλλα Gram-αρνητικά βακτήρια είναι ενδογενώς πιο ευαίσθητος σε διάφορους αντιμικροβιακούς παράγοντες όπως στις πενικιλίνες, κεφαλοσπορίνες, τετρακυκλίνες, μακρολίδες, κινολόνες, αμινογλυκοσίδες και ριφαμπικίνη (Ison 1998). Ωστόσο η εκτεταμένη χρήση αντιβιοτικών τις τελευταίες δεκαετίες (κυρίως της πενικιλίνης και της τετρακυκλίνης), οδήγησε στην ανάπτυξη μηχανισμών αντοχής στη *N.gonorrhoeae* και συνεπόμενη μείωση της αποτελεσματικότητας των αντιγονορροϊκών αντιβιοτικών. Σε αυτό συνέβαλε η εξαιρετική ικανότητα του γονόκοκκου για γενετικό ανασυνδυασμό, μέσω του οποίου μπορεί να προσαρμόζεται εύκολα στις μεταβολές του περιβάλλοντός του αναπτύσσοντας νέες ποικιλίες. Από τις γενετικές ιδιότητες του γονόκοκκου η πιο αξιοσημείωτη είναι η ικανότητά του για γενετική μεταμόρφωση στη φύση σε υψηλή συχνότητα. Ο γονόκοκκος είναι από τα ελάχιστα βακτήρια που διαθέτουν φυσική ικανότητα πρόσληψης DNA από το περιβάλλον με γενετική μεταμόρφωση και μπορεί έτσι να αποκτά γενετικό υλικό από φυλογενετικά συγγενείς μικροοργανισμούς και να το ενσωματώνει στο δικό του με ομόλογο γενετικό ανασυνδυασμό.

Η αντοχή της *N.gonorrhoeae* στα διάφορα αντιβιοτικά οφείλεται σε γονίδια αντοχής που εντοπίζονται είτε στο χρωμόσωμα του γονόκοκκου είτε σε πλασμίδια. Η χρωμοσωματική αντοχή του γονόκοκκου οικοδομείται σταδιακά, με τη συνάθροιση και τη μίξη γονιδίων ή με τη συσσώρευση μεταλλαγών στα υπάρχοντα γονίδια. Η πλασμιδιακή αντοχή αποκτάται με μεταφορά πλασμιδίων από άλλα βακτήρια ή από άλλα στελέχη γονόκοκκου, μέσω βακτηριακής σύζευξης.

Οι βασικές κατηγορίες των μηχανισμών που καθορίζονται από τα διάφορα γονίδια αντοχής περιλαμβάνουν: (α) τροποποίηση του κυτταρικού στόχου του αντιβιοτικού, (β) παραγωγή ενζύμων που αποτοξικοποιούν το αντιβιοτικό καταστρέφοντας τη δομή του, (γ) παρεμπόδιση της εισόδου ενός ή περισσότερων αντιβιοτικών στο κύτταρο με μείωση της διαπερατότητας της κυτταρικής μεμβράνης και (δ) απορρύθμιση των αντλιών εκροής (efflux) που ελέγχουν τη συγκέντρωση διαφόρων ουσιών, συμπεριλαμβανομένων και των αντιβιοτικών, μέσα στο κύτταρο του γονόκοκκου. Στο ίδιο στέλεχος μπορούν να συνυπάρχουν περισσότεροι του ενός μηχανισμοί αντοχής, για το ίδιο ή και για διαφορετικά αντιβιοτικά (Τζελέπη 2005).

Το πρώτο αντιβιοτικό που χρησιμοποιήθηκε για τη θεραπεία της γονόρροιας, το 1936, ήταν οι σουλφοναμίδες και, ήδη, το 1944, το ποσοστό των ανθεκτικών στις σουλφοναμίδες στελεχών είχε αυξηθεί σημαντικά και άρχισαν να παρατηρούνται θεραπευτικές αποτυχίες στο ένα-τρίτο των ασθενών. Στο τέλος του Β΄ Παγκοσμίου Πολέμου εισήχθη στην κλινική πράξη η πενικιλίνη ως θεραπεία πρώτης εκλογής για την αντιμετώπιση της γονόρροιας. Από το 1950 μέχρι τα μέσα του 1970, παρατηρήθηκε σταδιακή αύξηση των επιπέδων χρωμοσωματικής αντοχής στην πενικιλίνη, γεγονός που απαιτούσε διαρκώς αυξανόμενες δόσεις προκειμένου να επιτυγχάνεται θεραπευτικό αποτέλεσμα έναντι της γονοκοκκικής λοίμωξης. Το 1976 αναφέρθηκαν, αρχικά στην Άπω Ανατολή και στη Δυτική Αφρική, στελέχη γονοκόκκου με υψηλού επιπέδου αντοχή στην πενικιλίνη (Penicillinase Producing *Neisseria gonorrhoeae*- PPNG), που οφειλόταν στην παραγωγή πλασμιδιακής β-λακταμάσης (πενικιλινάσης). Σχεδόν συγχρόνως, εμφανίσθηκαν στελέχη με χρωμοσωματική αντοχή στην τετρακυκλίνη και στις μακρολίδες, ενώ δέκα χρόνια αργότερα, αναφέρθηκαν και στελέχη με υψηλού επιπέδου πλασμιδιακή αντοχή στην τετρακυκλίνη (Tetracycline Resistant *Neisseria gonorrhoeae*-TRNG). Η αντοχή στην πενικιλίνη, τετρακυκλίνη και ερυθρομυκίνη αντιμετωπίστηκε με χορήγηση σπεκτινομυκίνης και στην συνέχεια κεφτριαξόνης. Το 1987, εμφανίσθηκαν στις Η.Π.Α. στελέχη με χρωμοσωματική αντοχή στη σπεκτινομυκίνη. Ωστόσο, θεραπευτικές αποτυχίες στην αγωγή με σπεκτινομυκίνη έχουν αναφερθεί μόνο σποραδικά, ενώ στην μέγιστη πλειονότητά τους τα στελέχη γονοκόκκου που απομονώνονται σε όλο τον κόσμο παραμένουν έως και σήμερα ευαίσθητα στην δράση της σπεκτινομυκίνης. Στην κεφτριαξόνη, επίσης έχουν εμφανιστεί στελέχη γονοκόκκου με μειωμένη ευαισθησία. Για παράδειγμα, στις Η.Π.Α. τα στελέχη αυτού του τύπου έφθασαν, από 2% το 1991, σε 15% το 1994. Παρόλ'αυτά, όπως και με τη σπεκτινομυκίνη, ο κύριος όγκος των στελεχών *N.gonorrhoeae* που απομονώνονται στα περισσότερα μέρη του κόσμου εξακολουθούν να είναι ευαίσθητα στη δράση των κεφαλοσπορινών 3^{ης} γενιάς.

Στις αρχές της δεκαετίας του 1990, το Κέντρο Ελέγχου Λοιμώξεων των ΗΠΑ (CDC) και ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO) συνέστησαν τις φθοριωμένες κινολόνες και τις κεφαλοσπορίνες 3^{ης} γενιάς ως θεραπεία πρώτης εκλογής για την αντιμετώπιση των γονοκοκκικών λοιμώξεων, λόγω της ευρείας εξάπλωσης ανθεκτικών στελεχών γονοκόκκου με αντοχή στην πενικιλίνη και ή την τετρακυκλίνη (CDC

2002-α). Στη συνέχεια, όμως, άρχισαν να αυξάνονται σημαντικά οι αναφορές για την εμφάνιση στελεχών γονοκόκκου με μειωμένη ευαισθησία ή αντοχή στις νεότερες κινολόνες, ενώ σπάνια αναφέρονται και στελέχη με μειωμένη ευαισθησία ή αντοχή στις κεφαλοσπορίνες (CDC 2007).

ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΗ ΑΝΤΟΧΗ

Πρόκειται για υψηλού επιπέδου αντοχή και αφορά, για την ώρα, μόνο τις πενικιλίνες και τις τετρακυκλίνες.

Η υψηλού επιπέδου πλασμιδιακή αντοχή στην πενικιλίνη σε στελέχη γονοκόκκου αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 1976. Οφείλεται στην παραγωγή μιας TEM-1 τύπου β-λακταμάσης ικανής να υδρολύει τις πενικιλίνες. Τα στελέχη γονοκόκκου που φέρουν πλασμιδιακή αντοχή στην πενικιλίνη είναι γνωστά ως πενικιλινασο-παραγωγά ή, συντομογραφικά, PPNG (Penicillinase Producing *Neisseria gonorrhoeae*) και εκδηλώνουν συνήθως πολύ υψηλά επίπεδα αντοχής, με ελάχιστες ανασταλτικές συγκεντρώσεις (MICs) πενικιλίνης έως και >256 µg/ml (Ison 1998, Dillon & Yeung 1989).

Τα πλασμίδια αντοχής στην πενικιλίνη που έχουν βρεθεί στον γονοκόκκο ανήκουν σε διάφορους τύπους (Πίνακας 4), οι οποίοι διαφέρουν μεταξύ τους σε μοριακό μέγεθος, αλλά όλοι φέρουν γονίδια για την ίδια β-λακταμάση (πενικιλινάση τύπου TEM-1). Τα πλασμίδια αντοχής στην πενικιλίνη δεν είναι τα ίδια συζευκτικά, αλλά μπορούν να μεταφερθούν με βακτηριακή σύζευξη σε άλλα στελέχη, όταν τύχει να συνυπάρχουν με το ενδογενές συζευκτικό πλασμίδιο του γονοκόκκου (24.5 Mda).

Τα πλασμίδια αντοχής στην πενικιλίνη πήραν την ονομασία τους, αφρικανικό και ασιατικό πλασμίδιο, από τη γεωγραφική προέλευση των στελεχών, στα οποία παρατηρήθηκαν για πρώτη φορά (Δυτική Αφρική και Φιλιππίνες, αντίστοιχα). Πολύ σύντομα, τα στελέχη αυτά εξαπλώθηκαν και στις άλλες ηπείρους (Phillips 1976, Ashford et al. 1976).

Σχετικά με την προέλευση των πλασμιδίων αντοχής στην πενικιλίνη που απαντούν στο γονοκόκκο, πιστεύεται ότι έχουν προέλθει από τον αιμόφιλο. Αυτό προκύπτει από τη διαπίστωση ότι φέρουν μια μη μεταθετή περιοχή που παρουσιάζει γενετική ομολογία με τμήμα του τρανσποζονίου *TnA*, το οποίο κωδικοποιεί για την παραγωγή TEM-1 β-λακταμάσης στον αιμόφιλο.

Πίνακας 4: Πλασμίδια που απαντούν στην *Neisseria gonorrhoeae*

Τύπος Πλασμιδίου	Μέγεθος (MDa)	Λειτουργία
<i>Πλασμίδια Αντοχής</i>		
Ασιατικό	4,5	Αντοχή στην Πενικιλίνη με παραγωγή β-λακταμάσης (PPNG στελέχη)
Αφρικανικό	3,2	
Toronto	3,05	
Rio	2,9	
Nimes	4,1	
<i>Ενδογενή Πλασμίδια</i>		
Συζευκτικό	24,5	Βακτηριακή Σύζευξη Μεταφορά άλλων πλασμιδίων
Κρυπτικό	2,6	Άγνωστη

Τα πρώτα PPNG στελέχη με αφρικανικό πλασμίδιο αντοχής εμφάνιζαν αυξοτροφική απαίτηση για αργινίνη (Arg⁻) και ήταν ευαίσθητα σε άλλες κατηγορίες αντιβιοτικών. Αντίθετα, αυτά που έφεραν ασιατικό πλασμίδιο αντοχής ήταν συνήθως πρωτότροφα (Proto) ή αυξότροφα στην προλίνη (Pro⁻) και μετρίως ευαίσθητα σε άλλες κατηγορίες αντιβιοτικών. Αυτές οι παρατηρήσεις υποδηλώνουν ότι τα αρχικά PPNG στελέχη εμφανίστηκαν ως δύο διακριτοί κλώνοι, προερχόμενοι από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές. Στη συνέχεια, εμφανίστηκαν στελέχη με διάφορους συνδυασμούς των παραπάνω χαρακτήρων, πιθανώς λόγω της εξάπλωσης των πλασμιδίων αντοχής ανάμεσα στα στελέχη γονοκόκκου μέσω του συζευκτικού πλασμιδίου. Μέσα στη χρονική περίοδο 1976-1980, οι περισσότερες λοιμώξεις από PPNG στελέχη, τόσο στην Μ. Βρετανία όσο και στις ΗΠΑ, ήταν εισαγόμενες. Έκτοτε παρατηρήθηκε στην Μ. Βρετανία δραματική αύξηση των λοιμώξεων από PPNG στελέχη ενδογενούς προέλευσης, η οποία κορυφώθηκε το 1983 για να μειωθεί ξανά το 1984. Αντίστοιχες αυξητικές τάσεις παρατηρήθηκαν και σε άλλες χώρες της Ευρώπης

και των Η.Π.Α (Easmon & Ison 1987).

Στελέχη με υψηλού επιπέδου πλασμιδιακή αντοχή στην τετρακυκλίνη αναφέρθηκαν για πρώτη φορά το 1985, σχεδόν ταυτόχρονα στις ΗΠΑ και την Ολλανδία. Η αντοχή αυτή διαπιστώθηκε πως οφειλόταν στην παρουσία πλασμιδίων μεγέθους 25.2 Mda, τα οποία έφεραν το υπεύθυνο για την αντοχή στην τετρακυκλίνη γονίδιο *tetM*. Τα στελέχη με υψηλού επιπέδου πλασμιδιακή αντοχή στην τετρακυκλίνη είναι γνωστά ως TRNG (Tetracycline Resistant *Neisseria gonorrhoeae*) και εκδηλώνουν υψηλά επίπεδα αντοχής με ελάχιστες ανασταλτικές συγκεντρώσεις τετρακυκλίνης >4-128μg/ml.

Για την προέλευση του πλασμιδίου Tet-M στο γονόκοκκο έχουν διατυπωθεί δύο θεωρίες. Η πρώτη υποστηρίζει ότι το Tet-M πλασμίδιο προήλθε από το ενδογενές συζευκτικό πλασμίδιο του γονοκόκκου με την ενσωμάτωση σε αυτό του *tetM* γονιδίου από άλλα είδη βακτηρίων. Η δεύτερη θεωρία υποστηρίζει ότι το Tet-M πλασμίδιο έχει ακολουθήσει άλλη εξελικτική πορεία από το ενδογενές συζευκτικό πλασμίδιο (divergent evolution).

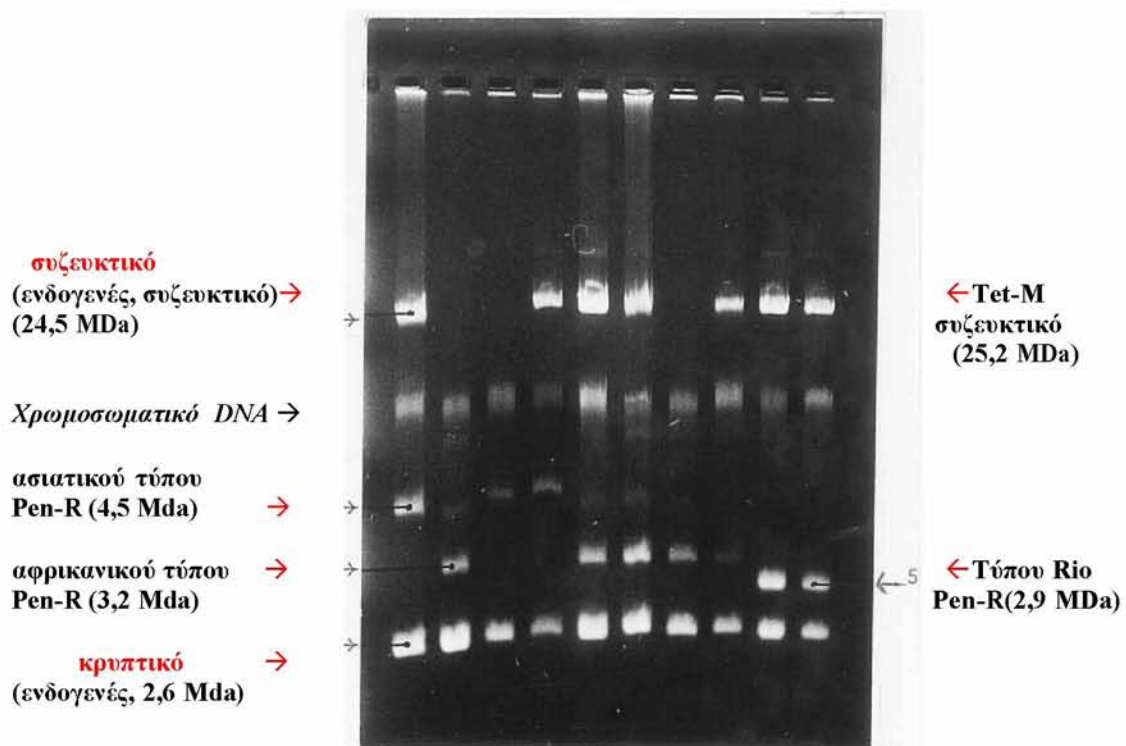
Το γονίδιο *tetM* κωδικοποιεί για την παραγωγή μιας πρωτεΐνης (μεθυλάσης) που προστατεύει το ριβόσωμα από την ανασταλτική δράση της τετρακυκλίνης. Σύμφωνα με τις ενδείξεις, το *tetM* γονίδιο του γονοκόκκου έχει προέλθει από στρεπτόκοκκους και είναι μέρος ενός μεταθετού στοιχείου που απαντά σε πολλά βακτήρια. Τα Tet-M πλασμίδια του γονοκόκκου είναι συζευκτικά και αυτομεταφέρονται με βακτηριακή σύζευξη σε άλλα στελέχη γονοκόκκου ή και άλλων βακτηρίων.

Τα Tet-M πλασμίδια διακρίνονται σε δύο τύπους, τον αμερικανικό και τον ολλανδικό. Το αμερικανικού τύπου πλασμίδιο προσδιορίστηκε αρχικά σε στελέχη γονοκόκκου που απομονώθηκαν στην Μ. Βρετανία και την Ανατολική και Κεντρική Αφρική, ενώ το ολλανδικού τύπου σε στελέχη που απομονώθηκαν στις Κάτω Χώρες και την Ασία. Οι δύο τύποι πλασμιδίων διαφέρουν μεταξύ τους ως προς την εσωτερική αλληλουχία του *tetM* γονιδίου, πράγμα που συνηγορεί με τη θεωρία που υποστηρίζει ότι προήλθαν από διαφορετικές γραμμές εξέλιξης (Roberts et al. 1988, Roberts 1989, NCCLS 1997, Morse et al. 1986, Greco 2003).

Τα TRNG στελέχη έχουν εξαπλωθεί σήμερα σε όλο τον κόσμο και απαντούν σε διαρκώς αυξανόμενες συχνότητες. Στην Ελλάδα εμφανίστηκαν το 1990 και από τότε η συχνότητά τους κυμαίνεται από 2%-10% επί του συνόλου των γονοκόκκων που απομο-

νώνονται κατ' έτος (στοιχεία Εθνικού Κέντρου Αναφοράς Γονοκόκκου).

Οι διάφοροι τύποι πλασμιδίων που απαντούν στο γονόκοκκο παρουσιάζονται στην Εικόνα 6.



Εικόνα 6: Πλασμίδια που απαντούν στον γονόκοκκο (φωτογραφία ΕΚΑΓ)

ΑΝΤΟΧΗ ΟΦΕΙΛΟΜΕΝΗ ΣΕ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΙΚΑ ΓΟΝΙΔΙΑ

Η χρωμοσωματική αντοχή του γονοκόκκου αφορά σχεδόν όλα τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται ή έχουν κατά καιρούς χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία της γονόρροιας: πενικιλίνες, τετρακυκλίνες, μακρολίδες, σπεκτινομυκίνη (σπάνια),

χλωραμφαινικόλη, κινολόνες. Ακόμα και για τις κεφαλοσπορίνες, υπάρχουν αναφορές για στελέχη με μειωμένη ευαισθησία που οφείλεται σε χρωμοσωματικά καθοριζόμενους μηχανισμούς αντοχής.

Η χρωμοσωματική αντοχή οφείλεται σε μεταλλαγές σε γονίδια που εντοπίζονται στο χρωμόσωμα του γονοκόκκου και οικοδομείται σταδιακά με τη συσσώρευση μεταλλαγών στο ίδιο ή σε διαφορετικούς γενετικούς τόπους. Έτσι, αν και συνήθως είναι χαμηλού επιπέδου, μπορεί να φθάσει σε κλινικά σημαντικά επίπεδα που καθιστούν ανενεργά τα αντιβιοτικά έναντι των οποίων αναπτύσσεται.

Ανάλογα με τον υποκείμενο, κατά περίπτωση μηχανισμό, η χρωμοσωματική αντοχή του γονοκόκκου μπορεί να αφορά μία μόνο ομάδα αντιβιοτικών (π.χ. μόνο τις πενικιλίνες ή μόνο τις κινολόνες ή μόνο τη σπεκτινομυκίνη) είτε να συμπεριλαμβάνει συνδυασμούς διαφορετικών αντιβιοτικών (διασταυρούμενη ή πολλαπλή αντοχή). Η αντοχή σε μεμονωμένα αντιβιοτικά οφείλεται σε *ειδικούς* μηχανισμούς, ενώ η πολλαπλή αντοχή μπορεί να οφείλεται είτε στη συνύπαρξη στο ίδιο στέλεχος, περισσότερων του ενός ειδικών μηχανισμών για μεμονωμένα αντιβιοτικά, είτε σε *μη ειδικούς* μηχανισμούς που προσφέρουν στο βακτήριο αντοχή σε πολλά διαφορετικά αντιβιοτικά ταυτόχρονα.

ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

Αντοχή στις πενικιλίνες (πενικιλίνη, αμπικιλίνη, αμοξυκιλίνη)

Οι πενικιλίνες χρησιμοποιήθηκαν ευρύτατα στο παρελθόν για την θεραπευτική αντιμετώπιση της γονόρροιας. Σήμερα, η εμπειρική θεραπεία της γονόρροιας με πενικιλίνες έχει σχεδόν τελείως εγκαταλειφθεί, λόγω της υψηλής συχνότητας απομόνωσης ανθεκτικών στελεχών. Η αντοχή στις πενικιλίνες μπορεί να είναι πλασμιδιακή ή χρωμοσωματική, ενώ σε πολλά στελέχη απαντούν ταυτόχρονα και οι δύο τύποι αντοχής.

Η πλασμιδιακή αντοχή, όπως ήδη αναφέρθηκε παραπάνω, οφείλεται στην παρουσία πλασμιδίων που φέρουν γονίδια υπεύθυνα για την παραγωγή β-λακταμάσης, ικανής να υδρολύει τις πενικιλίνες.

Η χρωμοσωματική αντοχή στην πενικιλίνη οφείλεται σε συσσωρευτικές μεταλλαγές σε πολλαπλούς γενετικούς τόπους του χρωμοσώματος, συγκεκριμένα στα

γονίδια *penA*, *mtr* και *penB*. Το *penA* γονίδιο κωδικοποιεί για την πενικιλλινοδεσμευτική πρωτεΐνη PBP-2 (60 kDa). Η PBP-2 παίζει βασικό ρόλο στη σύνθεση της πεπτιδογλυκάνης και στη διαίρεση του κυττάρου. Η αμινοξική αλληλουχία της PBP-2 παρουσιάζει μεγάλη ομολογία με την αλληλουχία της PBP-3 της *E.coli*. Η βακτηριοκτόνος δράση των β-λακταμικών αντιβιοτικών οφείλεται στην ικανότητά τους να απενεργοποιούν τα πενικιλλινοδεσμευτικά ένζυμα. Στο γονόκοκκο, μία σημειακή μεταλλαγή στο γονίδιο *penA* οδηγεί την σύνθεση τροποποιημένης PBP-2, με ένα υπεράριθμο αμινοξύ (Asp345a). Η τροποποιημένη PBP-2 έχει μειωμένη συγγένεια πρόσδεσης με την πενικιλίνη, με αποτέλεσμα τη μείωση της ευαισθησίας του βακτηρίου στις πενικιλίνες (Brannigan et al. 1990).

Η αύξηση της αντοχής στην πενικιλίνη μπορεί επίσης να οφείλεται σε μεταλλαγές στο *penB* γονίδιο. Το *penB* γονίδιο εμπλέκεται στη σύνθεση της κύριας πρωτεΐνης της εξωτερικής κυτταρικής μεμβράνης του γονοκόκκου, που είναι μια πορίνη. Μεταλλαγές στο γονίδιο αυτό προκαλούν μεταβολές στην διαπερατότητα του κυτταρικού τοιχώματος με αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται η είσοδος των πενικιλινών, αλλά και των τετρακυκλινών στο κύτταρο, με αποτέλεσμα την ανάπτυξη αντοχής στην πενικιλίνη και την τετρακυκλίνη.

Μελέτες έδειξαν ότι οι μεταλλαγές στο *penB* γονίδιο συσχετίζονται με την οροομάδα IB. Στελέχη γονοκόκκου με IB οροτύπους είναι γενικά πιο ανθεκτικά στα αντιβιοτικά σε σχέση με τα στελέχη οροτύπου ομάδας IA (Bygdeman 1984). Για τα στελέχη με χρωμοσωματική αντοχή στην πενικιλίνη και την τετρακυκλίνη έχει κατοχυρωθεί στη διεθνή βιβλιογραφία η συντομογραφία CMRNG (Chromosomally Resistant *N.gonorrhoeae*). Έτσι, για να μην προκαλείται σύγχυση, τα στελέχη που έχουν αντοχή στην πενικιλίνη, ανεξάρτητα από την ύπαρξη ή όχι διασταυρούμενης αντοχής με την τετρακυκλίνη ή άλλα αντιβιοτικά και ανεξάρτητα από τον υποκείμενο μηχανισμό αντοχής, συμβολίζονται ως CMPR (Chromosomally Resistant to Penicillin).

Το γονιδιακό σύστημα *mtr* (οπερόνιο *mtrCDE*) του γονοκόκκου είναι υπεύθυνο για τη λειτουργία μιας μη-ειδικής αντλίας εκροής αντιβιοτικών (multidrug efflux pump). Ο ρόλος των αντλιών αυτού του είδους είναι να ρυθμίζουν τη συγκέντρωση διαφόρων ουσιών μέσα στο βακτηριακό κύτταρο. Μεταλλαγές στο σύστημα *mtr* του γονοκόκκου προκαλούν απορύθμιση της MTR αντλίας εκροής, με αποτέλεσμα το κύτταρο να αποβάλλει ενεργητικά τα αντιβιοτικά στον εξωκυττάριο χώρο, παρεμποδί-

ζοντας έτσι τη δράση τους, με αποτέλεσμα την ανάπτυξη αντοχής (Veal et al. 2002). Η λειτουργία του οπερονίου *mtrCDE* ρυθμίζεται από τον καταστολέα *MtR*. Η σύνδεση του καταστολέα *MtR* στην περιοχή των υποκινητών έχει ως αποτέλεσμα τη μειωμένη έκφραση των γονιδίων *mtrCDE* και τη φυσιολογική ευαισθησία των στελεχών στα αντιβιοτικά. Η αποκαταστολή της έκφρασης του οπερονίου οδηγεί στην ανάπτυξη αντοχής.

Αντοχή στις τετρακυκλίνες

Οι τετρακυκλίνες δεν συνιστώνται γενικώς για την θεραπεία της γονόρροιας, γιατί πρέπει να χορηγούνται σε πολλαπλές δόσεις για αρκετές μέρες, πράγμα που αυξάνει τον κίνδυνο μη ολοκλήρωσης της θεραπευτικής αγωγής από τους ασθενείς. Παρόλα αυτά, λόγω του χαμηλού κόστους, χρησιμοποιούνται, συνήθως άτυπα, σε αρκετές χώρες (Tapsall 2002). Και για τις τετρακυκλίνες ο γονόκοκκος έχει αναπτύξει μηχανισμούς χρωμοσωματικής και πλασμιδιακής αντοχής.

Η πλασμιδιακή αντοχή στην τετρακυκλίνη, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, είναι υψηλού επιπέδου (MIC >4 έως και 128 µg/ml) και οφείλεται στην παρουσία πλασμιδίων αντοχής που φέρουν το *tetM* γονίδιο.

Η χρωμοσωματική αντοχή στις τετρακυκλίνες οφείλεται σε μεταλλαγές στα γονίδια *mtr* και/ή *penB*. Όπως και με τις πενικιλίνες, η χρωμοσωματική αντοχή των γονοκοκκικών στελεχών στις τετρακυκλίνες είναι χαμηλού επιπέδου ή μπορεί και να συνίσταται απλώς σε μειωμένη ή μέτρια ευαισθησία (MIC τετρακυκλίνης 0,25-1 µg/ml). Σταδιακά, με τη συσσώρευση μηχανισμών, φθάνει σε κλινικά σημαντικά επίπεδα (MIC τετρακυκλίνης >1 µg/ml) (Dillon & Yeung 1989, Gill et al. 1988, NCCLS 1997, Veal et al. 2002). Τα στελέχη με χρωμοσωματική αντοχή στην τετρακυκλίνη αναφέρονται συντομογραφικά στην διεθνή βιβλιογραφία ως CMTR (Chromosomally Resistant to Tetracycline).

Αντοχή στις κινολόνες

Στόχος των κινολονών είναι οι βακτηριακές τοποϊσομεράσες, τα ένζυμα που καταλύουν την αλληλομετατροπή των τοποϊσομερών του DNA και είναι απαραίτητα για την διατήρηση του DNA σε μια φυσικοχημικά, σταθερή και βιολογικά, ενεργή κατάσταση (Hooper 1998). Οι τοποϊσομεράσες τύπου II (DNA γυράση και τοποϊσομε-

ράση IV) διασπών και τις δύο αλυσίδες δίκλωνου μορίου DNA, περνούν ένα άλλο μόριο δίκλωνου DNA μέσα από το σημείο διάσπασης και, στη συνέχεια, επανασυνδέουν τα δύο μόρια DNA. Γενικά στα Gram-αρνητικά βακτήρια πρώτος στόχος των κινολονών είναι η DNA γυράση, ενώ στα Gram-θετικά βακτήρια είναι η τοποϊσομεράση IV. Η DNA-γυράση καταλύει την εισαγωγή αρνητικών υπερελικώσεων στο DNA με κατανάλωση ATP κατά τη διάρκεια αντιγραφής του DNA (Maxwell 1999). Η πρωτεΐνη συνδέεται στο μόριο του DNA ως τετραμερές και αποτελείται από την GyrA και GyrB υπομονάδα. Στην *E. coli*, η GyrA υπομονάδα (97 kDa) είναι υπεύθυνη για τη διάσπαση και επανσύνδεση του DNA και είναι αυτή που καθορίζει την αντοχή στις κινολόνες. Η GyrB υπομονάδα (90 kDa) αλληλεπιδρά με την GyrA υπομονάδα και το DNA και έχει δράση ATPάσης. Η τοποϊσομεράση IV καταλύει τον διαχωρισμό των θυγατρικών χρωμοσωμάτων στα θυγατρικά κύτταρα μετά την ολοκλήρωση της αντιγραφής του DNA. Απαντά επίσης ως τετραμερές, αποτελούμενη από τις υπομονάδες ParC και ParE, οι οποίες παρουσιάζουν 30% και 40% ομολογία με τις υπομονάδες GyrA και GyrB, αντίστοιχα. (Hooper 1998).

Στο γονόκοκκο, ο κυριότερος μηχανισμός αντοχής στις νεότερες κινολόνες είναι η παρουσία σημειακών μεταλλαγών στα χρωμοσωματικά γονίδια *gyrA* και *parC*, οι οποίες οδηγούν σε τροποποίηση της δομής της γυράσης A και της τοποϊσομεράσης IV, αντίστοιχα. Τα τροποποιημένα ένζυμα δεν αναγνωρίζονται από το αντιβιοτικό, το οποίο έτσι δεν μπορεί να συνδεθεί με αυτά και να αναστείλει την λειτουργία τους.

Τα γονίδια *gyrA* και *parC* του γονοκόκκου απομονώθηκαν και χαρακτηρίστηκαν το 1994 (Belland et al. 1994). Η GyrA υπομονάδα του γονοκόκκου παρουσιάζει 52% ομολογία με την GyrA υπομονάδα της *E. coli*. Οι μεταλλαγές αντοχής εντοπίζονται σε μια μικρή περιοχή της πρωτεΐνης GyrA (αμινοξικά κατάλοιπα 55-110), η οποία αναφέρεται ως «περιοχή που καθορίζει την αντοχή στις κινολόνες» (Quinolone Resistance Determining Region –QRDR). Αντίστοιχα, η ParC υπομονάδα του γονοκόκκου παρουσιάζει 47% ομολογία με την ParC της *E. coli*, και οι μεταλλαγές στην πρωτεΐνη ParC εντοπίζονται σε μια περιοχή ανάλογη με αυτήν της DNA γυράσης (αμινοξικά κατάλοιπα 66-119). Το ίδιο στέλεχος γονοκόκκου μπορεί να αναπτύξει σταδιακά περισσότερες από μια μεταλλαγές στο γονίδιο *gyrA* και στη συνέχεια στο *parC*, αλλά μέχρι σήμερα δεν έχουν βρεθεί στελέχη με μεταλλαγές μόνο στο *parC* γονίδιο (Degushi et al. 1995, 1996 & 1998, Tanaka et al. 1998a & 1998b, Trees

et al. 1998). Ανάλογα με τον αριθμό μεταλλαγών γυράσης που συσσωρεύονται σε ένα γονοκοκκικό στέλεχος, μπορεί να αυξηθεί το επίπεδο αντοχής του στις νεότερες κινολόνες, ενώ γίνεται απότομα πολύ υψηλό αν προστεθεί έστω και μια μεταλλαγή στο γονίδιο της τοποϊσομεράσης IV. Περισσότερες από μία μεταλλαγές (*gyrA* ή και *parC*) οδηγούν σε πολύ υψηλές τιμές MIC στις νεότερες κινολόνες (MIC σιπροφλοξακίνης=1 έως και >256 µg/ml), ενώ στελέχη με μία μόνο σημειακή μεταλλαγή γυράσης A μπορεί να εκδηλώνουν μέτρια ευαισθησία (MIC σιπροφλοξακίνης 0,125-0,5 µg/ml). Τα στελέχη αυτά αντιμετωπίζονται ως εν δυνάμει ανθεκτικά, γιατί υπάρχουν βάσιμες ενδείξεις ότι μετά την ανάδειξη μιας μεταλλαγής ακολουθούν και άλλες. Τα στελέχη με μέτρια ή υψηλού επιπέδου αντοχή στις νεότερες κινολόνες, εφόσον φέρουν έστω και μια μεταλλαγή γυράσης, αναφέρονται συντομογραφικά στην διεθνή βιβλιογραφία ως QRNG (Quinolone Resistant *N. gonorrhoeae*) (NCCLS 1997).

Τα στελέχη που φέρουν μεταλλαγές γυράσης/τοποϊσομεράσης μπορούν να ανιχνευθούν στο εργαστήριο, με την προσθήκη δίσκου ναλιδιξικού οξέος στο αντιβιογράμμα. Το ναλιδιξικό οξύ είναι η παλαιότερη, μη-φθοριωμένη κινολόνη και αναδεικνύει την παρουσία μηχανισμού αντοχής στις κινολόνες, επειδή η ύπαρξη έστω και μιας μεταλλαγής γυράσης μετατρέπει την ευαισθησία του γονόκοκκου στο ναλιδιξικό οξύ (MIC =0,025µg/ml, διάμετρος ζώνης αναστολής >21mm) σε υψηλού επιπέδου αντοχή (MIC >128 µg/ml, και απουσία ζώνης αναστολής) (Turner et al 1991).

Εκτός από τον μηχανισμό αντοχής μέσω μεταλλαγών γυράσης/τοποϊσομεράσης η *N.gonorrhoeae* μπορεί να εμφανίσει μειωμένη ευαισθησία στις νεότερες κινολόνες και μέσω των μη-ειδικών μηχανισμών που προαναφέρθηκαν (μείωση διαπερατότητας της κυτταρικής μεμβράνης και ενεργοποίηση της MTR αντλίας). Πολλές φορές, στελέχη γονοκόκκου με αντοχή ή μειωμένη ευαισθησία στις νεότερες κινολόνες παρουσιάζουν αυξημένες τιμές MIC και σε άλλες κατηγορίες αντιβιοτικών, όπως είναι η πενικιλίνη, τετρακυκλίνη και οι κεφαλοσπορίνες (Degushi et al. 1997, Tanaka et al. 2000). Είναι πιθανό ότι οι χρωμοσωματικές μεταλλαγές που φέρουν τα στελέχη στα γονίδια *gyrA* και *parC* συνδυάζονται με μεταλλαγές σε άλλους γενετικούς τόπους, όπως στους *penA*, *mtr* και *penB*. Όμως, ο βαθμός συμμετοχής των μη-ειδικών μηχανισμών στην αντοχή του γονόκοκκου στις νεότερες κινολόνες δεν έχει διευκρινιστεί ακόμα.

Από τη δεκαετία του 1990 παρατηρείται αύξηση στις συχνότητες απομόνωσης ανθεκτικών στελεχών στις νεότερες κινολόνες. Στις ΗΠΑ, στελέχη γονοκόκκου με

μειωμένη ευαισθησία στις φθωριωμένες κινολόνες εμφανίζονται με αυξανόμενες συχνότητες, αλλά με εξαίρεση συγκεκριμένες περιοχές όπως π.χ. η Χαβάη, τα ποσοστά αντοχής για το σύνολο των Η.Π.Α. παραμένουν χαμηλά (Iverson 2004, CDC 2004). Στην Αυστραλία, ανθεκτικά στις νεότερες κινολόνες στελέχη που απομονώθηκαν κατά την περίοδο 1995-1997 ήταν ενδημικά και απομονώνονταν από άτομα που ανήκαν σε ομάδες υψηλού κινδύνου. Αντίθετα, από τη Λατινική Αμερική δεν υπάρχουν ως τώρα αναφορές για ανθεκτικά στις κινολόνες στελέχη, ενώ και στην Αφρική δεν είχε μέχρι πρόσφατα αντοχή στις κινολόνες στο γονόκοκκο, πιθανότατα λόγω της μη συστηματικής χρήσης νέων κινολονών στις περιοχές αυτές (Tapsall 2002). Σε πιο πρόσφατες, μεμονωμένες αναφορές, η εμφάνιση στελεχών με μέτρια ευαισθησία στις κινολόνες στη Ρουάντα κατά την χρονική περίοδο 1985-90 αποδόθηκε σε προηγηθείσα χρήση κινολονών για την αντιμετώπιση διαρροϊκών διαταραχών (Moodley et al. 2004).

Στην Ευρώπη, η αντοχή του γονοκόκκου στις νεότερες κινολόνες έχει κάνει την εμφάνισή της σε πολλές χώρες, ήδη από τις αρχές της δεκαετίας του '90. Τα ανθεκτικά στις κινολόνες στελέχη έχουν προέλευση κυρίως από χώρες της Άπω Ανατολής. Στην Αγγλία, στελέχη με μειωμένη ευαισθησία στις κινολόνες εμφανίστηκαν το 1989, αλλά τότε μόνον το 2,4% των στελεχών παρουσίαζαν τιμές MIC σιπροφλοξακίνης $>0,016$ $\mu\text{g/ml}$, ενώ τα ανθεκτικά στελέχη απαντούσαν σε ποσοστό $<2\%$ (Tapsall 2001).

Στην Ελλάδα, το πρώτο ανθεκτικό στις νεότερες κινολόνες στέλεχος γονοκόκκου, με MIC σιπροφλοξακίνης $0,5$ $\mu\text{g/ml}$, απομονώθηκε το 1990 και προερχόταν από τις Φιλιπίνες. Κατά το χρονικό διάστημα από 1991 έως 1998, απομονώνονταν στελέχη με ελαφρά μειωμένη ευαισθησία στην σιπροφλοξακίνη, η οποία συνδυαζόταν με χαμηλού επιπέδου αντοχή στην πενικιλίνη, τετρακυκλίνη, χλωραμφαινικόλη και ερυθρομυκίνη. Η μείωση της ευαισθησίας εκείνων των στελεχών στις κινολόνες, όσο και στα λοιπά αντιβιοτικά, αποδόθηκε σε μη-ειδικούς μηχανισμούς (Tzelepi et al. 1997, Mavroidi et al. 2001). Παράλληλα, κατά την περίοδο 1996-1999, απομονώθηκαν ανθεκτικά στο ναλιδιξικό οξύ στελέχη, που όμως είχαν τιμές MIC για τις νεότερες κινολόνες κάτω από το όριο ευαισθησίας ή, το πολύ, στην περιοχή της μέτριας ευαισθησίας. Τα στελέχη αυτά, τα οποία αποδείχθηκε ότι συνιστούσαν ενδημικό κλώνο, όφειλαν τη μείωση της ευαισθησίας τους στις κινολόνες σε μία μεταλλαγή γυράσης (Mavroidi et al. 2000).

Αντοχή στην σπεκτινομυκίνη

Η αντοχή του γονοκόκκου στην σπεκτινομυκίνη οφείλεται στην παρουσία χρωμοσωματικών μεταλλαγών που τροποποιούν την δομή της 30S υπομονάδας του ριβοσώματος, που είναι ο στόχος της σπεκτινομυκίνης (Maness et al. 1974, Galimand et al. 2000). Η αντοχή του γονοκόκκου στη σπεκτινομυκίνη είναι υψηλού επιπέδου (MIC >64μg/ml).

Ανθεκτικά στην σπεκτινομυκίνη στελέχη γονοκόκκου έχουν κατά καιρούς αναφερθεί σε διάφορες γεωγραφικές περιοχές (Tapsall 2001 & 2002). Σε γενικές γραμμές, όμως, η αντοχή του γονοκόκκου στη σπεκτινομυκίνη είναι σπάνια και σποραδική και δεν έχει ως τώρα δημιουργήσει προβλήματα.

Σποραδική αντοχή στη σπεκτινομυκίνη έχει αναφερθεί στην Κορέα, κατά την δεκαετία του '80, και επίσης στο Βιετνάμ, Αυστραλία, Νέα Γουϊνέα μεταξύ των ετών 1992-1998. Το 1995, στις αναφορές του προγράμματος GASP στις ΗΠΑ αναφέρθηκαν μεμονωμένα περιστατικά γονοκοκκικών λοιμώξεων από στελέχη με αντοχή στην σπεκτινομυκίνη, αλλά το 1996 όλα τα στελέχη που εξετάστηκαν ήταν ευαίσθητα (Tapsall 2001).

Αντοχή στις μακρολίδες

Από τις μακρολίδες, μόνον η ερυθρομυκίνη και η αζιθρομυκίνη έχουν εμπλακεί στη θεραπεία της γονόρροιας. Ο συχνότερος μηχανισμός αντοχής της *N.gonorrhoeae* στις μακρολίδες είναι η αποκαταστολή της μη ειδικής MTR αντλίας (Zarantonelli et al. 1999). Πιο πρόσφατα, περιγράφηκαν δύο νέοι μηχανισμοί οι οποίοι ευθύνονται για υψηλού επιπέδου αντοχή στις μακρολίδες (MIC ερυθρομυκίνης έως και >64μg/ml). Ο ένας από αυτούς οφείλεται στην απόκτηση γονιδίων *erm* (erythromycin methylase genes) που κωδικοποιούν για μία μεθυλάση που προστατεύει την 23S υπομονάδα του ριβοσώματος από την δράση των μακρολιδών. Ο δεύτερος μηχανισμός οφείλεται στην απόκτηση γονιδίων *mef* (macrolide efflux) που ενεργοποιούν μια ειδική για τις μακρολίδες αντλία εκροής, η οποία απομακρύνει τις μακρολίδες από το κύτταρο. Τόσο τα *erm* γονίδια, όσο και τα *mef* γονίδια φέρονται σε συζευκτικά τρανσποζόνια, τα οποία μπορούν να μετακινούνται μόνα τους κατά την βακτηριακή σύζευξη, χωρίς να εξαρτώνται από πλασμίδια-φορείς (Roberts et al. 1999).

Μειωμένη ευαισθησία στις κεφαλοσπορίνες

Ο γονόκοκκος είναι ευαίσθητος στις κεφαλοσπορίνες. Μειωμένη ευαισθησία και/ή χαμηλού επιπέδου αντοχή έχει αναφερθεί σπάνια, και αφορά συνήθως κεφαλοσπορίνες 1^{ης} και 2^{ης} γενιάς. Σε μια μελέτη επί 135 γονοκόκκων που απομονώθηκαν το 1992 από αμερικανούς στρατιώτες στις Φιλιππίνες, περισσότερα από 10% των στελεχών ήταν ανθεκτικά στην κεφουροξίμη και κεφοξιτίμη, ενώ ήταν ευαίσθητα στην κεφτριαξόνη και κεφποδοξίμη (Tapsall 2001). Για τις νεότερες κεφαλοσπορίνες, συμπεριλαμβανομένης και της κεφτριαξόνης, υπάρχουν επίσης λίγες αναφορές για προοδευτική, με το χρόνο, μείωση της ευαισθησίας των στελεχών που απομονώνονται σε ορισμένες γεωγραφικές περιοχές, π.χ. στο Δυτικό Ειρηνικό (Scwebke et al. 1995, WHO WPR Gon Surv Pr 2001). Επιπλέον, δύο πρόσφατες μελέτες από την Ιαπωνία αναφέρουν, η μεν πρώτη την επιδημική διασπορά ανθεκτικών στις κεφαμυκίνες γονοκόκκων με μειωμένη ευαισθησία και στην κεφτριαξόνη (Akasaka et al. 2001) και η δεύτερη την απομόνωση στελεχών με μειωμένη ευαισθησία στην κεφιξίμη (Ameyama et al. 2002).

Η μείωση της ευαισθησίας στις κεφαλοσπορίνες αποδίδεται στους ίδιους μηχανισμούς που ευθύνονται για την χαμηλού επιπέδου χρωμοσωματική αντοχή στις πενικιλίνες, κυρίως σε τροποποίηση των PBPs. Οι κεφαλοσπορίνες, ακόμα και της ίδιας γενιάς, εμφανίζουν διαφορετικές συγγένειες με τις PBPs, με αποτέλεσμα να διαφοροποιείται και η δραστηριότητά τους.

Αν και οι αναφορές για μειωμένη ευαισθησία ή αντοχή στις κεφαλοσπορίνες παραμένουν σπάνιες ως σήμερα, η ανάπτυξη αντοχής του γονοκόκκου στις κεφαλοσπορίνες, ιδιαίτερα στις παλαιότερες, είναι ως ένα βαθμό αναμενόμενη, ιδιαίτερα στις περιοχές όπου ενδημούν στελέχη γονοκόκκου με χρωμοσωματική αντοχή στις πενικιλίνες. Στην Ελλάδα, οι κεφαλοσπορίνες τρίτης γενεάς διατηρούν την *in vitro* δραστηριότητά τους έναντι όλων των στελεχών που έχουν εξεταστεί από το 1986 έως σήμερα, παρόλο που κατά την ίδια χρονική περίοδο έχουν παρατηρηθεί, περιστασιακά, υψηλές συχνότητες χρωμοσωματικής αντοχής στην πενικιλίνη (Tzelepi et al. 1991 & 1997, Stathi et al. 2006).

Πολλαπλή και διασταυρούμενη αντοχή στα αντιβιοτικά

Ένα συχνό χαρακτηριστικό των ανθεκτικών στελεχών γονοκόκκου είναι η πολλαπλή αντοχή σε περισσότερες από μια ομάδες αντιβιοτικών. Οφείλεται είτε στην συγκέντρωση, στο ίδιο στέλεχος, διακριτών μηχανισμών για διάφορα αντιβιοτικά, είτε στην ενεργοποίηση μη ειδικών μηχανισμών (αποκαταστολή MTR-αντλίας εκροής και/ή μεταβολές στη διαπερατότητα του κυτταρικού τοιχώματος) που ευθύνονται για διασταυρούμενη αντοχή σε πολλά αντιβιοτικά ταυτόχρονα. Πολυανθεκτικά στελέχη απομονώνονται σε πολλά μέρη του κόσμου, καθώς επίσης και στην Ελλάδα (Manvolidi et.al. 2001, Tzelepi et al. 1997), και αποτελούν σημαντικό πρόβλημα στην θεραπευτική αντιμετώπιση της γονόρροιας, περιορίζοντας σε μεγάλο βαθμό τις θεραπευτικές επιλογές. Για παράδειγμα, ο συνδυασμός αμπικιλλίνης με κλαβουλανικό οξύ δεν είναι αποτελεσματικός σε PPNG στελέχη που ταυτόχρονα υποκρύπτουν και χρωμοσωματική αντοχή στις πενικιλλίνες.

VIII. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΓΟΝΟΡΡΟΙΑΣ

Η γονόρροια είναι νόσημα με παγκόσμια διασπορά και παραμένει και σήμερα το δεύτερο σε συχνότητα (μετά τις χλαμυδιακές λοιμώξεις) από τα σεξουαλικά μεταδιδόμενα νοσήματα (ΣΜΝ) βακτηριακής αιτιολογίας. Οι αναφορές για την αύξηση στην επίπτωση της γονόρροιας από τις αρχές της δεκαετίας του 1960 έως την δεκαετία του 1980 ενίσχυσαν την ανάγκη για την βελτίωση των συστημάτων δήλωσης, καταγραφής και επιδημιολογικής επεξεργασίας των περιστατικών γονόρροιας. Οι παράγοντες που καθορίζουν την επιδημιολογία της γονόρροιας περιλαμβάνουν μια μεγάλη ποικιλία δημογραφικών, κοινωνικών, κλινικών και βιολογικών μεταβλητών και γι' αυτό το λόγο η μελέτη της επιδημιολογίας της γονόρροιας είναι περίπλοκη (Rothenberg 1983). Η γονόρροια αναφέρεται από πολλούς συγγραφείς με το χαρακτηρισμό «κοινωνική νόσος», επειδή επικρατεί ανομοιόμορφα στους πληθυσμούς, με διάφορους δημογραφικούς και κοινωνικούς παράγοντες να καθορίζουν ποιά άτομα είναι πιθανότερο να προσβληθούν. Οι κλινικές εκδηλώσεις της γονόρροιας ποικίλουν ανάλογα με το φύλο, την ηλικία, τη φυλή και τις σεξουαλικές συνήθειες των ασθενών, καθώς και με την μολυσματικότητα των στελεχών γονοκόκκου. Οι συνέπειες των επιπλοκών της γονόρροιας (στείρωση, έκτοπη κύηση, λοιμώξεις του γεννητικού συστήματος στις γυναίκες λοιμώξεις κατά τον τοκετό και τύφλωση στα νεογνά) παρατηρούνται πιο συχνά στις αναπτυσσόμενες χώρες.

Επιδημιολογική παρακολούθηση της αντοχής στη *N. gonorrhoeae*

Ο γονόκοκκος έχει επιδείξει εξαιρετική προσαρμοστικότητα στην εξελικτική πίεση που ασκείται από τις ιατρικές παρεμβάσεις τα τελευταία 40 χρόνια. Η προσαρμοστικότητα του γονόκοκκου επιβάλλει τη συστηματική επιδημιολογική παρακολούθηση των μικροβιολογικών χαρακτηριστικών της γονόρροιας –και κυρίως της αντοχής του γονοκόκκου στα αντιβιοτικά– ως το πρώτο και κύριο μέτρο ελέγχου της γονόρροιας. Οι μελέτες που αφορούν τη δυναμική της προσαρμοστικότητας των στελεχών γονοκόκκου, καθώς και την επιδημιολογία και τον έλεγχο της γονόρροιας, προϋποθέτουν τη συνεργασία επιδημιολόγων και εργαστηριακών ιατρών (Barnes & Holmes 1984).

Η επιδημιολογική παρακολούθηση της αντοχής έχει κρίσιμη βαρύτητα, γιατί σε

αυτή βασίζεται συνήθως η εμπειρική θεραπεία που χορηγείται στους ασθενείς με έκδηλα συμπτώματα γονόρροιας. Σε επίπεδο οργάνωσης, τα συστήματα επιδημιολογικής παρακολούθησης της αντοχής που εφαρμόζονται σε διάφορες χώρες διακρίνονται σε γενικευμένα (*universal*), που διοργανώνονται και διεξάγονται με κρατική ευθύνη σε ολόκληρη τη χώρα, και σε αυτά που βασίζονται σε μελέτες-φρουρούς (*sentinel studies*) που γίνονται σε αντιπροσωπευτικά δείγματα στελεχών γονοκόκκου. Οι μελέτες αυτές ανατίθενται συνήθως σε Κέντρα Αναφοράς ή επιλεγμένα εργαστήρια, τα οποία αναλαμβάνουν να συγκεντρώνουν τα απαραίτητα δεδομένα σε τακτά χρονικά διαστήματα.

Η σημασία της επιδημιολογικής παρακολούθησης της αντοχής έγκειται στο ότι φαινότυποι αντοχής των στελεχών γονοκόκκου μπορούν να μεταβάλλονται γρήγορα σε μία δεδομένη κοινότητα και εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από τους τύπους των στελεχών που κυκλοφορούν στον συγκεκριμένο τόπο και χρόνο. Αυτό με τη σειρά του εξαρτάται απόλυτα από τους επιδημιολογικούς (νοσολογικούς και δημογραφικούς) παράγοντες που επηρεάζουν τη διασπορά της γονόρροιας παγκόσμια και τοπικά (Lowndes et al. 2004).

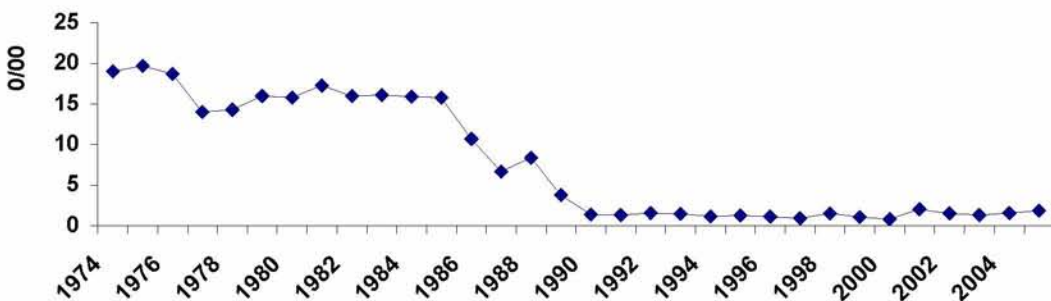
Στην Ελλάδα, η επιδημιολογική παρακολούθηση της αντοχής της *N.gonorrhoeae* διεξάγεται συστηματικά στο Εθνικό Κέντρο Αναφοράς για το Γονόκοκκο (ΕΚΑΓ), το οποίο λειτουργεί υπό αυτήν την ιδιότητα στο Εργαστήριο Βακτηριολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ από το 1987. Οι μελέτες του ΕΚΑΓ βασίζονται σε νοσοκομειακά δεδομένα για τη γονόρροια και στη συστηματική διερεύνηση στελεχών που παρέχονται από τα νοσοκομεία της χώρας.

Παγκόσμια Επίπτωση και Γεωγραφική Κατανομή της Γονόρροιας

Η επίπτωση της γονόρροιας ήταν χαμηλή κατά την διάρκεια του Β΄ Παγκοσμίου Πολέμου μέχρι τις αρχές του 1950, λόγω της χρήσης της πενικιλίνης (van Duynhoven 1999). Κατά την περίοδο 1960-1970 παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση στη συχνότητα της γονόρροιας, η οποία αποδόθηκε σε θεραπευτικές αποτυχίες εξαιτίας της εμφάνισης ανθεκτικών στελεχών στα αντιβιοτικά, σε μεταβολές σεξουαλικής συμπεριφοράς (π.χ. λήψη αντισυλληπτικών), καθώς και σε αύξηση στις μετακινήσεις των πληθυσμών (ανάπτυξη τουρισμού, μεταναστευτικά κύματα).

Κατά τη δεκαετία του 1980, η επίπτωση της γονόρροιας μειώθηκε δραματικά. Η

μείωση αυτή συνέβη σχεδόν ταυτόχρονα σε μεγάλο μέρος του ανεπτυγμένου κόσμου, συγκεκριμένα στη Β.Αμερική, την Ευρώπη και την Αυστραλία, και αποδόθηκε στην εμφάνιση και εξάπλωση του AIDS και στις μεταβολές στη σεξουαλική συμπεριφορά του πληθυσμού, λόγω του φόβου που ακολούθησε την θανάσιμη αυτή νόσο και των προληπτικών μέτρων που πάρθηκαν για την αποφυγή της (Tapsall 2002, Carne et al. 1987, van de Laar et al. 1990, Aust Surv Gon Pr 1988). Η ελάττωση στην επίπτωση της γονόρροιας εκδηλώθηκε και στην Ελλάδα, το 1986 (Εικόνα 7) (Κυριακίς et al. 1999).



Εικόνα 7: Επίπτωση της γονόρροιας στην Ελλάδα κατά την περίοδο 1974-2005

(περιστατικά ‰ του πληθυσμού που εξετάστηκε στο Νοσοκομείο

«Ανδρέας Συγγρός» (Κυριακίς et al. 1999 και αδημοσίευτα στοιχεία ΕΚΑΓ)

Η ελάττωση στην επίπτωση της γονόρροιας δεν υπήρξε αρκετή, ώστε να μειώσει τη σημασία της νόσου και αυτό οφείλεται στο ότι δεν συμπεριέλαβε τις ανεπτυγμένες χώρες, ενώ και στις προηγμένες Δυτικές χώρες δεν αφορούσε εξίσου όλες τις ομάδες του πληθυσμού. Η γεωγραφική και πληθυσμιακή κατανομή της γονόρροιας ήταν και παραμένει άνιση. Χαρακτηριστικά, οι χώρες που πλήττονται περισσότερο (Αφρική, Ν.&Ν.Α Ασία, Καραϊβική, Λατινική Αμερική) έχουν τουλάχιστον δεκαπλάσια επίπτωση από τις προηγμένες Δυτικές χώρες (Potterat et al. 1985).

Έτσι, σύμφωνα με μία σχετικά πρόσφατη εκτίμηση της WHO, η συνολική επίπτωση της γονόρροιας, σε παγκόσμια κλίμακα παραμένει υψηλή –62.000.000 νέα περιστατικά ετησίως (WHO 2001). Στις ΗΠΑ, που έχουν αναπτύξει άρτιο σύστημα καταγραφής, η ετήσια επίπτωση μειώθηκε κατά 74% μεταξύ 1975 και 1997, αλλά

αυξήθηκε και πάλι το 1998 σε (132,9 ανά 100.000 πληθυσμού) (Fox et al. 1998). Χαρακτηριστικά, στις γυναίκες παρατηρήθηκε αύξηση κατά 10,5% (από 119,2 το 1997 στο 131,7 το 1998). Από το 1998 μέχρι το 2002 παρατηρήθηκε μια αργή πτωτική τάση στη συχνότητα της νόσου. Η μέγιστη επίπτωση παρατηρήθηκε στις γυναίκες ηλικιών 15-19 ετών και στους άνδρες μεταξύ 20-24 ετών. Το 2002, μερικές πληθυσμιακές ομάδες παρουσίασαν αύξηση στην επίπτωση της γονόρροιας, όπως Ινδιάνοι και γηγενείς της Αλάσκας και Ισπανόφωνοι. Παράλληλα, στα νησιά Ασίας και Ειρηνικού παρατηρήθηκε μείωση. Στους Αφροαμερικανούς, η επίπτωση της γονόρροιας το 2001 ήταν 29 φορές υψηλότερη από ότι στους λευκούς (CDC 2002a).

Στην Ευρώπη, οι πτωτικές τάσεις στην επίπτωση της γονόρροιας ξεκίνησαν κατά την δεκαετία του 1970 και κορυφώθηκαν σημαντικά μετά το 1985. Οι ίδιες πτωτικές τάσεις συνεχίστηκαν και τα πρώτα έτη της δεκαετίας του 1990 και, συγκεκριμένα, έφθασαν στο χαμηλότερο επίπεδο το 1995. Κατά τη χρονική περίοδο 1990-95 παρατηρείται ταυτόχρονη μείωση στην επίπτωση της γονόρροιας σε όλες τις χώρες της Ευρώπης. Παρόλ' αυτά, από το τέλος της δεκαετίας του '90, άρχισαν να αυξάνονται βαθμιαία τα περιστατικά γονόρροιας. Στο Βέλγιο παρατηρείται σταθερή αύξηση της επίπτωσης από το 1997. Στην Αγγλία, οι διαγνώσεις γονόρροιας διπλασιάστηκαν μεταξύ 1996-2000, ενώ το 40% των διαγνώσεων μεταξύ γυναικών αφορούσε ηλικίες κάτω των 20 ετών. Το Γαλλικό Δίκτυο Επαγρύπνησης (RENAGO) ανέφερε σχεδόν διπλασιασμό των ασθενών το διάστημα 1997-98, που ανέτρεψε την πτωτική τάση που επικρατούσε από το 1987. Στην Ιρλανδία, παρατηρήθηκε αύξηση 320% των περιπτώσεων που γνωστοποιήθηκαν στις αρμόδιες υπηρεσίες μεταξύ 1996-2001. Στην Αυστρία, παρατηρήθηκε 240% αύξηση των κρουσμάτων μεταξύ 2000-2002, παράλληλα στους άνδρες και τις γυναίκες. Οι παραπάνω εντυπωσιακές αυξητικές τάσεις δεν αφορούν ωστόσο όλες τις ευρωπαϊκές χώρες. Συγκεκριμένα, στην Νορβηγία η επίπτωση της γονόρροιας σημείωσε μικρή μόνο αύξηση κατά τη διετία 1995-96 και έκτοτε παραμένει σταθερή. Στην Σουηδία, η αύξηση των κρουσμάτων που σημειώθηκε μεταξύ 1997-2000 ανατράπηκε το 2001, με μείωση που κράτησε τρία χρόνια, ενώ από το 2003 ξανάρχισε ανοδική πορεία. Στην Ισπανία παρατηρείται συνεχής πτωτική τάση από το 1993 μέχρι το 1999 (de Schrijver 2000).

Η αυξημένη επίπτωση της γονόρροιας που παρατηρήθηκε στις ΗΠΑ την διετία 1998-99 θεωρήθηκε ότι οφειλόταν στην αύξηση στην επίπτωση της γονόρροιας που

θεωρήθηκε ότι οφειλόταν στην αύξηση της συχνότητας της νόσου μεταξύ της ομάδας των ομοφυλοφίλων ανδρών (MSM). Σε πολλές ευρωπαϊκές χώρες, τα νέα περιστατικά αφορούν πληθυσμιακές υποομάδες με ιδιαίτερα χαρακτηριστικά (περιθωριακός χαρακτήρας, επικίνδυνη σεξουαλική συμπεριφορά) που χαρακτηρίζονται ως «ομάδες-πυρήνες» (core groups), με την έννοια ότι εξακολουθούν και σε περιόδους χαμηλής επίπτωσης να αποτελούν εστίες συντήρησης και διασποράς της νόσου.

Σεξουαλική Συμπεριφορά και Μεταδοτικότητα της Γονόρροιας

Οι μεταβολές σεξουαλικής συμπεριφοράς μέσα σε ένα πληθυσμό επηρεάζουν την εξάπλωση των ΣΜΝ. Αρκετές μελέτες επιβεβαιώνουν την ποσοτική συσχέτιση μεταξύ της συχνότητας έκθεσης και της πιθανότητας μόλυνσης. Γενικά οι γυναίκες είναι πιο ευαίσθητες στη μόλυνση κατά τη διάρκεια της σεξουαλικής επαφής σε σχέση με τους άνδρες και η γονόρροια είναι συχνότερη στους συντρόφους ανδρών με επικίνδυνη σεξουαλική συμπεριφορά. Ωστόσο, η γονόρροια καταγράφεται συχνότερα στους άνδρες, και αυτό οφείλεται στο ότι οι άνδρες παρουσιάζουν συντομότερα εμφανή συμπτώματα σε σχέση με τις γυναίκες και συγκροτούν τις περισσότερες από τις ομάδες υψηλού κινδύνου. Επίσης, στους άνδρες οι ενοχλήσεις στο ουρογεννητικό σύστημα αποτελούν ένδειξη μόλυνσης με γονόκοκκο, ενώ στις γυναίκες δεν ισχύει το ίδιο. Για τη διάδοση της γονόρροιας ευθύνονται ασυμπτωματικοί φορείς και των δύο φύλων, οι οποίοι εξακολουθούν να είναι σεξουαλικά ενεργοί και αφού μολυνθούν, με αποτέλεσμα να διασπείρουν τη νόσο. Οι ιερόδουλες, οι χρήστες ναρκωτικών ουσιών, οι ομοφυλόφιλοι άνδρες και άτομα που προσβάλλονται περισσότερο από μια φορά από τη νόσο (disease repeaters) συνιστούν τις πιο συχνές εστίες μετάδοσης. Η επαναλαμβανόμενη έκθεση προκαλεί σημαντική αύξηση στην επίπτωση των ΣΜΝ, και αυξάνει την πιθανότητα λοίμωξης ακόμα και σε άτομα που δεν χαρακτηρίζονται κατά τα άλλα ως «επικίνδυνης σεξουαλικής συμπεριφοράς» (Tapsall 2001).

Πληθυσμιακές Ομάδες Υψηλού Κινδύνου

Η ποικιλομορφία στη μολυσματικότητα και στη διασπορά των στελεχών γονοκόκκου που διακινούνται στις πληθυσμιακές ομάδες υψηλού κινδύνου επηρεάζουν τα χαρακτηριστικά της νόσου και συμβάλλουν τόσο στις κλινικές εκδηλώσεις, όσο και στη μετάδοση της γονόρροιας. Ο ορισμός της «ομάδας υψηλού κινδύνου» αποτελεί

θεμελιώδη έννοια στην επιδημιολογία των ΣΜΝ και επι της ουσίας, ταυτίζεται με τον όρο ομάδα-πυρήνας. Ως ομάδα-πυρήνας χαρακτηρίζεται μια κλειστή πληθυσμιακή ομάδα, η οποία, σε συγκεκριμένο τόπο και χρόνο, συγκεντρώνει τις επιδημιολογικές εκείνες παραμέτρους (δημογραφικές, κοινωνικο-οικονομικές και ατομικής σεξουαλικής συμπεριφοράς) που είναι οι καταλληλότερες για προσβολή από τη νόσο και τη διασπορά της στη συνέχεια. Η ομάδα-πυρήνας περιλαμβάνει συνήθως άτομα χαμηλού κοινωνικο-οικονομικού ή μορφωτικού επιπέδου με προκλητική σεξουαλική συμπεριφορά (εναλλαγές ερωτικών συντρόφων και επανειλημμένες προσβολές). Η αδιαφορία για θεραπευτική αντιμετώπιση και η μη συνεπής χρήση προφυλακτικού είναι στοιχεία σεξουαλικής συμπεριφοράς που παρατείνουν και επεκτείνουν την μολυσματικότητα. Η επικίνδυνη σεξουαλική συμπεριφορά διευκολύνει την ταχεία διασπορά της νόσου, η οποία τις περισσότερες φορές περιορίζεται, αλλά και συντηρείται, στα μέλη της συγκεκριμένης ομάδας. Ο επιπολασμός της νόσου εντός του core group είναι δυσανάλογα πολλαπλάσιος έναντι του γενικού πληθυσμού. Επιπλέον, οι ομάδες υψηλού κινδύνου αποτελούν συνήθως εστίες, στις οποίες διακινούνται ανθεκτικοί στα αντιβιοτικά τύποι γονοκόκκου, πράγμα που υποδηλώνει ότι η ανάκαμψη της νόσου που αναμένεται από τις εστίες αυτές θα είναι σε επιθετικότερες μορφές που θα είναι δυσκολότερο να αντιμετωπιστούν θεραπευτικά.

Σε ομάδες με παρόμοια χαρακτηριστικά (ηλικία, φύλο, φυλή, σεξουαλική προτίμηση, συγκεκριμένη γεωγραφική κατανομή), η νόσος μπορεί να παρουσιάζει μικροεπιδημική και ενδημική μετάδοση. Αυτό, μπορεί να αντανακλάται σε αύξηση της ομοιογένειας των στελεχών γονοκόκκου που απομονώνονται στο σύνολο του πληθυσμού και οφείλεται σε κλωνική διασπορά στελεχών συγκεκριμένων τύπων. Σημαντικός είναι επίσης ο ρόλος ατόμων που έχουν παράλληλα σεξουαλικές επαφές με άτομα των core groups και με άτομα του γενικού πληθυσμού. Τα άτομα αυτά συνιστούν τις ομάδες-γέφυρες (bridge populations).

Ιδιαίτερα για τις ομάδες που χαρακτηρίζονται ως ομάδες πυρήνες θεωρείται ότι ισχύει η εξίσωση:

$$R_0 = \beta D c$$

Όπου R_0 , η αναπαραγωγική τάση της νόσου, β , η μέση πιθανότητα μετάδοσης, D , η μέση διάρκεια μολυσματικότητας και c , ο αριθμός των συντρόφων στη μονάδα του χρόνου. Όταν $R_0=1$, η νόσος έχει ενδημικά χαρακτηριστικά και η επίπτωση είναι

Εισαγωγή

σταθερή. Τιμές μεγαλύτερες ή μικρότερες της μονάδας υποδηλώνουν αύξηση ή μείωση της επίπτωσης αντίστοιχα. Για παράδειγμα, αν η μέση διάρκεια μολυσματικότητας D είναι 0,5 χρόνια και η μέση πιθανότητα μετάδοσης $\beta=0,5$, αυτό σημαίνει ότι ο αριθμός των συντρόφων (c) είναι 4 ανά έτος. Οι παράμετροι β και D επηρεάζονται ταυτόχρονα από την δραστηριότητα της θεραπευτικής αγωγής. Στην αδιάγνωστη γονόρροια, η παράμετρος D έχει υπολογιστεί ότι φθάνει τους 6 μήνες. Η μέση πιθανότητα μετάδοσης β εξαρτάται από τη διασπορά στελεχών συγκεκριμένων τύπων (Tapsall 2001, Liljeros et al. 2003, Κυριάκης 2005).

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

ΣΚΟΠΟΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή έχει στόχο να συμβάλει στην επιδημιολογική επιτήρηση της γονόρροιας που διεξάγεται σε συνεχή βάση στην Ελλάδα στο Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Γονοκόκκου. Η συμβολή έγκειται κυρίως στην καταγραφή της ευαισθησίας της *Neisseria gonorrhoeae* στα αντιβιοτικά κατά την πενταετία 1998–2002 και το χαρακτηρισμό των ανθεκτικών στελεχών γονοκόκκου που απομονώθηκαν στην ελληνική κοινότητα κατά τη χρονική αυτή περίοδο. Επιπλέον καταγράφηκαν οι ετήσιες τιμές επίπτωσης της γονόρροιας κατά την περίοδο που μελετήθηκε και έγινε προσπάθεια αποτίμησης των επιδημιολογικών χαρακτηριστικών του πληθυσμού που νόσησε από γονόρροια κατά την υπό μελέτη περίοδο.

Συνοπτικά, κατά την υπό μελέτη περίοδο συνελέγησαν στο Κέντρο Αναφοράς 526 στελέχη γονοκόκκου από 690 περιπτώσεις γονόρροιας. Όλα τα στελέχη συνοδεύονταν από επιδημιολογικά ιστορικά των ασθενών από τους οποίους απομονώθηκαν, ενώ επιδημιολογικές πληροφορίες υπήρχαν και για τα υπόλοιπα 164 περιστατικά γονόρροιας στα οποία η εργαστηριακή διάγνωση βασίστηκε μόνο στη Gram χρώση. Η αξιολόγηση των επιδημιολογικών πληροφοριών έγινε στο σύνολο των 690 ιστορικών.

Το σύνολο των στελεχών υποβλήθηκαν σε έλεγχο του φαινοτύπου ευαισθησίας στα αντιγονορροϊκά αντιβιοτικά. Τα επίπεδα ευαισθησίας των στελεχών στα αντιβιοτικά προσδιορίστηκαν σε τιμές ελαχίστων ανασταλτικών συγκεντρώσεων (MIC).

Όλα τα στελέχη τυποποιήθηκαν με οροτυπία, ενώ σε περιπτώσεις ανθεκτικών στελεχών με ενδείξεις κλωνικότητας εφαρμόστηκε λεπτομερέστερη τυποποίηση με τη χρήση και άλλων συμβατικών και γονοτυπικών μεθόδων.

Στους κυριότερους φαινότυπους ανθεκτικών στελεχών αναλύθηκαν οι υπεύθυνοι μηχανισμοί αντοχής. Ο χαρακτηρισμός της αντοχής περιέλαβε:

(α) Πενικιλλινασοπαραγωγή (PPNG) στελέχη: Ανίχνευση της παραγόμενης β-λακταμάσης με ταχεία δοκιμασία νιτροσεφίνης στην καλλιέργεια και στη συνέχεια, ανάλυση πλασμιδιακού περιεχομένου σε αγαρόζη και προσδιορισμό του τύπου των πλασμιδίων αντοχής βάσει του μοριακού τους βάρους.

β) Στελέχη με πλασμιδιακή αντοχή στην τετρακυκλίνη (TRNG): Ανίχνευση του *tet-M* γονιδίου με PCR και περαιτέρω τυποποίηση του με ανάλυση των προϊόντων της PCR με περιοριστικά ένζυμα (RFLP).

(γ) Ανίχνευση στις κινολόνες στελέχη (QRNG): Ανίχνευση με δοκιμασία δίσκου ναλιδιζικού οξέος στην καλλιέργεια, επιβεβαίωση τους με E-test και στη συνέχεια, ανάλυση των μεταλλαγών στα γονίδια *gyrA* και *parC* με ανάλυση νουκλεοτιδικής αλληλουχίας μετά από πολλαπλασιασμό τμημάτων των γονιδίων αυτών με PCR (PCR-sequencing).

Τα μικροβιολογικά χαρακτηριστικά των στελεχών αξιολογήθηκαν σε συνάρτηση με τα επιδημιολογικά δεδομένα των αντίστοιχων ιστορικών. Τελος, το σύνολο των αποτελεσμάτων σχετικά με την αντοχή του γονοκόκκου στα αντιβιοτικά και την κατανομή των ανθεκτικών στελεχών σε πληθυσμιακές ομάδες στην κοινότητα κατά την υπό μελέτη περίοδο (1998–2002) συγκρίθηκαν με την αντίστοιχη διαμόρφωση του γονοκοκκικού δείγματος που συγκεντρώθηκε στο Κέντρο Αναφοράς κατά την αμέσως προηγούμενη πενταετή περίοδο (1993–1997).

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Βιολογικό Υλικό

Υλικό της μελέτης αποτέλεσε συλλογή 526 στελεχών *Neisseria gonorrhoeae* που απομονώθηκαν κατά την πενταετία 1998-2002. Με εξαίρεση ένα στέλεχος, τα στελέχη απομονώθηκαν συνεχόμενα στα μικροβιολογικά εργαστήρια δύο νοσοκομείων: του νοσοκομείου Αφροδισίων Νόσων «Ανδρέας Συγγρός» στην Αθήνα (452 στελέχη από 518 περιστατικά) και του νοσοκομείου Αφροδισίων και Δερματικών Νόσων Θεσσαλονίκης (73 στελέχη 171 περιστατικά γονόρροιας). Από τα 526 στελέχη, 510 απομονώθηκαν από περιστατικά ανδρικής γονοκοκκικής ουρηθρίτιδας, 15 προέρχονταν από γυναίκες (14 από Αθήνα) και ένα αφορούσε μεμονωμένη περίπτωση νεογνικής οφθαλμίας που σημειώθηκε στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Ιωαννίνων (Πίνακας 11).

Τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες στις διάφορες μεθόδους που εφαρμόστηκαν, παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.

Πίνακας 5: Χαρακτηριστικά στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες

Στελέχη-μάρτυρες	Τυποποιητικά χαρακτηριστικά	Μέθοδος
<i>N. gonorrhoeae</i> 1745 ⁽¹⁾	conj+afrr+cr	Ανάλυση πλασμιδιακού περιεχομένου και αυξοτυπία
<i>E. coli</i> 39R861	98+42+23.9+4.2 (kDa)	Ανάλυση πλασμιδιακού περιεχομένου
<i>N. gonorrhoeae</i> WHO-A ⁽²⁾	Met ⁻ / cr / Sp ^{res}	Αυξοτυπία και έλεγχος ευαισθησίας
<i>N. gonorrhoeae</i> WHO-D ⁽²⁾	Proto / Te ^{res} , Cm ^{res}	Αυξοτυπία και έλεγχος ευαισθησίας
<i>N. gonorrhoeae</i> 692 ⁽³⁾	Pro ⁻ Cit ⁻ Ura ⁻	Αυξοτυπία

⁽¹⁾ Riou, Guibourdenche & Courvalin, 1981

⁽²⁾ Riou, Lind & Guibourdenche 1985

⁽³⁾ Riou JY, Martin PM, Guibourdenche M, 1984

conj, afrr, cr: συζευκτικό, αφρικανικού τύπου και κρυπτικό πλασμίδιο, αντίστοιχα.

Sp, Te, Cm (^{res}): αντοχή στη σπεκτινομυκίνη, τετρακυκλίνη, χλωραμφαινικόλη, αντίστοιχα.

Proto, πρωτότροφο. Met⁻, Pro⁻, Cit⁻, Ura⁻ τροφική απαίτηση για μεθειονίνη, προλίνη, κιτρουλίνη και ουρακίλη, αντίστοιχα.

Συλλογή Επιδημιολογικών Δεδομένων

Τα επιδημιολογικά δεδομένα συγκεντρώθηκαν βάσει συγκεκριμένου προτυποποιημένου ερωτηματολογίου που έχει συνταχθεί από το Εθνικό Κέντρο Αναφοράς για το Γονόκοκκο και συμπληρώνεται με τις απαντήσεις των ίδιων των ασθενών. Τα στοιχεία που συγκεντρώθηκαν περιελάμβαναν δημογραφικές πληροφορίες (ηλικία, εθνικότητα, τόπο διαμονής, μορφωτικό επίπεδο), καθώς και πληροφορίες σχετικά με το ιστορικό του ασθενούς (σεξουαλική προτίμηση, προηγούμενη λοίμωξη από αφροδίσια νοσήματα, σεξουαλική συμπεριφορά και συμπεριφορά σε σχέση με την αντιμετώπιση της νόσου μετά την έναρξη των συμπτωμάτων, λήψη αντιβιοτικών στο χρονικό διάστημα που προηγήθηκε της εμφάνισης των συμπτωμάτων) και την πιθανή προέλευση της λοίμωξης (τόπος, σεξουαλικός σύντροφος). Το προτυποποιημένο ερωτηματολόγιο παρατίθεται στην *Εικόνα 8*.

Ταυτοποίηση Στελεχών Γονοκόκκου

Η ταυτοποίηση των στελεχών γονοκόκκου έγινε με βάση τα βιοχημικά τους χαρακτηριστικά, με το σύστημα Neisseria 4H (Amersham-Sanofi-Diagnostics Pasteur). Η ταυτότητα της *Neisseria gonorrhoeae* ελεγχόταν και σε κάθε επόμενη ανακαλλιέργεια των στελεχών, με χρήση της δοκιμασίας οξειδάσης. Οι ναϊσσέριες έχουν την ιδιότητα να παράγουν indophenol blue από την οξείδωση τετραμεθυλο-p-φαινυλενοδιαμίνης (TPD), μέσω του ενζύμου οξειδάση του κυτοχρώματος και παρουσία οξυγόνου. Η δοκιμασία οξειδάσης συνίσταται στην ενστάλλαξη μιάς σταγόνας διαλύματος 1% (w/v) διϋδροχλωρικής τετραμεθυλο-p-φαινυλενοδιαμίνης (tetramethyl-p-phenylene-diamine dihydrochloride) στην καλλιέργεια, οπότε οι οξειδάση-θετικές αποικίες χρωματίζονται κυανές (μπλε) σε ~5 sec (Mennen 1976).

ΑΤΟΜΙΚΟ ΔΕΛΤΙΟ ΙΣΤΟΡΙΚΟΥ ΓΟΝΟΚΟΚΚΙΚΗΣ ΛΟΙΜΩΞΗΣ

Αριθμ. Δείγματος: _____ Ημερομηνία: _____

Φύλο: _____ Ηλικία: _____ Επάγγελμα: _____

Εθνικότητα: _____

Διαμονή: _____
(Χώρα) (Πόλη) (Συνοικία)

Έγγαμος: _____ Άγαμος: _____ Σεξουαλική προτίμηση:

Αριθμός σεξουαλικών συντρόφων
το τελευταίο εξάμηνο: _____
Ετεροφυλοφιλία _____
Ομοφυλοφιλία _____
Αμφιφυλοφιλία _____

Σημείο Δειγματοληψίας Ουρήθρα _____ Πρωκτός _____
Τράχηλος μήτρας _____ άλλα σημεία _____

Έναρξη συμπτωμάτων: Πρίν πόσες ημέρες; _____

Πόσες ημέρες μετά την ύποπτη σεξουαλική
επαφή; _____

Είχε άλλες επαφές μετά από την εκδήλωσή τους; _____

Επισκέφθηκε άλλο γιατρό για το παρόν
πρόβλημα; _____

Προηγήθηκε άλλη θεραπεία (ποιά); _____

Προηγούμενη λοίμωξη από γονόκοκκο ή άλλο αφροδίσιο νόσημα;

όχι ναι Εάν ναι, σημειώστε τί είδος λοίμωξης, πότε, και ποιά θεραπεία δόθηκε.

Λήψη αντιβιοτικών (για οποιοδήποτε λόγο) κατά το τελευταίο τρίμηνο;

όχι ναι Εάν ναι, σημειώστε τί αντιβιοτικά, πότε και για ποιό λόγο.

Πιθανός τόπος μόλυνσης:

εντός Ελλάδας (πόλη) _____

στο εξωτερικό (χώρα, πόλη) _____

σεξουαλικός σύντροφος (-οι) _____

π.χ. σύζυγος, σταθερός δεσμός, περιστασιακή σχέση, τουρίστας (-τρια), ιερόδουλος,
ελληνικής ή άλλης εθνικότητας (και ποιός), κάτοικος Ελλάδας ή άλλης χώρας

Συμπτώματα Συντρόφου: _____

[ναι, όχι, δεν γνωρίζει]

Εικόνα 8. Προτυποποιημένο ερωτηματολόγιο για τη λήψη επιδημιολογικού ιστορικού από τους γονορροϊκούς ασθενείς.

Καλλιέργεια και Συντήρηση Στελεχών Γονοκόκκου

Η καλλιέργεια των γονοκόκκων γινόταν σε ένα μη-εκλεκτικό υλικό συνιστάμενο από GC άγαρ (Difco) και συμπλήρωμα Vitox (Oxoid) και, παράλληλα, σε ένα εκλεκτικό υλικό αποτελούμενο από τα προηγούμενα συστατικά συμπληρωμένα με ένα μίγμα αντιβιοτικών (VCN της Oxoid). Η ακριβής σύσταση των υλικών καλλιέργειας που χρησιμοποιήθηκαν περιγράφεται στον Πίνακα 6. Μετά τον εμβολιασμό, οι καλλιέργειες επωάζονταν για 18-24h στους 37°C, σε κλίβανο CO₂ (Heraeus), σε ατμόσφαιρα εμπλουτισμένη σε CO₂ (5-7%) και υγρασία (70%).

Η συντήρηση των στελεχών γονοκόκκου γινόταν στους -80°C σε Brain Heart Infusion Broth εμπλουτισμένο με 20% γλυκερόλη.

Πίνακας 6: Σύσταση υλικών καλλιέργειας

Βάση (GC άγαρ, Difco™)	gr/l	Συμπλήρωμα (Vitox, Oxoid)	ανά φιαλίδιο[#]
Πεπτόνη	15	Βιταμίνη B ₁₂	0,1 mg
Άμυλο	1	L-γλουταμίνη	100 mg
K ₂ HPO ₄	4	Θειϊκή αδενίνη	10 mg
KH ₂ PO ₄	1	Υδροχλωρική γουανίνη	0,3 mg
NaCl	5	παρα-αμινοβενζοϊκό οξύ	0,13 mg
Άγαρ	10	L-κυστίνη	11 mg
VCN (Oxoid)	ανά φιαλίδιο[#]	NAD (συνένζυμο I)	2,5 mg
		Κοκαρβοξυλάση	1 mg
		Νιτρικός σίδηρος	0,2 mg
Βανκομυκίνη	1,5 mg	Υδροχλωρική θειαμίνη	0,03 mg
Κολιστίνη	3,75 mg	Υδροχλωρική κυστεΐνη	259 mg
Νυστατίνη	6250 IU	Γλυκόζη	1 gr

[#] ένα φιαλίδιο / 500 ml υλικού

Ανίχνευση Πενικιλινασοπαραγωγών στελεχών (Δοκιμασία νιτροσεφίνης)

Η ανίχνευση των πενικιλινασοπαραγωγών στελεχών (PPNG) έγινε με ταχεία δοκιμασία νιτροσεφίνης. Η νιτροσεφίνη είναι μια χρωμογόνος κεφαλοσπορίνη, η οποία όταν υδρολύεται από την β-λακταμάση που παράγουν τα PPNG στελέχη δίνει παράγωγα με διαφορετικό χρώμα (κόκκινο) από της ακέραιης νιστροσεφίνης (κίτρινο). Έτσι, με την ρίψη μιάς σταγόνας διαλύματος νιτροσεφίνης 0,5 mg/ml (σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 0.1M, pH 7, που περιέχει 1% (v/v) διμεθυλσουλφοξείδιο), οι αποικίες που παράγουν χρωματίζονται κόκκινες.

Προσδιορισμός Επιπέδων Ευαισθησίας στα Αντιβιοτικά

Τα επίπεδα ευαισθησίας των στελεχών προσδιορίστηκαν σε τιμές ελαχίστων ανασταλτικών συγκεντρώσεων (MIC, $\mu\text{g/ml}$) των αντιβιοτικών, με εφαρμογή της μεθοδολογίας E-test, σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας (AB-Biodisk, Σουηδία). Στη μέθοδο αυτή χρησιμοποιούνται πλαστικές ταινίες που έχουν ενσωματωμένο το αντιβιοτικό σε συνεχή διαβάθμιση συγκεντρώσεων. Τα τρυβλία με μη εκλεκτικό GC άγαρ εμβολιάζονται με κυτταρικό εναιώρημα θολερότητας 0,5 της κλίμακας McFarland και ακολουθεί εναπόθεση των ταινιών στην επιφάνεια των τρυβλίων και επώαση στους 37°C παρουσία CO_2 και υγρασίας για 18-24 ώρες.

Ελέγχθηκαν τα αντιβιοτικά πενικιλίνη G, κεφοταξίμη, σπεκτινομυκίνη, τετρακυκλίνη, ερυθρομυκίνη, νορφλοξακίνη και σιπροφλοξακίνη. Το ναλιδιξικό οξύ και η χλωραμ-φαινικόλη επίσης ελέγχθηκαν, όχι όμως για την εκτίμηση της *in vitro* δραστηριότητάς τους έναντι του γονοκόκκου, αλλά κυρίως ως «δείκτες» για την αναγνώριση ορισμένων φαινοτύπων/μηχανισμών αντοχής.

Για την κατάταξη των στελεχών γονοκόκκου σε κατηγορίες ευαισθησίας/αντοχής χρησιμοποιήθηκαν τα κριτήρια της CLSI (πρώην National Committee for Clinical Laboratory Standards) (NCCLS 1997). Για τα αντιβιοτικά, για τα οποία δεν έχουν καθοριστεί όρια από την CLSI, χρησιμοποιήθηκαν γενικώς αποδεκτά όρια (breakpoints) από τη διεθνή βιβλιογραφία. Συγκεκριμένα, όρια εκτός CLSI χρησιμοποιήθηκαν για την ερυθρομυκίνη (MIC =2 mg/l για αντοχή και =0.25 mg/l για ευαισθησία) και για τη νορφλοξακίνη (MIC =1 mg/l για αντοχή και =0.25 mg/l για ευαισθησία) (Tzelepi et al 1997). Τα κριτήρια που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 7.

Πίνακας 7: Κριτήρια κατάταξης σε κατηγορίες ευαισθησίας για τη *N. gonorrhoeae*

Κατηγορίες Ευαισθησίας	Κριτήρια κατάταξης/όρια αντοχής -ευαισθησίας (MIC σε mg/l)
<i>Penicillin G (Pen)</i>	
Αντοχή	>1
πλασμιδιακή αντοχή (PPNG)	παραγωγή πενικιλιλινάσης
Ευαισθησία	=0.064
<i>Cefotaxime (Ctx)</i>	
Ευαισθησία	=0.5
<i>Tetracycline (Tet)</i>	
Αντοχή	>1
πλασμιδιακή αντοχή (TRNG)	Παρουσία Tet-M πλασμιδίου
Ευαισθησία	=0.25
<i>Erythromycin (Ery)</i>	
Αντοχή	>1
Ευαισθησία	=0.25
<i>Spectinomycin (Sp)</i>	
Αντοχή	>64
Ευαισθησία	=32
<i>Ciprofloxacin (Cip)</i>	
QRNG	Απουσία άλω σε δίσκο 30 µg ναλιδιξικού οξέος
Αντοχή	>0.5
Ευαισθησία	=0.064
<i>Norfloxacin (Nor)</i>	
QRNG	Απουσία άλω σε δίσκο 30 µg ναλιδιξικού οξέος
Αντοχή	>0.5
Ευαισθησία	=0.25
<i>Chloramphenicol (Cm)</i>	
Αντοχή	>1
Ευαισθησία	=0.25

Οροτυπία

Η οροτυπία των στελεχών γονοκόκκου έγινε με την χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων (Mabs) έναντι της κύριας πρωτεΐνης I της εξωτερικής μεμβράνης του γονοκοκκικού κυττάρου. Χρησιμοποιήθηκε το GC σύστημα Mabs (Ph-Serotyping, Phadebact[®] GC Serovar Test), το οποίο έχει σχεδιαστεί στη βάση της μεθοδολογίας οροτυποποίησης που αναπτύχθηκε από τους Bygdeman & συν. (1983). Τα οροτυπικά αντιδραστήρια (αντιορροί) του συστήματος GC περιέχουν μονοκλωνικά αντισώματα έναντι διακριτών επιτόπων της κύριας πρωτεΐνης I (P.I) της εξωτερικής μεμβράνης του γονοκόκκου, συζευγμένα με την πρωτεΐνη A αδρανοποιημένων στελεχών σταφυλοκόκκων. Το σύστημα αποτελείται από 14 αντιδραστήρια, πέντε με Mabs έναντι επιτόπων της P.I τύπου A (IA) και εννέα έναντι επιτόπων της P.I τύπου B (IB). Όταν γίνει ανάμιξη κυτταρικού εναιωρήματος γονοκόκκων με τους αντιορούς, τα ειδικά μονοκλωνικά αντισώματα προσδένονται στα αντίστοιχα αντιγόνα (επίτοπους) της P.I του γονοκόκκου σχηματίζοντας συσσωματώματα (co-agglutination lattice), τα οποία είναι ορατά με γυμνό μάτι.

Υλικά

- ♦ GC σύστημα Mabs BACTUS AB (πρώην Boule Diagnostics AB, Sweden), που περιλαμβάνει πέντε οροτυπικά αντιδραστήρια έναντι επιτόπων της IA (WI) πρωτεΐνης (Ao, Ar, As, At, Av) και εννέα αντιδραστήρια έναντι επιτόπων της IB (WII/WIII) πρωτεΐνης (Br, Bo, Bp, By, Bv, Bu, Bs, Bt, Bx). Το συγκεκριμένο σύστημα οροτυποποίησης διατίθεται από την κατασκευάστρια εταιρεία έτοιμο προς χρήση. Φυλάσσεται στους 2-8⁰ C.
- ♦ Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων που περιέχει χλωριούχο νάτριο (phosphate buffer saline –PBS) [137mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3mM Na₂HPO₄ pH=7.5].

Εφαρμογή

- Παρασκευή εναιωρήματος γονοκόκκων θολερότητας ίσης με 10 της κλίμακας MacFarland, με παραλαβή αποικιών από στερεή καλλιέργεια και εναιώρησή τους σε 2ml PBS.

- Θέρμανση των εναιωρημάτων σε υδατόλουτρο σε θερμοκρασία βρασμού για 10 min. Τα εναιωρήματα μπορούν να συντηρηθούν στο ψυγείο ($\sim 4^{\circ}$ C) για μακρό χρονικό διάστημα.
- Ανάμιξη μιας σταγόνας από κάθε εναιώρημα μονοκλωνικών αντισωμάτων με μία ίσου όγκου σταγόνα εναιωρήματος γονοκόκκων σε ειδική πλάκα τύπου Bioplate[®] και ανακίνηση της πλάκας για 2 min.
- Παρατήρηση της αντίδρασης συγκόλλησης και ανάγνωση του αποτελέσματος. Τα στελέχη που αντιδρούν με Mabs έναντι επιτόπων της IA πρωτεΐνης χαρακτηρίζονται ως IA (WI) οροομάδας, ενώ εκείνα που αντιδρούν με Mabs έναντι επιτόπων της IB πρωτεΐνης ως IB (WII/WIII) οροομάδας. Πολύ σπάνια ανευρίσκονται υβριδικά στελέχη με επιτόπους και των δύο οροομάδων (IA/IB). Η ονομασία του οροτύπου κάθε στελέχους προκύπτει από τον συνδυασμό των Mabs που έδωσαν θετική αντίδραση συγκόλλησης. Για παράδειγμα, αν το στέλεχος έχει δώσει συγκόλληση με τα αντιδραστήρια Ar, As και At, χαρακτηρίζεται ως IA οροομάδας, οροτύπου Arst, ενώ αν έχει δώσει επιπλέον συγκόλληση, π.χ., και με το Ao έχει ορότυπο Arost κ.ο.κ. Παρομοίως, ένα στέλεχος οροομάδας IB, έν έχει δώσει συγκόλληση με τα αντιδραστήρια Br, Bo, Bp και Bt χαρακτηρίζεται ως οροτύπου Bropt, αν έχει αντιδράσει επιπλέον, π.χ. με το Bs χαρακτηρίζεται ως Bropst κ.ο.κ.

Αυξοτυπία

Για την αυξοτυπία των γονοκόκκων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος που περιγράφεται από τους Catlin και συν. (Catlin 1973), όπως τροποποιήθηκε από τους Hendry και Stewart (Hendry & Stewart 1979). Με τη μέθοδο αυτή, τα στελέχη γονοκόκκου διαφοροποιούνται σε αυξότυπους, ανάλογα με τις τροφικές τους απαιτήσεις για ορισμένα αμινοξέα ή άλλα συστατικά στοιχεία, τα οποία παραλείπονται ανά ένα από συγκεκριμένης χημικής σύστασης στερεό μέσο καλλιέργειας, το NEDA (από τις λέξεις *Neisseria defined agar*), που παρασκευάζεται έτσι ώστε να ικανοποιεί, στην πλήρη του σύσταση, τις στοιχειώδεις αυξητικές ανάγκες του γονοκόκκου (υλικό ελαχίστων τροφικών απαιτήσεων). Τα στελέχη χαρακτηρίζονται ως αυξότροφα ή πολυαυξότροφα, αν εκδηλώνουν απαίτηση για ένα ή περισσότερα από τα υπό εξέταση αμινοξέα, αντίστοιχα. Πρωτότροφα (Proto ή NR –no-requiring) χαρακτηρί-

ζονται τα στελέχη που είναι ικανά να συνθέτουν όλα τα υπό εξέταση αμινοξέα και αυξητικούς παράγοντες και επομένως, δεν απαιτούν την προσθήκη κανενός από αυτά στο συγκεκριμένο θρεπτικό υλικό για να αναπτυχθούν. Τέλος, άτυπα (NNGR –No NEDA Growth) χαρακτηρίζονται τα στελέχη που δεν ευνοούνται από την όλη χημική σύσταση του χρησιμοποιούμενου υλικού, με αποτέλεσμα να μην αναπτύσσονται ούτε στο πλήρες υλικό καλλιέργειας (complete NEDA), από το οποίο δεν έχει παραλειφθεί κανένα από τα υπό εξέταση αμινοξέα και αυξητικά στοιχεία. Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκαν οι αυξοτροφικές και πολυαυξοτροφικές απαιτήσεις για τα αμινοξέα προλίνη (P⁻), κιτρουλίνη–ικανοποιούμενη ή όχι από ορνιθίνη (O⁻ και C⁻, αντίστοιχα), υποξανθίνη (H⁻), ουρακίλη (U⁻) και μεθειονίνη (M⁻).

Υλικά

- Bacto-agar (Difco), σε τελική συγκέντρωση 16⁰/₁₀₀ w/v (100ml αποστειρωμένου υδατικού διαλύματος άγαρ 32⁰/₁₀₀ w/v στον τελικό όγκο των 200 ml του κάθε αυξοτυπικού υλικού).

Συστατικά Πρώτου Μέρους (Part I)

- Σύνθετο διάλυμα, που περιέχει: (1) διάλυμα αλάτων (1M NaCl / 0,05M K₂SO₄ / 0,02M MgCl₂ / 0,04M NH₄Cl / 0,1mM disodium EDTA) 40% v/v, (2) διάλυμα γλυκερόλης-γαλακτικού οξέος (2M γλυκερόλη, 1M DL-Na-γαλακτικό οξύ) 20% v/v, (3) δεξτρόζη (D-γλυκόζη) 2% w/v, (4) NaHCO₃ 0,4% w/v, (5) Οξεϊκό νάτριο 1,36% w/v, (6) KH₂PO₄ 1,08% w/v, (7) K₂HPO₄ 1,4% w/v, (8) Οξαλοξεϊκό οξύ 0,026% w/v, (9) CaCl₂ 16mg/ml, 1% v/v (προσθήκη στάγδην, υπό ανάδευση), (10) Fe(NO₃)₃ 10mM, 0,2% v/v. Το διάλυμα πρώτου μέρους συνιστά το ¼του όγκου όλων των αυξοτυπικών υλικών (50ml στα 200 ml τελικού όγκου κάθε υλικού).

Συστατικά Δεύτερου Μέρους (Part II)

- Κυστεΐνη/Κυστίνη (Cys) 0,07M/0,03M σε 0,1M HCl. Προστίθεται στα αυξοτυπικά υλικά σε ποσότητα 0,5% v/v επί του συνόλου του όγκου τους (1ml στα 200ml του τελικού όγκου κάθε υλικού). Παραλείπεται από το υλικό Cys⁻.
- Βιοτίνη 0,6M σε H₂O, pH=7,5. Προστίθεται σε ποσότητα 0,5% v/v σε όλα τα αυξοτυπικά υλικά.
- Προλίνη (Pro) 0,2M σε H₂O. Προστίθεται σε ποσότητα 0,25% v/v (500μl στα 200ml) σε όλα τα αυξοτυπικά υλικά εκτός του υλικού Pro⁻.
- Γλουταμίνη 0,2M σε H₂O. Προστίθεται σε ποσότητα 0,25% v/v σε όλα τα αυξοτυπικά υλικά.

Μεθοδολογία

- Θρεονίνη 0,2M σε H₂O. Προστίθεται σε ποσότητα 0,25% v/v σε όλα τα αυξοτυπικά υλικά.
- Λυσίνη 0,1M σε H₂O. Προστίθεται σε ποσότητα 0,25% v/v σε όλα τα αυξοτυπικά υλικά.
- Ιστιδίνη 0,1M σε H₂O. Προστίθεται σε ποσότητα 0,25% v/v σε όλα τα αυξοτυπικά υλικά.
- Γλυκίνη 0,1M σε H₂O. Προστίθεται σε ποσότητα 0,25% v/v σε όλα τα αυξοτυπικά υλικά.
- Κιτρουλίνη (Cit) 0,3M σε H₂O. Προστίθεται σε ποσότητα 0,25% v/v σε όλα τα αυξοτυπικά υλικά, εκτός των υλικών Cit⁻ και Cit⁻Orn⁺.
- Ορνιθίνη (Orn) 0,3M σε H₂O. Προστίθεται σε ποσότητα 0,25% v/v μόνον στο υλικό Cit⁻Orn⁺.
- Λευκίνη 0,1M σε H₂O. Προστίθεται σε ποσότητα 0,75% v/v (1,5ml στα 200ml υλικού) σε όλα τα αυξοτυπικά υλικά.
- Αλανίνη 0,2M σε H₂O. Προστίθεται σε ποσότητα 0,25% v/v σε όλα τα αυξοτυπικά υλικά.
- Σερίνη 0,2M σε H₂O. Προστίθεται σε ποσότητα 0,25% v/v σε όλα τα αυξοτυπικά υλικά.
- Ισολευκίνη 0,1M σε H₂O. Προστίθεται σε ποσότητα 0,25% v/v σε όλα τα αυξοτυπικά υλικά.
- Μεθειονίνη (Met) 0,1M σε H₂O. Προστίθεται σε ποσότητα 0,25% v/v σε όλα τα αυξοτυπικά υλικά, εκτός του υλικού Met⁻.
- Τρυπτοφάνη 0,1M σε H₂O. Προστίθεται σε ποσότητα 0,25% v/v σε όλα τα αυξοτυπικά υλικά.
- Βαλίνη 0,2M σε H₂O. Προστίθεται σε ποσότητα 0,25% v/v σε όλα τα αυξοτυπικά υλικά.
- Ουρακίλη (Ura) 0,04M σε 0.1N NaOH. Προστίθεται σε ποσότητα 0,25% v/v σε όλα τα αυξοτυπικά υλικά, εκτός του υλικού Ura⁻.
- Υποξανθίνη (Hyx) 0,02M σε H₂O. Προστίθεται σε ποσότητα 0,25% v/v σε όλα τα αυξοτυπικά υλικά, εκτός του υλικού Hyx⁻.
- Γλουταθειόνη 0,1M σε H₂O. Προστίθεται σε ποσότητα 0,25% v/v σε όλα τα αυξοτυπικά υλικά.
- Σπερμίνη 0,1M σε H₂O. Προστίθεται σε ποσότητα 0,25% v/v σε όλα τα αυξοτυπικά υλικά.
- Χλωριούχος χολίνη 0,05M σε H₂O. Προστίθεται σε ποσότητα 0,05% v/v (100μl στα 200ml υλικού) σε όλα τα αυξοτυπικά υλικά.

- NAD 10mM σε H₂O. Προστίθεται σε ποσότητα 0,05% v/v σε όλα τα αυξοτυπικά υλικά.
- Υδροχλωρική θειαμίνη 20mM σε H₂O. Προστίθεται σε ποσότητα 0,05% v/v σε όλα τα αυξοτυπικά υλικά.
- Παντοθενικό ασβέστιο 10mM σε H₂O. Προστίθεται σε ποσότητα 0,05% v/v σε όλα τα αυξοτυπικά υλικά.
- Πυροφωσφορική θειαμίνη 5mM (TPP) σε H₂O. Προστίθεται σε ποσότητα 0,05% v/v σε όλα τα αυξοτυπικά υλικά.
- Μυοϊνοσιτόλη 5mM σε H₂O. Προστίθεται σε ποσότητα 0,05% v/v σε όλα τα αυξοτυπικά υλικά.
- Φωσφορική πυριδοξάλη 10mM σε H₂O. Προστίθεται σε ποσότητα 0,05% v/v σε όλα τα αυξοτυπικά υλικά.

Πειραματική διαδικασία

Η μέθοδος της αυξοτυπίας περιλαμβάνει δύο κυρίως στάδια: την πολύπλοκη διαδικασία παρασκευής των αυξοτυπικών υλικών και, στη συνέχεια, τον εμβολιασμό των τρυβλίων αυξοτυπίας και την ανάγνωση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

I. Παρασκευή αυξοτυπικών υλικών: Παρασκευάζονται οκτώ (8) διαφορετικά υλικά

Πλήρες [x2], Cys⁻, Pro⁻, Cit⁻, Cit⁻Orn⁺, Hyc⁻, Ura⁻ και Met⁻, το καθένα σε τελική ποσότητα 200ml που δίνει 10 τρυβλία (20ml υλικού ανά τρυβλίο). Το ήμισυ (100ml) του όγκου αυτού είναι υδατικό διάλυμα άγαρ που παρασκευάζεται με περιεκτικότητα σε άγαρ 32‰ (διδύναμο), ώστε αναμιγνύόμενο με ίσο όγκο διαλύματος των υπολοίπων συστατικών να έρθει, στα αυξοτυπικά τρυβλία, σε τελική συγκέντρωση 16‰. Χρησιμοποιείται ευγενές (noble) άγαρ, το οποίο έχει υποστεί προεπεξεργασία, ώστε να απαλλαγεί από διάφορες ουσίες που θα μπορούσε να επηρεάσουν το αποτέλεσμα της αυξοτυπίας. Η **προεπεξεργασία του άγαρ** περιλαμβάνει: (α) τρεις φορές έκπλυση με απεσταγμένο νερό (ανάμιξη με νερό σε αναλογία 25gr άγαρ προς 500ml νερό, φυγοκέντρηση στις 4 000 rpm, απόρριψη υπερκείμενου νερού), (β) δύο εκπλύσεις σε 95% αιθανόλη με τον ίδιο τρόπο και (γ) καλό στέγνωμα του ιζήματος με παραμονή στους 60°C επί 2-3 ημέρες (υπό παρακολούθηση και ανακάτεμα κάθε τόσο με γυάλινη, καθαρή ράβδο, ώστε να μη σχηματίσει συσσωματώματα). Το στεγνωμένο άγαρ μπορεί να φυλαχτεί, ερμητικά κλεισμένο, σε θερμοκρασία δωματίου.

Το τελικό διάλυμα των υπολοίπων συστατικών παρασκευάζεται σε δύο μέρη:

Πρώτο Μέρος (Part I) Το διάλυμα πρώτου μέρους περιέχει συστατικά που είναι κοινά και στα οκτώ διαφορετικά αυξοτυπικά υλικά. Έτσι, παρασκευάζεται για όλα μαζί, σε τελικό όγκο 500ml και από αυτό μοιράζονται έπειτα από 50ml σε οκτώ προσημειωμένες ογκομετρικές φιάλες των 100ml, που αντιστοιχούν στα υλικά που πρόκειται να παρασκευαστούν. Τα συστατικά του Πρώτου Μέρους αναμιγνύονται σε ποτήρι ζέσεως του 1L με τη σειρά που αναφέρονται (βλ. «Υλικά») και υπό συνεχή ανάδευση σε μαγνητικό αναδευτήρα. Το H₂O (265ml) προστίθεται μετά το οξεικό νάτριο και πριν από τα φωσφορικά άλατα, ενώ στο τέλος ακολουθεί ογκομέτρηση και διόρθωση, εάν χρειάζεται, του τελικού όγκου. Το Πρώτο Μέρος μπορεί να παρασκευαστεί από την προηγούμενη ημέρα και να φυλαχτεί στο ψυγείο.

Δεύτερο Μέρος (Part II) Το δεύτερο μέρος είναι το τελικό διάλυμα του κάθε διακριτού υλικού και παρασκευάζεται με προσθήκη των υπολοίπων συστατικών στα 50ml του διαλύματος του Πρώτου Μέρους. Η διαφοροποίηση ανάμεσα στα οκτώ υλικά προκύπτει με την παράλειψη ενός από τα υπό εξέταση αμινοξέα από το αντίστοιχο αυξοτυπικό υλικό (βλ. «Υλικά»). Εξαιρέση αποτελεί η ορνιθίνη, η οποία προστίθεται μόνο στο υλικό Cit⁺Orn⁺, με σκοπό να ελεγχθεί αν τυχούσα τροφική απαίτηση για κιτρουλίνη ικανοποιείται ή όχι από ορνιθίνη. Τα συστατικά του Δεύτερου Μέρους προπαρασκευάζονται υπό κατάλληλες μοριακές συγκεντρώσεις (βλ. «Υλικά») και φυλάσσονται στην κατάψυξη ως διαλύματα συντήρησης (stock solutions). Οι ποσότητες διαλυμάτων συντήρησης που χρησιμοποιούνται, ώστε να επιτευχθεί η επιθυμητή τελική περιεκτικότητα για κάθε συστατικό στα αυξοτυπικά υλικά, δίνονται επίσης στον κατάλογο των Υλικών. Μετά την προσθήκη όλων των συστατικών στις φιάλες, ο όγκος των διαλυμάτων συμπληρώνεται έως τα 100ml με δισαπεσταγμένο νερό και ακολουθεί ρύθμιση του pH στο 7,2 (± 0,05) με NaOH (αρχικά 10N και έπειτα 1N). Το pH δεν πρέπει να ξεπεράσει το 7,5 γιατί θα δημιουργηθούν ιζήματα. Στη συνέχεια, γίνεται τελική ογκομέτρηση, διόρθωση του όγκου σε περίπτωση που υπάρχουν μικρές αποκλίσεις και, τέλος, αποστείρωση του κάθε διαλύματος με μετάγγιση μέσω φίλτρου

0,5 mm σε στείρα φιάλη. Ακολουθεί προσαρμογή της θερμοκρασίας των διαλυμάτων σε θερμαινόμενο υδατόλουτρο, ώστε να έρθουν στην ίδια θερμοκρασία (52°C) με το λυωμένο, αποστειρωμένο άγαρ, το οποίο έχει προπαρασκευαστεί σε παρτίδες

των 100 ml υποβάλλεται παράλληλα και αυτό σε προσαρμογή στην ίδια θερμοκρασία. Στη συνέχεια, τα δύο ίσου όγκου μέρη (100ml τελικού διαλύματος συστατικών και 100ml λυωμένου άγαρ 32‰) κάθε αυξοτυπικού υλικού αναμιγνύονται υπό άσηπτες συνθήκες και μοιράζονται σε προσημειωμένα τρυβλία. Τα αυξοτυπικά τρυβλία μπορούν να φυλαχτούν στο ψυγείο (+4 - +8°C) υπό κατάλληλες συνθήκες αερισμού επί τρεις περίπου μήνες.

II. Εμβολιασμός αυξοτυπικών τρυβλίων– Ανάγνωση και Ερμηνεία Αποτελεσμάτων

Για κάθε πείραμα αυξοτυπίας χρησιμοποιείται μία πλήρης σειρά αυξοτυπικών τρυβλίων, καθώς και δύο τρυβλία μη επιλεκτικού GC άγαρ που εμβολιάζονται στην αρχή και στο τέλος της διαδικασίας εμβολιασμού ως μάρτυρες της καθαρότητας των στελεχών και της τήρησης ασηψίας κατά τη διαδικασία, καθώς και της ικανότητας των στελεχών να αναπτύσσονται στο πλήρες αυξοτυπικό υλικό που περιέχει όλα τα συστατικά. Χρησιμοποιείται πολυενοφθαλμιστής τύπου Steer, ο οποίος επιτρέπει τον επαναληπτικό εμβολιασμό 26 στελεχών γονοκόκκου στις αυτές θέσεις σε όλα τα τρυβλία. Εικοσιτρείς από τις θέσεις αυτές προορίζονται για αυξοτυπικό έλεγχο ισάριθμων στελεχών, ενώ τρεις θέσεις προβλέπονται για τον εμβολιασμό στελεχών γονοκόκκου με γνωστές από τη βιβλιογραφία τροφικές απαιτήσεις, τα οποία χρησιμεύουν ως μάρτυρες της λειτουργικότητας των υλικών αυξοτυπίας που παρασκευάστηκαν στο προηγούμενο στάδιο (βλ. Πίνακα 5, στην ενότητα ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ). Η διαδικασία της αυξοτυπίας έχει ως εξής:

- Τα γονοκοκκικά στελέχη που πρόκειται να ελεγχθούν ανακαλλιεργούνται από την προηγούμενη ημέρα σε GC θρεπτικό υλικό και, πριν ελεγχθούν, καταγράφονται απαραίτητα σε αριθμημένο κατάλογο. Τα τρυβλία που θα χρησιμοποιηθούν, επίσης χωρίζονται σε αριθμημένους τομείς που αντιστοιχούν στις θέσεις εμβολιασμού κάθε στελέχους και, πριν την έναρξη της διαδικασίας τοποθετούνται σε κλίβανο 37°C, όπου παραμένουν για σύντομο χρονικό διάστημα, ώστε να απομακρυνθεί η υγρασία από την επιφάνειά τους.
- Από τα στερεά καλλιεργήματα παρασκευάζονται εναιωρήματα βακτηριακών κυττάρων σε αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (PBS), θολερότητας ίσης με το 0.5 της κλίμακας McFarland ($1,5 \times 10^8$ cfu/ml). Πριν από την εναιώρηση των κυττάρων γονοκόκκου, το PBS προθερμαίνεται στους 37°C, επειδή

Ο γονόκοκκος είναι ευπαθής στις χαμηλές θερμοκρασίες. Επίσης, λαμβάνεται μέριμνα, ώστε τα επόμενα στάδια να διεκπεραιωθούν στο λιγότερο δυνατό χρόνο, γιατί ο γονόκοκκος αυτολύεται αν παραμείνει για πολύ χρόνο στο PBS.

- Ποσότητες 0,5 ml από τα εναιωρήματα των στελεχών τοποθετούνται στις ειδικές οπές πλάκας teflon (οι οποίες ξαναγεμίζονται με τα αντίστοιχα εναιωρήματα, όταν οι αρχικές ποσότητες ξοδευτούν, κατά τη διάρκεια της διαδικασίας εμβολιασμού). Παράλληλα προετοιμάζεται ο πολυενοφθαλμιστής, με τοποθέτηση καρφίδων (που έχουν προηγουμένως αποστειρωθεί) στην κεφαλή του πολυενοφθαλμιστή. Χρησιμοποιείται μία καρφίδα για κάθε στέλεχος.
- Ακολουθεί η διαδικασία του εμβολιασμού με χρήση του πολυενοφθαλμιστή, ο οποίος εμβολιάζει διαδοχικά το ένα τρυβλίο μετά το άλλο με ενδιάμεση εμβάπτιση των καρφίδων στις αντίστοιχες οπές της πλάκας teflon, στις οποίες έχουν τοποθετηθεί τα εναιωρήματα. Οι καρφίδες αποθέτουν στις προκαθορισμένες θέσεις κάθε τρυβλίου σταγόνες όγκου 2 μl, που αντιστοιχεί σε $\sim 10^5$ cfu (colony forming units).
- Τα εμβολιασμένα τρυβλία αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min, ώστε να απορροφηθούν τα εναιωρήματα και, στη συνέχεια, τοποθετούνται για επώαση σε κλίβανο CO₂, στους 37°C.

III. Ανάγνωση και Ερμηνεία Αποτελεσμάτων

Η ανάγνωση των αποτελεσμάτων της αυξοτυπίας γίνεται στις 24 και 48 h από την έναρξη της επώασης. Ως ανάπτυξη στα ελειμματικά κατά ένα αμινοξύ τρυβλία θεωρείται η παρουσία περισσότερων από 10 (>10) διακριτών αποικιών. Η παρουσία 1-10 αποικιών καταγράφεται και εκτιμάται ως αυξοτροφική απαίτηση ή όχι, μετά από σύγκριση με την αντίστοιχη ανάπτυξη του ίδιου στελέχους στο πλήρες NEDA και στο GC. Τέλος, η πλήρης απουσία αποικιών ερμηνεύεται ως αδυναμία ανάπτυξης.

++ = **συρρέουσα ανάπτυξη**
 + = **ημισυρρέουσα ανάπτυξη ή >10 διακριτές αποικίες**
 ± = **=10 διακριτές αποικίες (αμφίβολο αποτέλεσμα / καταγραφή αριθμού αποικιών)**
 - = **καμμία ανάπτυξη (no growth)**

Πίνακας 8. Ανάγνωση Αυξοτυπίας / Ονοματολογία Αυξοτροφικών Απαιτήσεων κατά Hendry & Stewart

ΟΝΟΜΑΤΟΛΟΓΙΑ	GC	NEDA							
		πλήρες	Cys ⁻	Pro ⁻	Cit ⁻	Cit ⁻ Orn ⁺	Hyx ⁻	Ura ⁻	Met ⁻
Proto (ή NR)	+	+	-	+	+	+	+	+	+
P⁻	+	+	-	-	+	+	+	+	+
C⁻	+	+	-	+	-	-	+	+	+
O⁻	+	+	-	+	-	+	+	+	+
H⁻	+	+	-	+	+	+	-	+	+
U⁻	+	+	-	+	+	+	+	-	+
M⁻	+	+	-	+	+	+	+	+	-
άτυπος γονόκοκκος (NT ή NNGR)	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Τα αποτελέσματα της αυξοτυπίας αξιολογούνται, αφού πρώτα εκτιμηθούν τα τρυβλία-μάρτυρες και τα στελέχη-μάρτυρες, ώστε να διασφαλίζεται η αξιοπιστία των υλικών που παρασκευάστηκαν (ορθή σύσταση και λειτουργικότητα), καθώς και της καθαρότητας των στελεχών και της διαδικασίας (να μην υπάρχουν επιμολύνσεις). Η ανάπτυξη στα αυξοτυπικά τρυβλία συγκρίνεται πάντα και με εκείνη που εμφανίζεται στα τρυβλία-μάρτυρες: (α) Η εικόνα στο τρυβλίο Cys⁻ αντιστοιχεί σε μη-ανάπτυξη (αρνητικός μάρτυρας), γιατί κανένα στέλεχος γονοκόκκου δεν αναπτύσσεται απουσία κυστεΐνης/κυστίνης. Στελέχη που τυχόν έχουν αναπτυχθεί στα τρυβλία Cys⁻ δεν είναι γονόκοκκοι ή έχουν επιμολύνσεις από άλλα βακτήρια. Αν πάλι όλα τα στελέχη αναπτύσσονται κανονικά στα τρυβλία Cys⁻, τότε είτε η σύσταση των αυξοτυπικών υλικών που παρασκευάστηκαν είτε η πυκνότητα του εμβολιάσματος που χρησιμοποιήθηκε είναι λανθασμένη. (β) Η εικόνα ανάπτυξης στα ελλειμματικά αυξοτυπικά τρυβλία συγκρίνεται με την αντίστοιχη εικόνα στο πλήρες αυξοτυπικό υλικό (complete NEDA) και στο GC μέσο καλλιέργειας. Αν το στέλεχος έχει αποτύχει να αναπτυχθεί στο πλήρες υλικό, ενώ αναπτύσσεται κανονικά στο GC, η μη-ανάπτυξη

Μεθοδολογία

του στα αυξοτροφικά υλικά δεν αξιολογείται και η αυξοτυπία του θα πρέπει να επαναληφθεί, αφού πρωτοκαλλιεργηθεί σε πλήρες υλικό (complete) για να προσαρμοστεί στο είδος αυτό υλικού. Αν και στην επανάληψη παρουσιάσει το ίδιο πρόβλημα, χαρακτηρίζεται ως άτυπο με αυτή τη μεθοδολογία αυξοτυπίας (no-NEDA Growth). (γ) Τα στελέχη-μάρτυρες γνωστών τροφικών απαιτήσεων οφείλουν να εμφανίζουν τον αναμενόμενο αυξότυπο. Σε αντίθετη περίπτωση, η σύσταση ενός ή περισσότερων αυξοτυπικών τρυβλίων και πρέπει να διορθωθεί με αντικατάσταση των συγκεκριμένων υλικών.

Εάν όλοι οι παραπάνω μάρτυρες δίνουν τα αναμενόμενα αποτελέσματα, η ανάγνωση της αυξοτυπίας και ο αυξοτυπικός χαρακτηρισμός των στελεχών γίνεται όπως περιγράφεται στον Πίνακα 8.

Ανάλυση Πλασμιδιακού Περιεχομένου

Για την ανάλυση του πλασμιδιακού περιεχομένου των στελεχών, καθώς και για τον χαρακτηρισμό των πλασμιδίων αντοχής, έγινε απομόνωση του πλασμιδιακού DNA με ήπια λύση των βακτηριακών κυττάρων σε ισχυρά αλκαλικό περιβάλλον και, στη συνέχεια, ηλεκτροφόρησή του σε πήκτωμα αγαρόζης. Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος των Portnoy & συν., η οποία θεωρείται κατάλληλη για την απομόνωση πλασμιδίων από κλινικά στελέχη (Portnoy et al. 1981). Η μέθοδος, όπως και όλες οι μέθοδοι αλκαλικής λύσης, εκμεταλλεύεται τις δομικές διαφορές μεταξύ πλασμιδιακού και χρωμοσωματικού DNA που οδηγούν σε διαφορετική συμπεριφορά τους κάτω από αλκαλικές συνθήκες. Συγκεκριμένα, στις αλκαλικές συνθήκες, υπό τις οποίες γίνεται η κατεργασία λύσης των κυττάρων, οι υδρογονικοί δεσμοί που συγκρατούν μαζί τις αλυσίδες του δίκλωνου DNA του βακτηρίου θραύονται. Αυτό οδηγεί σε πλήρη και μη αντιστρεπτή αποδιοργάνωση του ανοιχτού κυκλικού και μεγάλου σε μήκος DNA του χρωμοσώματος, αλλά σε μερική μόνον αποδιοργάνωση του υπερελιγμένου πλασμιδιακού DNA, του οποίου οι αλυσίδες αποσυνδέονται, αλλά δεν αποχωρίζονται τελείως. Έτσι, με επαναφορά του ουδέτερου pH στο περιβάλλον κατεργασίας, τα μικρά μόρια των πλασμιδίων επαναδιοργανώνονται, ενώ το χρωμοσωματικό DNA σχηματίζει ένα άτακτο συνοθήλευμα, που απομακρύνεται στη συνέχεια κατά το μεγαλύτερο μέρος του από το παρασκεύασμα κατακρημνιζόμενο με NaCl, με το οποίο σχηματίζει αδιάλυτα σύμπλοκα. Τα παρασκευάσματα υποβάλλονται έπειτα σε μια σειρά κατεργασιών, όπως περιγράφονται παρακάτω, για την απομάκρυνση των συμπλόκων χρωμοσωματικού DNA, υπολειμμάτων πρωτεϊνών και άλλων ανεπιθύμητων κυτταρικών κυτταρικών στοιχείων. Εν τέλει, τα εμπλουτισμένα σε πλασμιδιακό DNA δείγματα ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αγαρόζης. Κατά την ηλεκτροφόρηση, τα διαφορετικού μεγέθους πλασμιδιακά μόρια αναπτύσσουν διαφορετική κινητικότητα, με αποτέλεσμα να διαχωρίζονται στην αγαρόζη, αποκαλύπτοντας, μετά από «χρώση» με αιθίδιο του βρωμίου, τον αριθμό και τα μεγέθη των πλασμιδίων που φιλοξενεί κάθε διακριτό στέλεχος γονοκόκκου. Το αιθίδιο του βρωμίου έχει την ιδιότητα αφενός να παρεμβάλλεται στις αλυσίδες του DNA (intercalating agent) και αφετέρου να φεγγοβολεί στο υπεριώδες φως, κάνοντας έτσι τα πλασμίδια ορατά πάνω στην αγαρόζη

ως φωτεινές κόκκινες ζώνες. Η ανάλυση πλασμιδιακού περιεχομένου διακρίνει τα στελέχη σε Pc-τύπους (από τις λέξεις Plasmid content), ανάλογα με τον συνδυασμό των πλασμιδίων που φιλοξενούν. Παράλληλα, επιτυγχάνει την εντόπιση των πλασμιδίων αντοχής στα PPNG και TRNG στελέχη. Οι διάφοροι τύποι πλασμιδίων αντοχής αναγνωρίζονται από τα μεγέθη τους.

Υλικά

- Ρυθμιστικό διάλυμα TE (50mM Tris-HCl, 10mM EDTA), pH=8,0
- Διάλυμα λύσης (50mM Tris-HCl, 10mM EDTA, 4% w/v SDS) pH=12,4
- 2M Tris-Cl, pH=7,0
- Υδατικό διάλυμα NaCl 5 M
- Υδατικό διάλυμα οξεϊκού νατρίου (CH₃COONa) 3M, pH=5,2
- Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης TBE (89mM Tris-Cl, 2,5 mM EDTA, 89mM βορικό οξύ)
- Διάλυμα χρωστικής κυανού της βρωμοφαινόλης (BPB), συνιστάμενο από BPB (0,07% w/v), φικόλη (20% w/v) και θειικό δωδεκυλικό νάτριο (sodium dodecyl sulphate –SDS, 2% w/v).

Πειραματική διαδικασία

- Εναιώρηση μικροβιακού καλλιεργήματος από στερεό θρεπτικό υλικό σε 60μl ρυθμιστικού διαλύματος TE, ώστε να επιτευχθεί πυκνό εναιώρημα.
- Προσθήκη 600μl φρέσκου διαλύματος λύσης (παρασκευή και ρύθμιση του pH αμέσως πριν την έναρξη του πειράματος) και αργή ανάδευση με παλινδρομικές κινήσεις του χεριού, ώσπου να επιτευχθεί ιξώδες.
- Επώαση επι 20 min σε υδατόλουτρο 37⁰ C
- Προσθήκη 45μl Tris-Cl και ξανά αργή ανάδευση, ώσπου να μειωθεί το ιξώδες.
- Προσθήκη 160μl NaCl 5M. Σύντομη ανακίνηση, ώστε να κατακρημνιστεί το χρωμοσωματικό DNA. Παραμονή σε παγόλουτρο για 1 h.
- Φυγοκέντρηση σε ψύξη στις 12 000 στροφές σε μικροφυγόκεντρο για 15 min
- Μετάγγιση του υπερκείμενου σε καθαρό eppendorf και απόρριψη του ιζήματος

- Προσθήκη ίσου προς το δείγμα όγκου φαινόλης, καλή ανάμιξη (με vortex) και φυγοκέντρηση στις 12 000 rpm για 5 min.
- Μετάγγιση της υπερκείμενης υδατικής φάσης σε νέο erpendorf. Προσθήκη οξεικού νατρίου 3M σε όγκο ίσο προς το 1/10 του δείγματος και απόλυτης αλκοόλης μέχρι πλήρωσης του erpendorf.
- Παραμονή των δειγμάτων στους -20°C – -30°C μέχρι την επόμενη ημέρα
- Φυγοκέντρηση σε ψύξη στις 12 000 rpm για 15 min, απόρριψη του υπερκείμενου και προσθήκη 200ml αλκοόλης 70%. Παραμονή επί 10 min σε πάγο.
- Φυγοκέντρηση σε ψύξη στις 12 000 rpm για 15 min, απόρριψη του υπερκείμενου, ξήρανση του ιζήματος σε αντλία κενού και αναδιάλυση του ιζήματος με 25ml ρυθμιστικού διαλύματος TE.
- Προσθήκη 5ml διαλύματος χρωστικής BPB στα δείγματα και οριζόντια ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 0,7%, βυθισμένο σε TBE 0,5x, στα 90 Volts 2,5-3 h.
- Χρώση του πηκτώματος αγαρόζης με διάλυμα αιθιδίου του βρωμίου 0,5-1 mg/l, και παρατήρηση/φωτογράφιση των ζωνών που εμφανίζονται σε τράπεζα υπεριώδους φωτός (UV).

Ανάλυση Γενομικού DNA σε Ηλεκτροφόρηση Παλλόμενου Πεδίου (PFGE)

Στη μέθοδο αυτή χρησιμοποιούνται περιοριστικά ένζυμα που αναγνωρίζουν σπάνιες αλληλουχίες βάσεων, κατανεμημένες σε απομακρυσμένες θέσεις πάνω στο γενομικό DNA (rare cutters), με αποτέλεσμα τη διάσπαση του χρωμοσωματικού DNA σε λίγα και μεγάλα θραύσματα που είναι εύκολο να συγκριθούν από στέλεχος σε στέλεχος. Ο διαχωρισμός των μεγάλων αυτών θραυσμάτων απαιτεί ιδιαίτερες συνθήκες ηλεκτροφόρησης και επιτυγχάνεται με κυκλική εναλλαγή της κατεύθυνσης του ηλεκτρικού πεδίου σε ειδικό σύστημα ηλεκτροφόρησης παλλόμενου πεδίου (PFGE, Pulsed Field Gel Electrophoresis).

Κατά την διαδικασία απομόνωσης ολικού DNA για την PFGE, στο πρώτο στάδιο γίνεται η παγίδευση των βακτηριακών στελεχών σε πλακίδια αγαρόζης. Τα κύτταρα λύνονται με ειδική επεξεργασία των πλακιδίων αγαρόζης και, στη συνέχεια,

τα υπολείμματα των ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν και τα ανεπιθύμητα παραπροϊόντα αυτής της διαδικασίας απομακρύνονται με εντατικό πλύσιμο, έτσι ώστε στα πλακίδια να παραμείνει παγιδευμένο μόνο το DNA. Ακολουθεί πέψη του DNA με ένζυμα περιορισμού που επιλέγονται ανάλογα με το είδος του βακτηρίου, έτσι ώστε να δίνουν σχετικά μικρό αριθμό θραυσμάτων.

Για τον διαχωρισμό των θραυσμάτων του DNA χρησιμοποιούνται διάφορα συστήματα παλλόμενου πεδίου. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το σύστημα ηλεκτροφόρησης CHEF (contour-clamped homogeneous electric fields) (Chu et al. 1986). Το συγκεκριμένο σύστημα χρησιμοποιεί μια εξαγωνική διάταξη από ηλεκτρόδια, για να δημιουργήσει ομοιογενή ηλεκτρικά πεδία σε 120⁰ μεταξύ τους, οδηγώντας τα θραύσματα DNA κατά μήκος μιας ευθείας χωρίς παραμόρφωση.

Η μεθοδολογία PFGE για την τυποποίηση στελεχών γονοκόκκου εφαρμόστηκε όπως περιγράφεται από τους Xia και συν. (Xia et al. 1995), με τροποποιήσεις. Για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων και την ταξινόμηση των στελεχών σε PFGE- τύπους χρησιμοποιήθηκαν τα διεθνώς αποδεκτά κριτήρια των Tenover και συν (Tenover et al. 1995) (Πίνακας 9)

Πίνακας 9: Κριτήρια ταξινόμησης PFGE-τύπων[@]

Κατηγορία	Αριθμός γενετικών διαφορών σε σύγκριση με επιδημικό στέλεχος	Τυπικός αριθμός διαφορών σε ζώνες σε σύγκριση με επιδημικό στέλεχος	Επιδημιολογική σημασία
Όμοια	0	0	Επιδημική συσχέτιση
Πολύ συγγενικά στελέχη	1	2-3	» » » »
Πιθανώς συγγενικά στελέχη	2	4-6	Πιθανή επιδημική συσχέτιση
Διαφορετικά	=3	=7	Καμμία συσχέτιση

[@] Tenover et al. 1995

Υλικά

- Σύστημα Ηλεκτροφόρησης τύπου CHEF-DRIII (Biorad Laboratories, Hercules CA, USA)
- Διάλυμα SE: 75mM NaCl, 25mM EDTA, pH=8,0
- Αγαρόζη χαμηλού σημείου τήξης Sea-Plaque (Sea-Plaque, FMC, Bioproducts, Rockland, USA).
- Αγαρόζη προδιαγραφών PFGE (Pulsed Field Centrified Agarose της Biorad Laboratories, CA, USA)
- Διάλυμα TE: 10mM Tris-Cl, 1mM EDTA, pH=8.0
- Διάλυμα λύσης: 10mM Tris-Cl, 1mM EDTA, 1% SDS, 1 mg/ml πρωτεΐνάση K, pH=8,0
- Περιοριστική ενδονουκλεάση *Spe* I (*Bcu*I της εταιρείας Fermentas)
- TBE (44,5mM Trizma base, 44,5mM boric acid, 1,25mM EDTA)

Πειραματική διαδικασία

(A) Ενσωμάτωση των βακτηρίων σε πλακίδια αγαρόζης

1. Εναιώρηση μικροβιακού καλλιεργήματος σε 1ml διάλυμα SE, ώστε να σχηματιστεί κυτταρικό εναιώρημα θολερότητας N^ο9 της κλίμακας McFarland.
2. Ανάμιξη του κυτταρικού εναιωρήματος με λυωμένη αγαρόζη Sea-Plaque (2% σε SE) σε αναλογία 1:1. Πριν από την ανάμιξη, τόσο το διάλυμα της αγαρόζης όσο και το κυτταρικό εναιώρημα προθερμαίνονται σε υδατόλουτρο, ώστε να έχουν την ίδια θερμοκρασία (56°C).
3. Γέμισμα ειδικών καλουπιών με το μίγμα και παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου ή στο ψυγείο για 30 min, ώστε να πήξει η αγαρόζη.

(B) Λύση των βακτηρίων στα πλακίδια αγαρόζης

1. Τοποθέτηση των πλακιδίων αγαρόζης με το ενσωματωμένο βακτηριακό εναιώρημα κάθε δείγματος σε χωριστό φιαλίδιο που περιέχει 2ml διαλύματος λύσης.
2. Επώση των δειγμάτων υπό ανακίνηση σε υδατόλουτρο 50°C για 24 h.
Αφαίρεση και ανανέωση του διαλύματος λύσης με προσθήκη 2ml και επώση υπό ανακίνηση στους 50°C για 24 ώρες h στο υδατόλουτρο.

3. Αφαίρεση του διαλύματος λύσης και προσθήκη 2ml ρυθμιστικού διαλύματος TE και επώαση στους 4°C επί 30 min.
4. Αφαίρεση του ρυθμιστικού διαλύματος TE και προσθήκη 2ml ρυθμιστικού διαλύματος TE και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου επί 1h.
5. Στη συνέχεια, ακολουθούν έξι εκπλύσεις των δειγμάτων με ρυθμιστικό διάλυμα TE ανά 20 min. Μπορούμε να φυλάζουμε τα δείγματα στο TE στους 4°C.

(Γ) Πέψη του DNA

1. Σε ισάριθμους με τα προς εξέταση δείγματα μικροσωλήνες τύπου erppendorf μοιράζουμε από 100μl του ρυθμιστικού διαλύματος πέψης που προσφέρεται από την κατασκευάστρια εταιρεία του ενζύμου *Spe I*, αφού πρώτα το έχουμε αραιώσει με απεσταγμένο νερό σε αναλογία 1:10, ώστε να έρθει σε συγκέντρωση εργασίας 1x.
2. Τοποθετούμε στα erppendorf τεμάχια 3mm από τα πλακίδια αγαρόζης πάχους 3mm, – προσθέτουμε το περιοριστικό ένζυμο *SpeI* (20 Units/δείγμα) και επωάζουμε σε υδατόλουτρο στους 37°C για 18h.

(Δ) Προετοιμασία, ηλεκτροφόρηση και χρώση του πηκτώματος αγαρόζης

1. Πλύσιμο των τεμαχίων αγαρόζης με ρυθμιστικό διάλυμα 0,5X TBE.
2. Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης PFGE (1% w/v σε διάλυμα TBE).
3. Τοποθέτηση των δειγμάτων στα πηγάδια της αγαρόζης και γέμισμα αυτών με αγαρόζη Sea-Plaque (1% σε SE). Παραμονή για 30 min στους 4°C.
4. Πλήρωση της συσκευής ηλεκτροφόρησης με διάλυμα TBE, ρύθμιση των παραμέτρων ηλεκτροφόρησης και ηλεκτροφόρηση στις εξής συνθήκες:
 - a. Θερμοκρασία ηλεκτροφόρησης 14°C.
 - b. Αρχικός χρόνος εναλλαγής ρεύματος (initial switching time): 5 sec
 - c. Τελικός χρόνος εναλλαγής ρεύματος (final switching time): 30 sec
 - d. Χρόνος ηλεκτροφόρησης (running time): 20 h
 - e. Γωνία εναλλαγής ρεύματος (included angle): 120°
 - f. Διαβάθμιση ηλεκτρικού ρεύματος (voltage gradient): 6 volts/cm
5. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, χρώση του πηκτώματος αγαρόζης σε διάλυμα αιθιδίου του βρωμίου (1μg/ml σε απεσταγμένο νερό), παρατήρηση και φωτογράφιση σε τράπεζα υπεριώδους φωτός (UV).

Μικρής Κλίμακας Απομόνωση Γενομικού DNA (Miniprep)

Γενομικό DNA απομονώθηκε από τα TRNG και τα QRNG στελέχη γονοκόκκου, προκειμένου να χρησιμοποιηθεί σε αλυσιδωτές αντιδράσεις πολυμεράσης (PCR) για την ανίχνευση και πολλαπλασιασμό των γονιδίων *telM*, *gyrA* και *parC*.

Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος των Murray & Thomson (1980), με την οποία επιτυγχάνονται μικρού όγκου παρασκευάσματα (mini preps) γενομικού DNA καλής ποιότητας από μεγάλους αριθμούς στελεχών σε σχετικά λίγο χρόνο. Η μέθοδος χρησιμοποιεί SDS για τη λύση των βακτηριακών κυττάρων, πρωτεΐνάση K για την απομάκρυνση των πρωτεϊνών και διάλυμα βρωμιούχου ακετυλο-τιμεθυλο-αμμωνίου (CTAB) σε NaCl, για την κατακρήμνιση και απομάκρυνση πολυσακχαριτών και πρωτεϊνικών υπολλειμάτων των κυττάρων. Το γενομικό DNA που παραλαμβάνεται με τον τρόπο αυτό είναι επαρκώς άθικτο και ελεύθερο από στοιχεία που θα μπορούσε να αναστείλουν τη δράση περιοριστικών ενδονουκλεασών σε περαιτέρω ανάλυση του DNA και επίσης κατάλληλο για να χρησιμοποιηθεί σε PCR.

Υλικά

- Ρυθμιστικό διάλυμα TE (10mM Tris-Cl, 1mM EDTA, pH 8)
- 10% SDS
- Διάλυμα 20mg/mL πρωτεΐνάση K
- 5M NaCl
- Διάλυμα CTAB/NaCl (10% CTAB σε 0.7M NaCl)
- 24:1 Χλωροφόρμιο/ισοαμυλική αλκοόλη
- 25:24:1 Φαινόλη/χλωροφόρμιο/ισοαμυλική αλκοόλη
- Ισοπροπανόλη
- Διάλυμα αιθανόλης 70% σε H₂O

Πειραματική διαδικασία

- Παρασκευή πυκνού εναιωρήματος με αναδιάλυση στερεής καλλιέργειας γονοκόκκου σε 567μl ρυθμιστικού διαλύματος TE. Προσθήκη 30μl διαλύματος SDS και 3μl πρωτεΐνάσης K και επώαση σε υδατόλουτρο στους 37°C για 1 h.
- Προσθήκη 80μl διαλύματος CTAB/NaCl και επώαση σε υδατόλουτρο στους 65°C για 10 min.

- Προσθήκη ίσου όγκου (700-800μl) διαλύματος χλωροφορμίου/ισοαμυλικής αλκοόλης και φυγοκέντρωση σε μικροφυγόκεντρο στις 2000 rpm για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Παραλαβή του υπερκείμενου, προσθήκη ίσου όγκου διαλύματος φαινόλης/χλωροφορμίου/ισοαμυλικής αλκοόλης και φυγοκέντρωση στις 12000 rpm για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου
- Παραλαβή του υπερκείμενου και προσθήκη ισοπροπανόλης σε όγκο 0,6x του όγκου του δείγματος
- Αργή ανάδευση με παλινδρομικές κινήσεις, ώσπου να κατακρημνιστεί ένα ινώδες ίζημα DNA και φυγοκέντρωση στις 12 000 rpm για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου. Απόρριψη του υπερκείμενου.
- Προσθήκη 200μl αιθανόλης 70% και φυγοκέντρωση στις 12 000 rpm για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου. Απόρριψη του υπερκείμενου.
- Εήρανση του ιζήματος σε αντλία κενού και αναδιάλυση σε 100μl ρυθμιστικού διαλύματος TE.

Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction –PCR) είναι μέθοδος για την *in vitro* αντιγραφή και πολλαπλασιασμό συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA. Χρησιμοποιεί επαναλαμβανόμενους κύκλους σύνθεσης DNA με εκκίνηση από ολιγονουκλεοτίδια – εκκινητές (primers) που συνδέονται στις συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA-μήτρας. Στη στοιχειώδη μορφή PCR, κάθε επαναλαμβανόμενος κύκλος περιλαμβάνει τα εξής στάδια: (α) αποδιάταξη (denaturation) των δίκλωνων μορίων DNA-μήτρας σε υψηλή θερμοκρασία, (β) πρόσδεση (annealing) των εκκινητών στην DNA-μήτρα και (γ) επιμήκυνση (extension) των αλυσίδων του DNA μέσω μιας DNA πολυμεράσης παρουσία τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs).

Η μέθοδος PCR εφαρμόστηκε για

(A) Ανίχνευση και πολλαπλασιασμό του γονιδίου *tetM* από στελέχη γονοκόκκου με υψηλού επιπέδου πλασμιδιακή αντοχής στην τετρακυκλίνη (TRNG στελέχη) με σκοπό το χαρακτηρισμό του γονιδίου.

(B) Πολλαπλασιασμό τμημάτων των γονιδίων *gyrA* και *parC* που συμπεριλάμβαναν την περιοχή που καθορίζει την αντοχή στις κινολόνες (περιοχή QRDR, από τα αρχικά των λέξεων Quinolone-Resistance-Determining-Region)

Υλικά

- Ολιγονουκλεοτίδια. Τα ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν ως εκκινητές (primers) περιγράφονται στον Πίνακα 10.
- Taq DNA πολυμεράση (MBI Fermentas)
- Τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (MBI Fermentas)
- Θερμικός κυκλοποιητής (Progene, Techne, Cambridge, U.K)

Πίνακας 10

Γονίδιο	Ολιγονουκλεοτίδια (5' → 3')	Θέσεις σύνδεσης	Αριθμός καταχώρησης Gen Bank
<i>tetM</i>	TetM1:TTTAGCTCATGTTGATGCAG	2004-2023	UO8812
	TetM2:CTTTATCTATCCGACTATTTGG	3850-3871	
<i>gyrA</i>	GA1:AGCTATCTCGACTACGCC	82-99	UO8817
	GA2:CCGAAACTGTCTTGCGAG	1002-1019	
<i>parC</i>	PAR1:TCTCGAATACGCCATGAGCG	75-94	AE004969
	PAR2:ATTGTGCGACGGAATCTCGG	551-570	

Πειραματική διαδικασία

(A) Ανίχνευση και πολλαπλασιασμός *tetM* γονιδίου

Χρησιμοποιήθηκαν οι ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές Tet-M1 και Tet-M2 που συνδέονται σε ένα γονιδιακό τμήμα 1867 bp μεταξύ των νουκλεοτιδικών θέσεων 2004 και 3871 του *tetM* γονιδίου (GenBank UO8812). Η αντίδραση της PCR πραγματοποιήθηκε σε 50 µl ρυθμιστικού διαλύματος αντίδρασης 1x, που περιείχε 1,5 mM MgCl₂, 30 pmole από κάθε εκκινητή, 200µM από κάθε τριφωσφορικό δεοξυριβονουκλεοτίδιο, 2U Taq DNA πολυμεράση και 100ng γενωμικού DNA. Ο πολλαπλασιασμός των γονιδιακών τμημάτων έγινε με την χρήση θερμικού κυκλοποιητή (Progene, Techne, Cambridge, U.K) υπό τις ακόλουθες συνθήκες:

- (1) Αποδιάταξη DNA (95⁰C, 5min)
- (2) 35 κύκλοι αποδιάταξης DNA (94⁰C για 1min), σύνδεσης εκκινητών με DNA-μήτρα (58⁰C, 1min) και πολυμερισμού (72⁰C, 2min)
- (3) Τελικό στάδιο πολυμερισμού (72⁰C, 10min)

(B) Ανίχνευση και πολλαπλασιασμός τμημάτων των γονιδίων *gyrA* και *parC*

Για το *gyrA* γονίδιο χρησιμοποιήθηκαν οι ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές GA1 και GA2 που συνδέονται σε ένα γονιδιακό τμήμα 937 bp μεταξύ των νουκλεοτιδικών θέσεων 82 και 3871 του γονιδίου (GenBank UO8817). Για το *parC* γονίδιο χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές PAR1 και PAR2 που συνδέονται σε γονιδιακό τμήμα 495 bp μεταξύ των νουκλεοτιδικών θέσεων 75 και 570 του γονιδίου *gyrA* (GenBank AE004969). Η αντίδραση της PCR πραγματοποιήθηκε σε 100μl ρυθμιστικού διαλύματος αντίδρασης, που περιείχε 2 mM MgCl₂, 50 pmole από κάθε εκκινητή, 200μM από κάθε τριφωσφορικό δεοξυριβονουκλεοτίδιο, 2,5 U Taq DNA πολυμεράση και 100ng γενωμικού DNA. Ο πολλαπλασιασμός των γονιδιακών τμημάτων έγινε με την χρήση θερμικού κυκλοποιητή στις εξής συνθήκες:

- (1) Αρχική αποδιάταξη του DNA (95⁰C, 5 min)
- (2) 30 κύκλοι αποδιάταξης DNA (94⁰C 1 min), σύνδεσης εκκινητών με DNA-μήτρα (60⁰C για 30 sec) και πολυμερισμού (72⁰C για 1 min).
- (3) Τελικό στάδιο πολυμερισμού των αλυσίδων (72⁰C, 10 min)

Χαρακτηρισμός *tetM* γονιδίου με ανάλυση πολυμορφισμού περιοριστικών θραυσμάτων (RFLP)

Η ανάλυση πλασμιδιακού ή χρωμοσωματικού DNA ή και συγκεκριμένων γονιδίων με περιοριστικές ενδονουκλεάσες μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη σύγκριση αλληλουχιών DNA και τον καθορισμό των παραλλαγών παρομοίων γονιδίων ή τμημάτων DNA. Η μέθοδος αυτή, που ονομάζεται ανάλυση πολυμορφισμού μήκους σε θραύσματα περιορισμού (Restriction Fragment Length Polymorphism –RFLP) βασίζεται στη σύγκριση του αριθμού και του μεγέθους των θραυσμάτων που δημιουργούνται από την πέψη του DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Εδώ η με-

θοδος εφαρμόστηκε για την ανάλυση του DNA των *tetM* γονιδίων των TRNG στελεχών με την περιοριστική ενδονουκλεάση MspI, με στόχο την τυποποίηση των γονιδίων ως αμερικανικού, ολλανδικού ή άλλου τύπου (Gascoyne 1991 & 1994).

Υλικά και Πειραματική Διαδικασία

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε 30μl ρυθμιστικού διαλύματος 1X NEB2 (50μM NaCl, 10mM Tris-HCl, 10mM MgCl₂ 1mM dithiothreitol –NEB2 Biolabs, New England) που περιείχε 20 U περιοριστικής ενδονουκλεάσης Msp I (Biolabs, New England) και 100ng γενωμικού DNA. Ακολούθησε επώαση στους 37⁰C σε υδατόλουτρο για μία ώρα. Η εργασία ολοκληρώθηκε με ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της αντίδρασης σε πήκτωμα αγαρόζης. Ακολούθησε χρώση του πηκτώματος σε διάλυμα αιθιδίου του βρωμίου και παρατήρησηση/φωτογράφιση σε υπεριώδες φως.

Ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των προϊόντων της PCR (PCR-sequencing)

Η ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας έγινε με την μέθοδο Sanger (Sanger et al. 1977), η οποία επιτυγχάνει την *in vitro* σύνθεση DNA αλληλουχίας συμπληρωματικής με αυτή του DNA που χρησιμοποιείται ως μήτρα. Η ανάλυση νουκλεοτιδικής αλληλουχίας έγινε απ'ευθείας από τα προϊόντα της PCR (PCR-sequencing) με το πρωτόκολλο ABI 377 από την Applied Biosystems (Foster City, CA, USA). Ως εκκινητές χρησιμοποιήθηκαν τα ολιγονουκλεοτίδια GA1 για το γονίδιο *gvrA* και PAR1 για το γονίδιο *parC* (Πίνακας 10).

Στατιστική Ανάλυση

Οι τάσεις των ετησίων συχνοτήτων απομόνωσης στελεχών γονοκόκκου ανά κατηγορία ευαισθησίας προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων (least squares, linear model). Ως κριτήριο συσχέτισης ποιοτικών χαρακτήρων χρησιμοποιήθηκε η στατιστική δοκιμασία χ^2 .

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΠΛΗΘΥΣΜΙΑΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΓΟΝΟΡΡΟΙΑΣ**1. Επίπτωση Γονόρροιας**

Κατά την περίοδο 1998–2002 αναφέρθηκαν στο Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Γονοκόκκου από τα δύο συνεργαζόμενα νοσοκομεία (Ανδρέας Συγγρός», Αθήνα, και Νοσοκομείο Αφροδισίων και Δερματικών Νοσημάτων Θεσσαλονίκης, 689 περιστατικά γονοκοκκικής λοίμωξης. Με εξαίρεση 21 περιστατικά που αφορούσαν γυναίκες, τα υπόλοιπα 668 αφορούσαν περιπτώσεις ανδρικής γονοκοκκικής ουρηθρίτιδας. Ένα επιπλέον περιστατικό, που αναφέρθηκε από το Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων, αφορούσε νεογνική οφθαλμία (Πίνακας 11).

Πίνακας 11: Αριθμός περιστατικών γονοκοκκικής λοίμωξης που αναφέρθηκαν και στελεχών που εστάλησαν στο ΕΚΑΓ από τα συνεργαζόμενα νοσοκομεία κατά την πενταετία 1998-2002

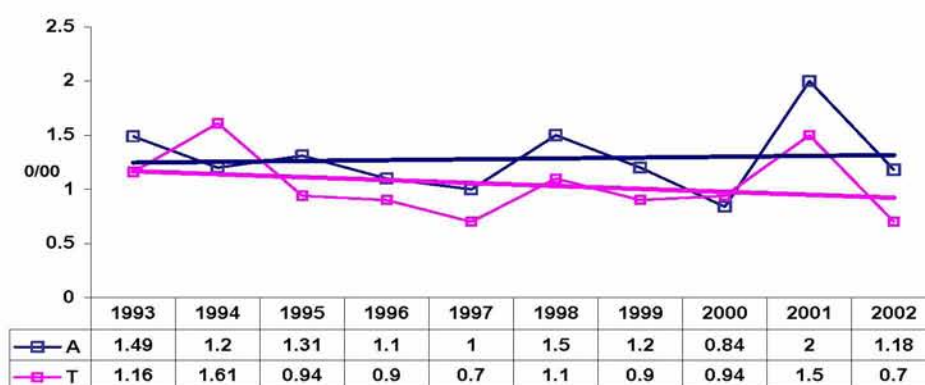
Έτος	Νοσοκομείο	Κίνηση Εξωτερικών Ιατρείων ⁽¹⁾	Αριθμός περιστατικών	Αριθμός στελεχών ⁽²⁾
1998	Α. Συγγρός	65.650	100	91
	Α&Δ Νόσων Θεσ/κης	40.133	46	21
	Π.Γ.Ν Ιωαννίνων	δ.α.	1 (νεογνό)	1
1999	Α. Συγγρός	77.728	95	85
	Α&Δ Νόσων Θεσ/κης	30729	29	13
2000	Α. Συγγρός	83.666	70	61
	Α&Δ Νόσων Θεσ/κης	29640	28	15
2001	Α. Συγγρός	66.257	135	127
	Α&Δ Νόσων Θεσ/κης	28.084	42	13
2002	Α. Συγγρός	77.089	118	88
	Α&Δ Νόσων Θεσ/κης	36.943	26	11
Σύνολο			690	526

(1) Σύνολο εξετασθέντων στα εξωτερικά ιατρεία ανά έτος και νοσοκομείο αντίστοιχα.

(2) Από τις υπόλοιπες περιπτώσεις γονόρροιας είτε δεν έγινε καλλιέργεια είτε τα στελέχη που απομονώθηκαν δεν επέζησαν για να εξετασθούν.

Αποτελέσματα

Η επίπτωση της γονόρροιας εκτιμήθηκε σε ετήσιες συχνότητες για την Αθήνα και τη Θεσσαλονίκη, με βάση την κίνηση των εξωτερικών ιατρείων του νοσοκομείου που εκπροσώπησε την κάθε πόλη. Συγκεκριμένα, η ετήσια επίπτωση υπολογίστηκε ως ο αριθμός των κρουσμάτων με διάγνωση γονόρροιας επί τοις χιλίοις του αριθμού των εξωτερικών ασθενών που προσήλθαν για εξέταση για οποιοδήποτε λόγο στο αντίστοιχο νοσοκομείο κατά τη διάρκεια του έτους. Οι ετήσιες συχνότητες που υπολογίστηκαν με τον τρόπο αυτό για την περίοδο 1998-2002, αποδίδονται στην *Εικόνα 9*, σε συνέχεια των τιμών ετήσιας επίπτωσης που είχαν υπολογιστεί στο ΕΚΑΓ με τον ίδιο τρόπο και για τα ίδια νοσοκομεία κατά την προηγούμενη πενταετή περίοδο. Κατά την υπό μελέτη περίοδο, η ετήσια συχνότητα στην Αθήνα κυμάνθηκε από 0,84 έως 2 ‰, ενώ οι τιμές που σημειώθηκαν στη Θεσσαλονίκη ήταν κατά τι χαμηλότερες (0,7–1,1‰). Οι αυξομειώσεις που παρατηρήθηκαν δεν ήταν στατιστικά σημαντικές, ούτε απέκλιναν από την τάση της γονόρροιας που είχε διαμορφωθεί κατά τα προηγούμενα έτη.



Εικόνα 9. Ετήσια επίπτωση γονόρροιας κατά την δεκαετία 1993–2002

A: Νοσοκομείο «Ανδρέας Συγγρός», Αθήνα

T: Νοσοκομείο Αφροδισίων & Δερματικών Νόσων, Θεσσαλονίκη

Οι ευθείες δείχνουν την επιδημιολογική τάση

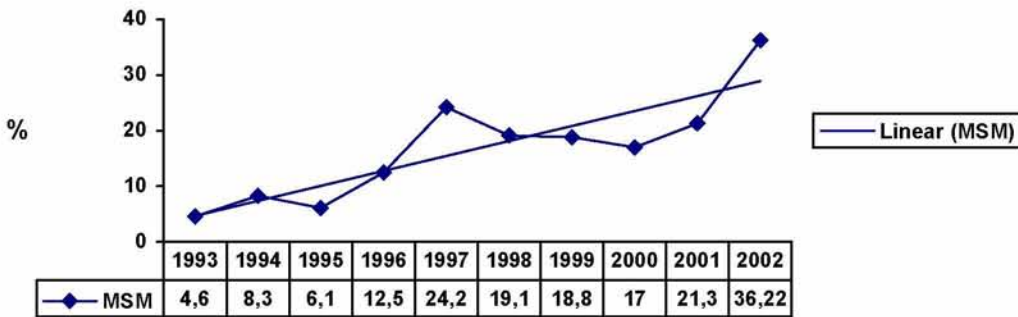
2. Σύνθεση νοσήσαντος πληθυσμού

Τα χαρακτηριστικά του πληθυσμού που νόσησε από γονόρροια εκτιμήθηκαν από τα ιστορικά των ασθενών.

Από 597 άρρενες ασθενείς που δήλωσαν το σεξουαλικό τους προσανατολισμό, οι 137 (22,9%) ήταν ομο- είτε αμφιφυλόφιλοι (MSM).

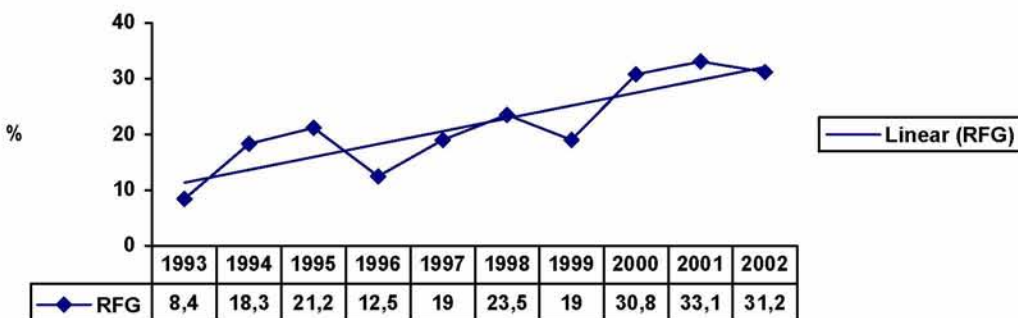
Από τα δημογραφικά στοιχεία των ασθενών και από ότι ανέφεραν οι ίδιοι σχετικά με τις σεξουαλικές επαφές κατά τις οποίες θεωρούσαν ότι μολύνθηκαν, διαπιστώθηκε ότι από 620 ασθενείς που έδωσαν αυτές τις πληροφορίες, οι 247 (39,8%) είτε ήταν οι ίδιοι αλλοδαποί είτε δήλωσαν ως πιθανότερη πηγή λοίμωξης σεξουαλικές επαφές με αλλοδαπούς. Από το ποσοστό αυτό, το 6,9% αφορούσε απόκτηση της λοίμωξης στο εξωτερικό, 5% αναφερόταν σε επαφές με τον ένα τουλάχιστον σεξουαλικό σύντροφο μη-μόνιμο κάτοικο της Ελλάδας (τουρίστες, ναυτικοί και λοιποί διερχόμενοι), ενώ το υπόλοιπο 27,9% αφορούσε σεξουαλικές επαφές, στις οποίες ο ένας τουλάχιστον από τους συντρόφους ήταν μόνιμα εγκατεστημένος στην Ελλάδα οικονομικός μετανάστης (Πίνακας 12).

Τα ποσοστά των MSM και των οικονομικών μεταναστών στον πληθυσμό των ασθενών, ανά έτος και σε συνέχεια προηγούμενων ετών, αποδίδονται σε γραφικές παραστάσεις, στις *Εικόνες 10 και 11*, αντίστοιχα. Σύμφωνα με τα στοιχεία αυτά, η παρουσία των δύο αυτών ομάδων υψηλού κινδύνου στο γονορροϊκό πληθυσμό της υπό μελέτη περιόδου σημείωσε στατιστικά σημαντική αύξηση σε σχέση με τα προηγούμενα έτη.



Εικόνα 10. Αύξηση MSM στον πληθυσμό που νόσησε από γονόρροια κατά την περίοδο 1993-2002

Ποσοστό (%) επί του ετήσιου αριθμού περιστατικών ανδρικής γονόρροιας, για τα οποία υπήρχαν πλήρη επιδημιολογικά ιστορικά. Η ευθεία γραμμή (linear MSM) δείχνει την αυξητική τάση παρουσίας ομο-/αμφιφυλοφίλων.



Εικόνα 11. Αύξηση μεταναστών στον πληθυσμό που νόσησε από γονόρροια κατά την περίοδο 1993-2002

Ποσοστό (%) επί του ετήσιου αριθμού περιστατικών γονόρροιας, για τα οποία υπήρχαν πλήρη επιδημιολογικά ιστορικά. Η ευθεία γραμμή (linear RFG) δείχνει την αυξητική τάση της παρουσίας μεταναστών.

Πίνακας 12. Συμμετοχή αλλοδαπού στοιχείου στο ελληνικό δείγμα γονορροϊκών ασθενών της περιόδου 1998 – 2002

Έτος (αριθμός ιστορικών)	Γεωγραφική περιοχή απόκτησης λοίμωξης ή προέλευσης σεξουαλικών συντρόφων (αριθμός περιστατικών)					
	Εξωτερικό ¹	Χώρα	Αλλοδαποί ²	Εθνικότητα	Μετανάστες ³	Εθνικότητα
1998 (n=119)	10 (8,4%)	<i>Αφρική, Κολομβία, Κούβα, Ολλανδία, Ρουμανία, Ρωσία, Σκόπια, Τουρκία, Ταϊλάνδη, Φιλιππίνες</i>	10 (8,4%)	<i>Αγγλία (2), Γερμανία (1), Ισπανία (1), Κύπρος (1) Αγνωστο (5)</i>	28 (23,5%)	<i>Αλβανία (7), Αλγερία (1), Βουλγαρία (4), Ουκρανία (1), Πολωνία (4), Ρουμανία (5), Ρωσία (5), Τουρκία (1)</i>
1999 (n=116)	8 (6,9%)	<i>Βουλγαρία (1), Βραζιλία (1), Κύπρος (1), Ρουμανία (2), Ταϊλάνδη (2), Τουρκία (1)</i>	9 (7,8%)	<i>Αγγλία, Γαλλία, Ινδονησία, Ιταλία Αγνωστο (5)</i>	22 (19%)	<i>Αλβανία (8), Βουλγαρία (1), Γκάνα (1), Ουγγαρία (1), Ρουμανία (3), Ρωσία (4), Σκόπια (1), Τουρκία (1), Πακιστάν (2)</i>
2000 (n=94)	7 (7,4%)	<i>Αλβανία (1), Βουλγαρία (1), Ιταλία (1), Κούβα (1), Μπαγκλαντές (1), Ρουμανία (2)</i>	4 (4,2%)	<i>Ιταλία (1) Αγνωστο (3)</i>	29 (30,8%)	<i>Αλβανία (6), Βουλγαρία (4), Ιρακ (3), Καζακστάν (1), Μολδαβία (2), Ουκρανία (3), Ρουμανία (1), Ρωσία (9)</i>
2001 (n=163)	10 (6,1%)	<i>Αυστραλία (1), Ολλανδία (2), Ουγγαρία (1), Ρωσία (2), Σιγκαπούρη (1), Ταϊλάνδη (2), Τουρκία (1)</i>	5 (3,1%)	<i>Αγγλία (1), Γαλλία (1), Τουρκία (1) Αγνωστο (2)</i>	54 (33,1%)	<i>Αλβανία (21), Βουλγαρία (2), Γεωργία (1), Ιρακ(1), Ινδία (2), Κεϋλάνη (3), Κουρδιστάν (1), Μπαγκλαντές (3), Ουκρανία (4), Πακιστάν (2), Ρουμανία (2), Ρωσία (11), Συρία (1)</i>
2002 (n=128)	8 (6,2%)	<i>Αγγλία, Αλβανία, Βουλγαρία, Ιταλία, Ισραήλ, Ολλανδία, Ταϊλάνδη, Τουρκία</i>	3 (2,3%)	<i>Η.Π.Α. (2), Κύπρος (1)</i>	40 (31,2%)	<i>Αλβανία (11), Βουλγαρία (2), Ιρακ (3), Ιραν (2), Ουκρανία (2), Πακιστάν (2), Πολωνία (3), Ρουμανία (6), Ρωσία (8), Σκόπια (1)</i>
Σύνολο (n=620)	43 (6,9%)		31 (5%)		173 (27,9%)	

¹ Δηλωμένη απόκτηση λοίμωξης στο εξωτερικό, ανεξαρτήτως εθνικότητας ή προέλευσης των εμπλεκόμενων σεξουαλικών συντρόφων² Σεξουαλικές επαφές με τον ένα τουλάχιστον από τους συντρόφους αλλοδαπό, μη εγκατεστημένο στην Ελλάδα (ναυτικοί, τουρίστες, επισκέπτες)³ Σεξουαλικές επαφές με τον ένα τουλάχιστον από τους συντρόφους οικονομικό μετανάστη, μόνιμα εγκατεστημένο στην Ελλάδα.

ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

1. Ευαισθησία Στελεχών Γονοκόκκου στα Αντιβιοτικά

Τα αποτελέσματα από τον έλεγχο ευαισθησίας των 526 στελεχών γονοκόκκου που απομονώθηκαν κατά την πενταετία 1998-2002 δίνονται στον Πίνακα 13, σε ετήσιες συχνότητες κατά κατηγορία αντοχής/ευαισθησίας, καθώς και σε τιμές MIC₅₀, MIC₉₀.

Με εξαίρεση την σπεκτινομυκίνη και την κεφοταξίμη, για όλα τα υπόλοιπα από τα αντιβιοτικά που ελέγχθηκαν παρατηρήθηκαν σημαντικά ποσοστά αντοχής και, επιπλέον, υψηλά ποσοστά στελεχών με μέτρια ευαισθησία. Η σπεκτινομυκίνη και η κεφοταξίμη, διατήρησαν σταθερά υψηλή αποτελεσματικότητα έναντι του συνόλου των γονοκόκκων που απομονώθηκαν. (ευαισθησία 100%).

Οι ετήσιες συχνότητες απομόνωσης πενικιλινασοπαραγωγών (PPNG) στελεχών, με πλασμιδιακή, υψηλού επιπέδου αντοχή στην πενικιλίνη, εμφανίστηκαν αυξημένες, κυμαινόμενες από 11,4% έως 16,3% (13,3% στο σύνολο των στελεχών, έναντι 5,9% κατά την προηγούμενη πενταετία). Η παρουσία TRNG στελεχών με πλασμιδιακή αντοχή στην τετρακυκλίνη παρέμεινε στα ίδια περίπου επίπεδα (2-6,2% κατ'έτος και 4,4% συνολικά, έναντι 2-6,1% κατ'έτος και 3,4% συνολικά κατά την προηγούμενη πενταετία).

Η αντοχή στην σιπροφλοξακίνη, που χρησιμοποιείται κατά κανόνα στη βιβλιογραφία ως κινολόνη αναφοράς για την περιγραφή της αντοχής στις νεότερες κινολόνες, αυξήθηκε σταδιακά από 1% το 1999 (1%) σε 6,1% το 2002. Η νορφλοξακίνη επέδειξε χαμηλότερη δραστηριότητα από την σιπροφλοξακίνη, με υψηλότερες ετήσιες συχνότητες αντοχής. Ένα επιπλέον ποσοστό των στελεχών γονοκόκκου που απομονώθηκαν κατά την υπό μελέτη περίοδο είχαν μέτρια ή απλώς μειωμένη ευαισθησία στις νεότερες κινολόνες. Με κριτήριο την αντοχή στο ναλιδιζικό οξύ, που αποκαλύπτει την παρουσία μεταλλαγών γυράσης και σε στελέχη με τιμές MIC κάτω από τα όρια αντοχής είτε ακόμα και κάτω από τα όρια μέτριας ευαισθησίας στις νεότερες κινολόνες, η εξέλιξη της αντοχής στις κινολόνες ήταν διαφορετική, με μέγιστη συχνότητα απομόνωσης ανθεκτικών στις κινολόνες (QRNG) στελεχών 18,6% το 1998 και χαμηλότερες στη συνέχεια. Η διαφορά οφείλεται σε ένα άθροισμα QRNG στελεχών που εξαπλώθηκαν μεταξύ των ετών 1996-1999 και είχαν από μειωμένη έως το πολύ ενδιάμεση ευαισθησία στις νεότερες κινολόνες (QDS στελέχη).

Πίνακας 13. Ευαισθησία στελεχών *Neisseria gonorrhoeae* σε εννέα αντιβιοτικά κατά την πενταετία 1998-2002

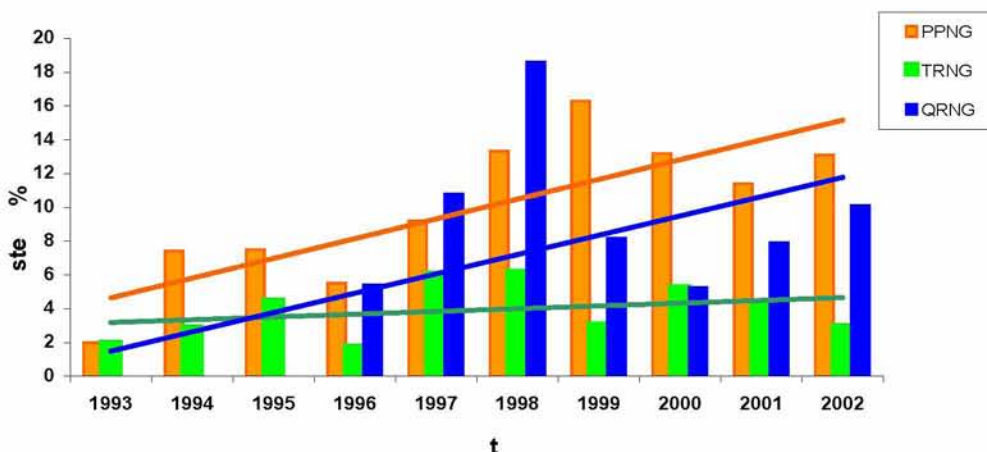
Αντιβιοτικά	Παράμετροι Ευαισθησίας	Κριτήρια	1998 (n=113)	1999 (n=98)	2000 (n=76)	2001 (n=140)	2002 (n=99)
Πενικιλίνη G	PPNG (%)	παραγωγή πενικιλινάσης	13,3	16,3	13,2	11,4	13,1
	CMPR (%)	Etest MIC >1 mg/l	8,0	2,0	6,6	3,6	1,0
	Ενδ. Ευαισθ. (%)	Etest MIC 0,094 – 1 mg/l	54	61,2	60,5	49,3	45,5
	Ευαίσθητα (%)	Etest MIC =0,064 mg/l	24,7	20,4	19,7	35,7	40,4
	Εύρος MIC (mg/l)		≤0,016–0,064	≤0,016–0,064	≤0,016–0,064	≤0,016–0,064	≤0,016–0,064
	MIC50 (mg/l)		0,19	0,19	0,25	0,125	0,125
	MIC90 (mg/l)		16	32	8	6	12
Κεφοταξίμη	Ευαίσθητα (%)	Etest MIC =0,5 mg/l	100	100	100	100	100
	Εύρος MIC (mg/l)		≤0,002–0.5	≤0,002–0.125	≤0,002–0.5	≤0,002–0.19	≤0,002–0.38
	MIC50 (mg/l)		0,012	0,008	0,016	0,012	0,008
	MIC90 (mg/l)		0,094	0,032	0,064	0,064	0,032
Σπεκτινομυκίνη	Ευαίσθητα (%)	Etest MIC <64 mg/l	100	100	100	100	100
	Εύρος MIC (mg/l)		1 – 32	0,75 – 24	2 – 32	1 – 24	2 – 24
	MIC50 (mg/l)		12	12	12	12	8
	MIC90 (mg/l)		16	16	16	16	16
Τετρακυκλίνη	TRNG (%)	παρουσία Tet-M πλασμιδίου	6,2	3,1	5,3	4,3	3,0
	CMTR (%)	Etest MIC >1 mg/l	12,4	6,1	18,4	5,7	3,0
	Ενδ. Ευαισθ. (%)	Etest MIC 0,38 – 1 mg/l	44,3	50,6	42,1	42,8	33,4
	Ευαίσθητα (%)	Etest MIC =0,25 mg/l	37,1	40,2	34,2	47,2	60,6
	Εύρος MIC (mg/l)		0,047 – 48	≤0,016 – 32	0,047 – 24	≤0,016 – 64	≤0,016 – 64
	MIC50 (mg/l)		0,5	0,38	0,5	0,38	0,25
Ερυθρομυκίνη	ERNG (%)	πολύ υψηλά επίπεδα MIC	–	–	–	0,7	–
	CMER (%)	Etest MIC >1 mg/l	16,8	9,2	26,3	13,6	8,1
	Ενδ. Ευαισθ. (%)	Etest MIC 0,38 – 1 mg/l	48,7	45,9	47,4	60,7	60,6
	Ευαίσθητα (%)	Etest MIC =0,25 mg/l	34,5	44,9	26,3	25,0	31,3
	Εύρος MIC (mg/l)		≤0,016 – 8	0,023 – 4	≤0,016 – 8	≤0,016 – 96	≤0,016 – 3
	MIC50 (mg/l)		0,5	0,38	0,75	0,75	0,5
	MIC90 (mg/l)		2	1	1,5	2	1

Πίνακας 13 (συνέχεια): Ευαισθησία στελεχών *Neisseria gonorrhoeae* σε εννέα αντιβιοτικά κατά την πενταετία 1998-2002

Αντιβιοτικά	Παράμετροι Ευαισθησίας	Κριτήρια	1998 (n=113)	1999 (n=98)	2000 (n=76)	2001 (n=140)	2002 (n=99)
Χλωραμφαινικόλη	Ανθεκτικά (%)	Etest MIC >1 mg/l	48,7	41,8	47,4	20,7	27,3
	Ενδ. Ευαισθ. (%)	Etest MIC 0,38 – 1 mg/l	38,9	44,9	42,0	59,3	54,5
	Ευαίσθητα (%)	Etest MIC =0,25 mg/l	12,4	13,3	13,6	20,0	18,2
	Εύρος MIC (mg/l)		0,125 – 12	0,064 – 8	0,125 – 8	=0,016 – 6	0,064 – 4
	MIC50 (mg/l)		1	0,75	1	0,5	0,5
	MIC90 (mg/l)		4	3	4	2	3
Νορφλοξακίνη	Ανθεκτικά (%)	Etest MIC >0,5 mg/l	2,7	2,0	5,3	6,4	9,1
	Ενδ. Ευαισθ. (%)	Etest MIC 0,38 – 0,5 mg/l	15,0	5,1	–	1,4	1,0
	Ευαίσθητα (%)	Etest MIC =0,25 mg/l	82,3	92,9	94,7	92,2	89,9
	Εύρος MIC (mg/l)		≤0,016–1	≤0,016–1,5	≤0,016–12	≤0,016–16	≤0,016–24
	MIC50 (mg/l)		0,023	≤0,016	0,023	0,023	0,023
	MIC90 (mg/l)		0,5	0,064	0,094	0,094	0,5
Σιπροφλοξακίνη	Ανθεκτικά (%)	Etest MIC >0,5 mg/l	–	1,0	5,3	3,6	7,1
	Ενδ. Ευαισθ. (%)	Etest MIC 0,094 – 0,5 mg/l	12,4	5,1	–	3,6	3
	Ευαίσθητα (%)	Etest MIC =0,064 mg/l	87,6	93,9	94,7	92,8	89,9
	Εύρος MIC (mg/l)		≤0,002–0,25	≤0,002–0,75	≤0,002–>32	≤0,002–8	≤0,002–>32
	MIC50 (mg/l)		0,006	0,006	0,004	0,004	0,006
	MIC90 (mg/l)		0,094	0,023	0,016	0,032	0,094
Ναλιδιξικό οξύ	QRNG (%)	απουσία άλω σε δίσκο 30μg	18,6	8,1	5,3	7,9	10,1

Συνομογραφίες: **PPNG:** πενικιλινασο-παραγωγά στελέχη, **TRNG:** στελέχη με υψηλού επιπέδου πλασμιδιακή αντοχή στην πενικιλίνη, **ERNG:** Αναφέρεται σε ένα και μοναδικό στέλεχος με υψηλού επιπέδου αντοχή στην ερυθρομυκίνη, **QRNG:** ανθεκτικά στις κινολόνες στελέχη, **CMPR, CMTR** και **CMER:** στελέχη με χαμηλού επιπέδου χρωμοσωματική αντοχή στην πενικιλίνη, τετρακυκλίνη και ερυθρομυκίνη αντίστοιχα. **MIC50** και **MIC90:** Οι ελάχιστες τιμές MIC που απαιτούνται για την αναστολή του 50% και του 90% του πληθυσμού γονοκόκκων αντίστοιχα.

Οι τάσεις επικράτησης PPNG, TRNG και QRNG στελεχών σε όλη τη δεκαετία 1993 – 2002 εμφανίζονται στις γραφικές παραστάσεις που ακολουθούν (Εικόνες 12 & 13).



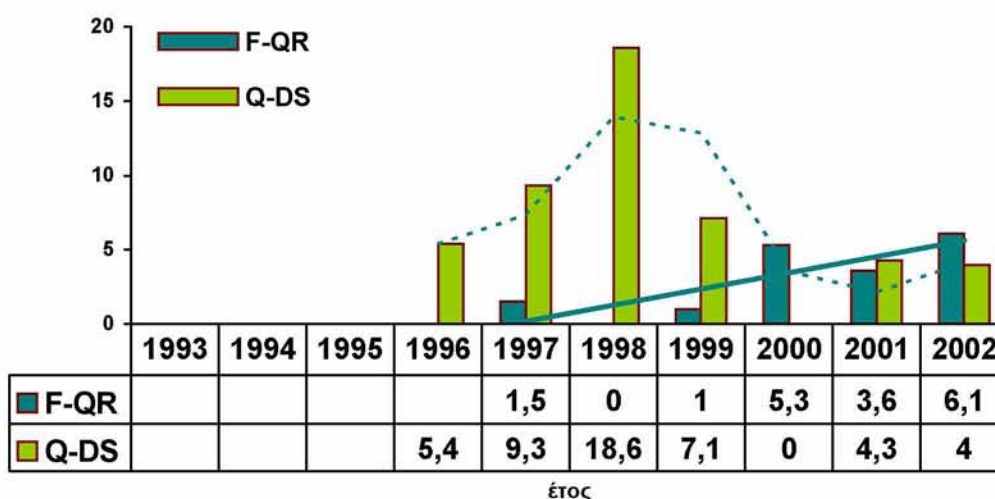
Εικόνα 12. Ετήσιες συχνότητες απομόνωσης PPNG, TRNG και QRNG στελεχών κατά τη διάρκεια της περιόδου 1993 – 2002

PPNG, πενικιλίνασοπαραγωγά στελέχη (πλασμιδιακή αντοχή στην πενικιλίνη)

TRNG, στελέχη με πλασμιδιακή, υψηλού επιπέδου αντοχή στην τετρακυκλίνη

QRNG, στελέχη ανθεκτικά στις κινολόνες, με κριτήριο το ναλιδιζικό οξύ

Σημείωση: Στο παραπάνω γραφημα, τα στελέχη γονοκόκκου με συνδυασμένους χαρακτήρες πλασμιδιακής αντοχής στην πενικιλίνη και/ή την τετρακυκλίνη και αντοχής στις κινολόνες έχουν συνυπολογιστεί σε όλες τις κατηγορίες στις οποίες κατατάσσονται βάσει των χαρακτήρων αυτών.



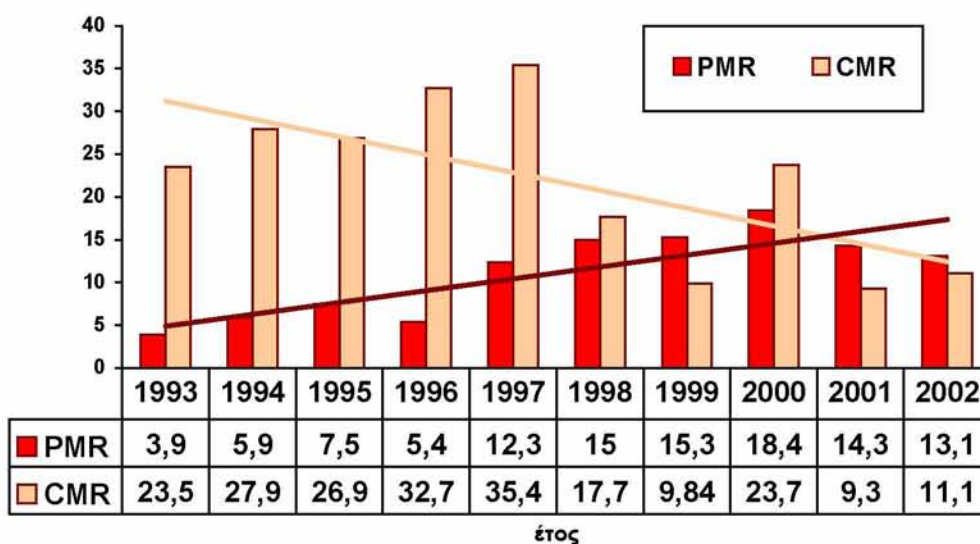
Εικόνα 13. Ετήσιες συχνότητες απομόνωσης QRNG στελεχών κατά τη διάρκεια της περιόδου 1993 – 2002.

F-QR: Αντοχή στις φθοριωμένες κινολόνες (με κριτήριο την σιπροφλοξακίνη)

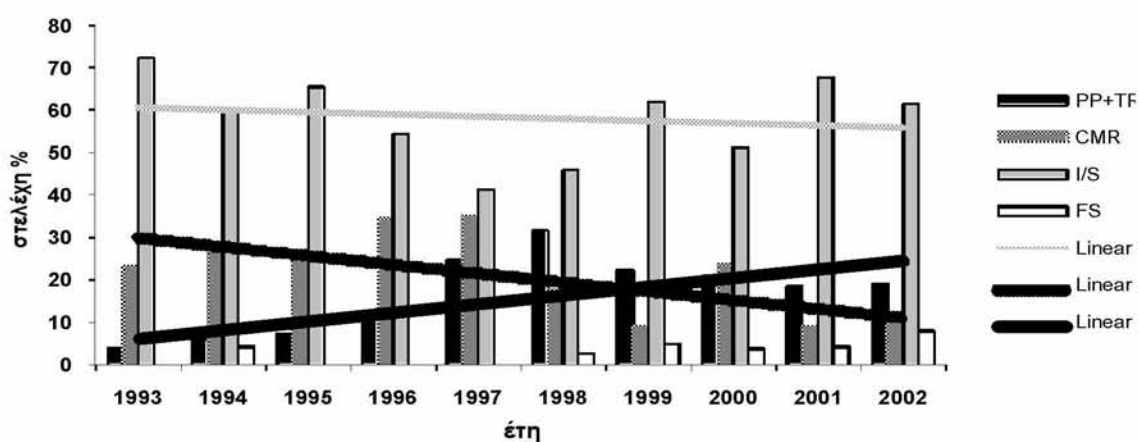
Q-DS: Μέτρια ή μειωμένη ευαισθησία στις νεότερες κινολόνες (αντοχή μόνο στο ναλιδιζικό οξύ)

Ανεξάρτητα από την παρουσία PPNG, TRNG και QRNG στελεχών, υψηλές ήταν και οι συχνότητες απομόνωσης στελεχών με χαμηλού επιπέδου, αλλά κλινικά σημαντική, χρωμοσωματική αντοχή στην πενικιλίνη (CMPR), την τετρακυκλίνη (CMTR), την ερυθρομυκίνη (CMER) και την χλωραμφαινικόλη (Πίνακας 13). Επίσης, σημαντικός αριθμός στελεχών εμφάνιζαν διασταυρούμενη χρωμοσωματική αντοχή. Συγκεκριμένα, το 5,7% των στελεχών γονοκόκκου που εμφάνισαν χρωμοσωματική αντοχή στην πενικιλίνη, τετρακυκλίνη ή την ερυθρομυκίνη κατά την υπό μελέτη περίοδο ήταν πολυανθεκτικά, με συνδυασμούς χαρακτήρων αντοχής για περισσότερα του ενός από τα αντιβιοτικά αυτά (3,4% σε δύο και 2,3% και στα τρία αντιβιοτικά). Η αντοχή στη χλωραμφαινικόλη δεν έχει συνυπολογιστεί στις εδώ αναφερόμενες συχνότητες διασταυρούμενης αντοχής, γιατί το συγκεκριμένο αντιβιοτικό δεν χρησιμοποιείται στην Ελλάδα για τη θεραπεία της γονόρροιας και, επομένως, η αύξηση των ποσοστών που επιφέρει ο συνυπολογισμός της δεν έχει κλινική σημασία.

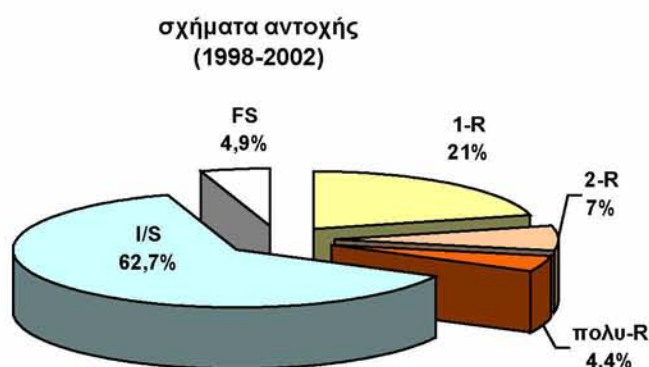
Η τάση επικράτησης στελεχών γονοκόκκου με χρωμοσωματική αντοχή σε ένα ή περισσότερα από τα αντιβιοτικά πενικιλίνη, τετρακυκλίνη και ερυθρομυκίνη παρουσιάζεται στην *Εικόνα 14*, στην οποία επίσης αντιπαρατίθεται η τάση επικράτησης στελεχών με πλασμιδιακή αντοχή κατά την ίδια χρονική περίοδο. Από το γράφημα αυτό είναι προφανές ότι,



Εικόνα 14. Ετήσιες συχνότητες και τάσεις επικράτησης πλασμιδιακής και χρωμοσωματικής αντοχής κατά τη δεκαετία 1993 – 2002.
PMR: πλασμιδιακή αντοχή στην πενικιλίνη και/ή την τετρακυκλίνη
CMR: χρωμοσωματική, χαμηλού επιπέδου αντοχή σε ένα τουλάχιστον από τα αντιβιοτικά πενικιλίνη, τετρακυκλίνη και ερυθρομυκίνη.



Εικόνα 15. Ετήσια κατανομή στελεχών γονοκόκκου της περιόδου 1993 – 2002 σε φαινότυπους ευαισθησίας / αντοχής.



Εικόνα 16. Καταμερισμός γονοκοκκικού δείγματος 1998 – 2002 σε συνδυασμούς αντοχής/ευαισθησίας στις πενικιλίνες, τετρακυκλίνες, νεότερες κινολόνες και ερυθρομυκίνη.

I-R, 2-R, πολυ- R: χαρακτηρες για ένα, δύο ή περισσότερα αντιβιοτικά διαφορετικών ομάδων, αντίστοιχα. I/S: στελέχη χωρίς χαρακτηρες αντοχής, αλλά με μέτρια ευαισθησία σε τουλάχιστον ένα αντιβιοτικό. FS: στελέχη πλήρως ευαίσθητα σε όλα τα αντιβιοτικά.

αντίθετα με την υψηλού επιπέδου πλασμιδιακή αντοχή, η χαμηλού επιπέδου χρωμοσωματική αντοχή ακολούθησε πτωτική πορεία κατά τη διάρκεια της δεκαετίας.

Η συγκριτική παρουσία όλων των φαινοτύπων αντοχής που περιγράφηκαν παραπάνω κατά τη δεκαετία 1993 – 2002 σκιαγραφείται στην *Εικόνα 15*, ενώ, τέλος, την *Εικόνα 16*, εμφανίζεται ο καταμερισμός του δείγματος γονοκόκκων που συγκεντρώθηκαν κατά την υπό μελέτη περίοδο σε ευαίσθητους και ανθεκτικούς φαινότυπους, ανεξάρτητα από το είδος και τα επίπεδα της αντοχής και με κριτήριο μόνο τους συνδυασμούς αντοχής/ευαισθησίας (susceptibility patterns).

Στα γραφήματα αυτά δείχνεται ότι κατά την υπό μελέτη περίοδο το 32,4% των στελεχών γονοκόκκου που εξετάστηκαν ήταν ανθεκτικά και ένα πρόσθετο ποσοστό 62,7% είχαν ενδιάμεση ευαισθησία (μέτρια αντοχή) σε τουλάχιστον ένα από τα αντιβιοτικά που ελέγχθηκαν –μη συνυπολογιζόμενης της χλωραμφαινικόλης. Εντελώς ευαίσθητα, σε όλα τα αντιβιοτικά, ήταν μόνο το 4,9% των στελεχών. Ο καταμερισμός αυτός ήταν σε αδρές γραμμές παρόμοιος με του αντίστοιχου δείγματος της προηγούμενης πενταετίας, παρά τις ποιοτικές διαφοροποιήσεις που σημειώθηκαν ως προς τα είδη της αντοχής που έτειναν προς επικράτηση. Και στις δύο περιόδους παρατηρήθηκαν σημαντικά ποσοστά αντοχής, ενώ ο κύριος όγκος των στελεχών συγκεντρώνονταν στην περιοχή της ενδιάμεσης ευαισθησίας.

2. Χαρακτηρισμός Πλασμιδιακής Αντοχής

Όλα τα στελέχη *N.gonorrhoeae* που είχαν στην καλλιέργεια θετική δοκιμασία νιτροσεφίνης (ενδεικτική παραγωγής πενικιλιλίνης), καθώς και όσα είχαν υψηλές τιμές MIC τετρακυκλίνης (=4 mg/l) διερευνήθηκαν για την παρουσία πλασμιδίων αντοχής. Τα αποτελέσματα από την ανάλυση πλασμιδιακού περιεχομένου και την ανίχνευση του *tetM* γονιδίου με PCR αποκάλυψαν πλασμίδια αντοχής σε 82 στελέχη (15,6% στο σύνολο των 526 στελεχών της περιόδου 1998 – 2002). Από αυτά, 59 (11,2% στο σύνολο των στελεχών) έφεραν πλασμίδια αντοχής μόνο για την πενικιλίνη (PPNG), 12 (2,3%) έφεραν ως μοναδικό πλασμίδιο αντοχής το Tet-M που ευθύνεται για αντοχή στην τετρακυκλίνη (TRNG) και 11 (2,1) έφεραν πλασμίδια αντοχής και για την πενικιλίνη και για την τετρακυκλίνη (PP/TR). Συνολικά, τα πενικιλινοσυνασπαραγωγά στελέχη συνιστούσαν το 13,3% του γονοκοκκικού πληθυσμού (70 στελέχη), ενώ πλασμιδιακή αντοχή στην τετρακυκλίνη έφεραν 23 στελέχη (4,4%).

Αξίζει να σημειωθεί ότι, από τα στελέχη που έφεραν υψηλού επιπέδου πλασμιδιακή αντοχή για την πενικιλίνη και/ή την τετρακυκλίνη, 11 (2,1% στο σύνολο των στελεχών) ήταν QRNG, με υψηλού επιπέδου αντοχή και στις νεότερες κινολονες (3 PP/QR, 2 TR/QR και 6 PP/TR/QR).

Τα μικροβιολογικά χαρακτηριστικά των PPNG και TRNG στελεχών δίνονται αναλυτικότερα σε επόμενη ενότητα, στον Πίνακα 17, όπου περιγράφονται όλα τα στελέχη γονοκόκκου με υψηλού επιπέδου αντοχή μαζί με επιδημιολογικά στοιχεία σχετικά με την πιθανή τους προέλευση.

Τύποι πλασμιδίων αντοχής στην πενικιλίνη

Από τα πλασμίδια αντοχής στην πενικιλίνη που εντοπίστηκαν, επικρατέστερο ήταν το πλασμίδιο αφρικανικού τύπου, μοριακού μεγέθους 3,2 MDa, το οποίο απαντούσε στα 60 (85,7%) από τα 70 πενικιλινοσυνασπαραγωγά στελέχη, συνοδευόμενο κατά κανόνα και από ένα συζευκτικό πλασμίδιο (πλασμιδιακός τύπος afg^+). Πιο αναλυτικά, από τα afg^+ στελέχη, 51 έφεραν το ενδογενές συζευκτικό πλασμίδιο του γονοκόκκου και πέντε έφεραν το συζευκτικό Tet-M πλασμίδιο. Σε τέσσερα μόνο στελέχη το αφρικανικό πλασμίδιο πενικιλινοσυνασπαραγωγής δεν συνοδευόταν από συζευκτικό (πλασμιδιακός τύπος afg^-). Το δεύτερο σε συχνότητα από τα πλασμίδια αντοχής στην πενικιλίνη ήταν το ασιατικού τύπου, που βρέθηκε σε επτά (10%) των PPNG στελεχών. Στα πέντε από αυτά απαντούσε ως $asian^+$, συνοδευόμενο από το Tet-M (σε 4

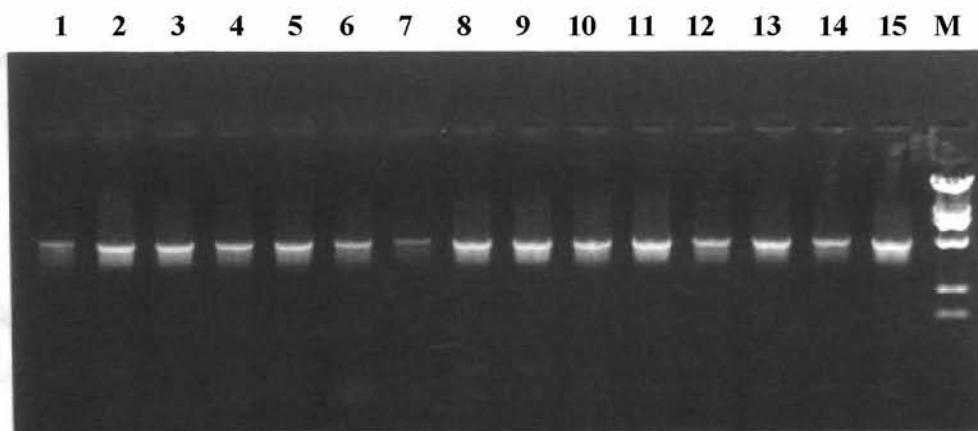
στελέχη) ή από το ενδογενές συζευκτικό πλασμίδιο (σε ένα στέλεχος), ενώ σε δύο στελέχη απαντούσε ως *asian⁻*, δηλαδή χωρίς κανένα συζευκτικό πλασμίδιο. Τέλος, δύο στελέχη έφεραν πλασμίδιο τύπου Toronto (3,05 MDa) και ένα, από λοίμωξη που αποκτήθηκε στη Βραζιλία, έφερε πλασμίδιο τύπου Rio (2,9 Mda), επίσης μαζί με το συζευκτικό πλασμίδιο του γονοκόκου (τύποι *toronto⁺* και *rio⁺*) (βλ. Πίνακα 17).

Τύποι πλασμιδίων αντοχής στην τετρακυκλίνη – Χαρακτηρισμός *tetM* γονιδίων

Κατά την ανάλυση πλασμιδιακού περιεχομένου σε αγαρόζη, και τα 23 στελέχη, στα οποία ανιχνεύτηκε με PCR το γονίδιο *tetM* (Εικόνα 17α) έφεραν πλασμίδια μεγέθους 25,2 Mda, που αντιστοιχεί στο Tet-M συζευκτικό πλασμίδιο αντοχής στην τετρακυκλίνη. Η περαιτέρω διάκριση μεταξύ των Tet-M πλασμιδίων βασίστηκε σε RFLP ανάλυση του φερόμενου από αυτά *tetM* γονιδίου από τα προϊόντα της πολλαπλασιαστικής PCR (Εικόνα 17β).

Προσδιορίστηκαν δύο τύποι Tet-M πλασμιδίων που διέφεραν μεταξύ τους ως προς την εσωτερική αλληλουχία του *tetM* γονιδίου: ο αμερικανικός τύπος (American-type), που απαντούσε σε οκτώ από τα 23 TRNG στελέχη (34,8%) και ο ολλανδικός τύπος (Dutch type) που εντοπίστηκε στα υπόλοιπα 15 (65,2% των TRNG).

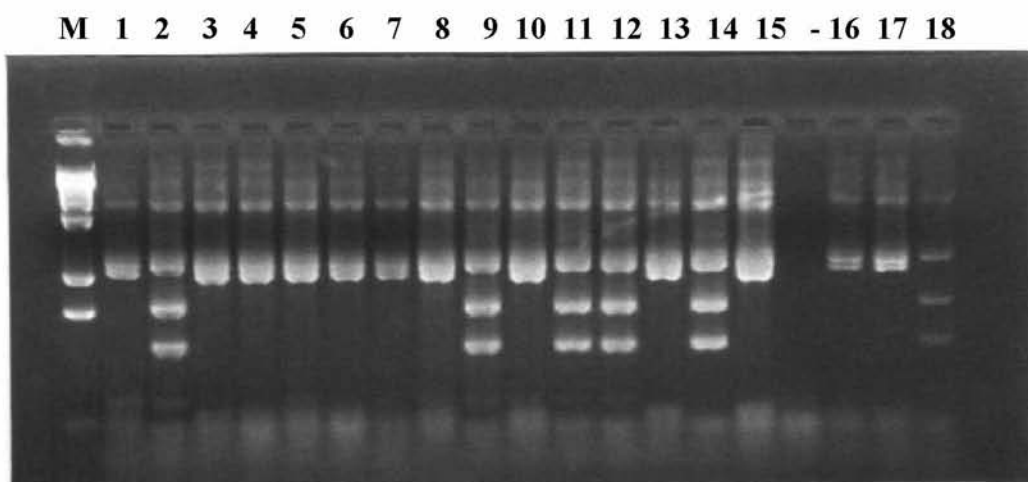
Σε σύγκριση με αντίστοιχα αποτελέσματα που αφορούσαν το χαρακτηρισμό των TRNG στελεχών της προηγούμενης πενταετίας (1993–1997), παρατηρήθηκε αύξηση στη συχνότητα απομόνωσης στελεχών με αμερικανικού τύπου Tet-M πλασμίδια, από 25% σε 34,8%, μολονότι και στις δύο συγκρινόμενες πενταετίες επικρατέστερος ήταν ο ολλανδικός τύπος. Και στις δύο περιόδους, τα TRNG στελέχη προέρχονταν ως επί το πλείστον από λοιμώξεις που αποκτήθηκαν εκτός Ελλάδας.



Εικόνα 17α: Ανίχνευση *tetM* γονιδίου στο Tet-M πλασμίδιο με πολλαπλασιαστική PCR

1-15: Προϊόντα της PCR (ζώνη) από γενωμικό DNA αντιπροσωπευτικών TRNG, PP/TR, TR/QR, PP/TR/QR στελέχη. Σε όλα ανιχνεύτηκε μία ζώνη DNA με το αναμενόμενο μοριακό μέγεθος (1867 bp), που αντιστοιχεί σε περιοχή του *tetM* γονιδίου (μεγέθους 1917 bp).

M: Μάρτυρας DNA (DNA ladder, 8200, 3500, 2700, 1700, 800, 500 bp)



Εικόνα 17β: RFLP ανάλυση *tetM* γονιδίων με την περιοριστική ενδονουκλεάση *MspI*.

M: μάρτυρας M.B DNA (8200, 3500, 2700, 1700, 800, και 500 bp).

Στις διαδρομές 2, 9, 11, 12, 14 & 18: αμερικανικού τύπου (ανάλυση σε τρία θραύσματα DNA, μήκους 912, 549 & 357 bp, αντίστοιχα).

Στις διαδρομές 1, 3-7, 10, 13 & 15-17: *tet-M* γονίδιο ολλανδικού τύπου (ανάλυση σε δύο θραύσματα DNA, μήκους 912 και 906 bp).

M: Μάρτυρας DNA (DNA ladder, 8200, 3500, 2700, 1700, 800, 500 bp)

3. Χαρακτηρισμός Μηχανισμού Αντοχής στις Κινολόνες

Ο μηχανισμός αντοχής στις νεότερες κινολόνες διερευνήθηκε σε 54 QRNG στελέχη, από τα οποία 27 ήταν ανθεκτικά σε μία τουλάχιστον από τις δύο φθοριωμένες κινολόνες που εξετάστηκαν (MIC σιπροφλοξακίνης >0,5 mg/l) και 25 παρουσίαζαν αντοχή μόνο στο ναλιδιξικό οξύ και μειωμένη έως το πολύ μέτρια ευαισθησία στις νεότερες κινολόνες (QDS στελέχη, MIC σιπροφλοξακίνης 0,047–0,25 mg/l, νορφλοξακίνης 0,19–0,5 mg/l). Με πολλαπλασιαστική PCR, απομονώθηκαν από το γενωμικό DNA των στελεχών τμήματα των γονιδίων γυράσης και τοποϊσομεράσης IV (*gyrA* & *parC*, αντίστοιχα) που συμπεριελάμβαναν την QRDR περιοχή, στην οποία εντοπίζονται οι μεταλλάξεις που προσδίδουν αντοχή στις νεότερες κινολόνες (Εικόνες 18 & 19). Στη συνέχεια, οι υπεύθυνες, κατά περίπτωση, μεταλλάξεις προσδιορίστηκαν με ανάγνωση νουκλεοτιδικής αλληλουχίας απευθείας από τα προϊόντα της PCR.

Στα 25 QDS στελέχη προσδιορίστηκε μία σημειακή μεταλλαγή στο γονίδιο *gyrA* (TCC TTC), που οδηγούσε σε αντικατάσταση της σερίνης από φαινυλαλανίνη στη θέση 91 της αμινοξικής αλληλουχίας της γυράσης A (Ser91 Phe). Η μεταλλαγή αυτή ήταν και η συχνότερη στο σύνολο των QRNG στελεχών, καθώς απαντούσε σε 26 ακόμα στελέχη, στα 14 από τα οποία προσδιορίστηκε ως η μόνη αιτία αντοχής στις νεότερες κινολόνες. Η δεύτερη σε συχνότητα μεταλλαγή γυράσης (GAC GGC) οδηγούσε στην αμινοξική αντικατάσταση Asp95 Gly και βρέθηκε σε οκτώ QRNG στελέχη, πάντοτε συνοδευόμενη από την προηγούμενη, καθώς και από μία ή περισσότερες μεταλλάξεις στην τοποϊσομεράση IV. Σε τρία στελέχη, ως μόνη αιτία αντοχής εντοπίστηκε μία άλλη μεταλλαγή στο *gyrA*, που οδηγούσε σε αντικατάσταση του ασπαρτικού από ασπαραγίνη, πάλι στη θέση 95 της αμινοξικής αλληλουχίας της γυράσης A (Asp95 Asn).

Μεταλλάξεις στο γονίδιο *parC*, υπεύθυνες για αντικαταστάσεις στην υπομονάδα IV της τοποϊσομεράσης, παρατηρήθηκαν συνολικά σε 12 QRNG στελέχη, που έφεραν και μεταλλάξεις γυράσης. Η συχνότερη *parC* μεταλλαγή επέφερε αντικατάσταση του ασπαρτικού από ασπαραγίνη στη θέση 86 της αμινοξικής αλληλουχίας της πρωτεΐνης (Asp86 Asn) και απαντούσε στα 10 στελέχη, πάντοτε ως η μόνη μεταλλαγή τοποϊσομεράσης IV. Στα άλλα δύο στελέχη παρατηρήθηκαν μεταλλάξεις που οδηγούσαν σε αμινοξικές αντικαταστάσεις σε γειτονικές θέσεις της πρωτεΐνης, συγκεκριμένα Ser87 Asn στο ένα στέλεχος και Ser87 Asn μαζί με Ser88 Pro στο άλλο.

M T D A T I R H D H K F A L E T L P V S	20
ATGACCGACGCAACCATCCGCCACGACCACAAATTCGCCCTCGAAACCCTGCCCGTCAGC	60
L E D E M R K S Y L D Y A M S V I V G R	40
CTTGAAGACGAAATGCGCAAAAGCTATCTCGACTACGCCATGAGCGTCATTGTCCGGGCGC	120
A L P D V R D G L K P V H R R V L Y A M	60
GCGCTGCCGACGTTTCGCGACGGCCTAAAGCCGGTGCACCGGCGCGTACTGTACGCGATG	180
H E L K N N W N A A Y K K S A R I V G D	80
CACGAGCTGAAAAATAACTGGAATGCCGCCTACAAAAAATCGGCGCGCATCGTCGGCGAC	240
	91
V I G K Y H P H G D S A V Y D T I V R M	100
GTCATCGGTAAATACCACCCCCACGGCGATTCCGCGAGTTTACGACACCATCGTCCGTATG	300
A Q N F A M R Y V L I D G Q G N F G S V	120
GCGCAAAATTTCCGCTATGCGTTATGTGCTGATAGACGGACAGGGCAACTTCGGATCGGTG	360
D G L A A A A M R Y T E I R M A K I S H	140
GACGGGCTTGCCGCCGACGCCATGCGCTATACCGAAATCCGCATGGCGAAAATCTCACAT	420
E M L A D I E E E T V N F G P N Y D G S	160
GAAATGCTGGCAGACATTGAGGAAGAAACCGTTAATTTCCGCCCGAACTACGACGGTAGC	480
E H E P L V L P T R F P T L L V N G S S	180
GAACACGAGCCGCTTGACTGCCGACCCGTTTCCCCACACTGCTCGTCAACGGCTCGTCC	540
G I A V G M A T N I P P H N L T D T I N	200
GGTATCGCCGTCGGTATGGCGACCAACATCCCGCCGCAACCTCACCGACACCATCAAC	600
A C L R L L D E P K T E I D E L I D I I	220
GCCTGTCTGCGTCTTTTGGACGAACCCAAAACCGAAATCGACGAACTGATCGACATTATC	660
Q A P D F P T G A T I Y G L G G V R E G	240
CAAGCCCCGACTTCCCGACCGGGGCAACCATCTACGGCTTGGGCGGCGTGCGCGAAGGC	720
Y K T G R G R V V M R G K T H I E P I G	260
TATAAAACAGGCCGCGGCCGCGTTGTTATGCGCGGTAAGACCCATATCGAACCATAGGC	780
K N G E R E R I V I D E I P Y Q V N K A	280
AAAAACGGCGAACGCGAACGCATCGTTATCGACGAAATCCCCTATCAGGTCAACAAAGCC	840
K L V E K I G D L V R E K T L E G I S E	300
AAGTTGGTCGAGAAAATCGGCGATTGGTTCCGGAAAAAACACTGGAAGGCATTCCGAG	900
L R D E S D K S G M R V V I E L K R N E	320
CTCCGCGACGAATCCGACAAATCCGGTATGCGCGTCGTTATCGAGCTGAAACGCAACGAA	960
N A E V V L N Q L Y K L T P L Q D S F G	340
AATGCCGAAGTCGTCTTAAACCAACTCTACAAACTGACTCCGCTGCAAGACAGTTTCGGC	1020
I N M V V L V D G Q P R L L N L K Q I L	360
ATCAATATGGTGGTTTTGGTCGACGACAACCGCGCCTGTAAACCTGAAACAGATTCTC	1080
S E F L R H R R E V V T R R T L F R L K	380
TCCGAATTCCTGCGCCACCGCCGGAAGTCGTTACCCGACGTACGCTTTCCGGCTGAAG	1140
K A R H E G H I A E R K A V A L S N I D	400
AAGGCACGCCATGAAGGGCATATCGCCGAACGGAAAGCCGTCGCACTGTCCAATATCGAT	1200
E I I K L I K E S P N A A E A K E K L L	420
GAAATCATCAAGCTCATCAAAGAATCGCCAACGCGGCCGAGGCCAAAGAAAAACTGCTT	1260

Εικόνα 18 (a). Νουκλεοτιδική αλληλουχία γονιδίου *gyrA* (νουκλεοτίδια 1-1260) και αμινοξική αλληλουχία της πρωτεΐνης GyrA (αμινοξέα 1-420)

A R P W A S S L V E E M L T R S G L D L GCGCGCCCTTGGGCCAGCAGCCTCGTTGAAGAAATGCTGACGCGTTCGGTCTGGATTG	440 1320
E M M R P E G L V A N I G L K K Q G Y Y GAAATGATGCGTCCGGAAGGATTGGTCGCAAACATTGGTCTGAAAAACAAGGTTATTAC	460 1380
L S E I Q A D A I L R M S L R N L T G L CTGAGCGAGATTGAGGCAGATGCTATTTACGCATGAGCCTGCGAAACCTGACCGGCCTC	480 1440
D Q K E I I E S Y K N L M G K I I D F V GATCAGAAAAGAAATTATCGAAAGCTACAAAAACCTGATGGGTAAAATCATCGACTTTGTG	500 1500
D I L S K P E R I T Q I I R D E L E E I GATATCCTCTCCAAACCCGAACGCATTACCCAAATCATCCGTGACGAACTGGAAGAAATC	520 1560
K T N Y G D E R R S E I N P F G G D I A AAAACCAACTATGGCGACGAACGCCGAGCGAAATCAACCCGTTCCGGCGGCACATTGCC	540 1620
D E D L I P Q R E M V V T L T H G G Y I GATGAAGACCTGATTCCGCAACGCGAAATGGTCGTGACCCTGACCCACGGCGGCTATATA	560 1680
K T Q P T T D Y Q A Q R R G G R G K Q A AAAACCCAGCCGACCACCGACTATCAGGCTCAGCGTCGCGGGCGGGCGGCAAACAGGCG	580 1740
A A T K D E D F I E T L F V A N T H D Y GCTGCCACCAAAGACGAAGACTTTATCGAAACCCCTGTTTGTGCAACACGCATGACTAT	600 1800
L M C F T N L G K C H W I K V Y K L P E TTGATGTGTTTTACCAACCTCGGCAAGTGCCACTGGATTAAGGTTTACAAACTGCCCGAA	620 1860
G G R N S R G R P I N N V I Q L E E G E GGCGGACGCAACAGCCGCGCCGTCGATTAACAACGTATCCAGCTGGAAGAAGGCGAA	640 1920
K V S A I L A V R E F P E D Q Y V F F A AAAGTCAGCGGATTCTGGCAGTACGCGAGTTTCCCGAAGACCAATACGTCTTCTTCGCC	660 1980
T A Q G M V K K V Q L S A F K N V R A Q ACCGCGCAGGGAATGGTGAAAAAGTCCAACCTTCCGCTTTAAAAACGTCCGCGCCCAA	680 2040
G I K A I A L K E G D Y L V G A A Q T G GGCATTAAAGCCATCGCACTCAAAGAAGGCGACTACCTCGTCGGCGCTGCGCAAACAGGC	700 2100
G A D D I M L F S N L G K A I R F N E Y GGTGCGGACGACATTATGTTGTTCTCCAACCTGGGCAAAGCCATCCGCTTCAACGAATAC	720 2160
W E K S G N D E A E D A D I E T E I S D TGGGAAAAATCCGGCAACGACGAAGCGGAAGATGCCGACATCGAAACCGAGATTTCAGAC	740 2220
D L E D E T A D N E N T L P S G K N G V GACCTCGAAGACGAAACCGCCGACAACGAAAACACCCTGCCAAGCGGCAAAAACGGCGTG	760 2280
R P S G R G S G G L R G M R L P A D G K CGTCCGTCGGTCCGCGCAGCGGCGGTTTGC CGGTATGCGCCTGCCTGCCGACGGCAAA	780 2340
I V S L I T F A P E T E E S G L Q V L T ATCGTCAGCCTGATTACCTTCGCCCCTGAAACCGAAGAAAGCGGTTTGCAAGTTTAAACC	800 2400
A T A N G Y G K R T P I A D Y S R K N K GCCACCGCAACGGATACGGAACCGCACCCCGATTGCCGATTACAGCCGCAAAAACAAA	820 2460
G G Q G S I A I N T G E R N G D L V A A GGCGGGCAAGGCAGTATTGCCATTAACACCGGCGAGCGCAACGGCGATTGGTCGCCGCA	840 2520
T L V G E T D D L M L I T S G G V L I R ACCTTGGTCGGCGAAACCGACGATTTGATGCTGATTACCAGCGGCGGCGTGCTTATCCGT	860 2580

Εικόνα 18 (β). Νουκλεοτιδική αλληλουχία γονιδίου *gyrA* (νουκλεοτίδια 1261-2580) και αμινοξική αλληλουχία της πρωτεΐνης GyrA (αμινοξέα 421-860)

Αποτελέσματα

T K V E Q I R E T G R A A A G V K L I N	880
ACCAAAGTCGAACAAATCCGCGAAACCGGCCGCGCCGCGCAGCAGGCGTGAAACTGATTAAC	2640
L D E G E T L V S L E R V A E D E S E L	900
TTGGACGAAGGCGAAACCTTGGTATCGCTGGAACGTGTTGCCGAAGACGAATCCGAACTC	2700
S G A S V I S N V T E P E A E N &	
TCCGGCGCTTCTGTAATTTCCAATGTAACCGAACCGGAAGCCGAGAACTGAT	

Εικόνα 18 (γ). Νουκλεοτιδική αλληλουχία γονιδίου *gyrA* (νουκλεοτίδια 2581-2700) και αμινοξεϊκή αλληλουχία της πρωτεΐνης GyrA (αμινοξέα 861-900)

GeneBank accession no. U08817. Η περιοχή που καθορίζει την αντοχή στις κινολόνες (QRDR) παρουσιάζεται με κόκκινα στοιχεία. Οι περιοχές πρόσδεσης των εκκινητών (primers) που χρησιμοποιήθηκαν (GA1 & GA2) είναι υπογραμμισμένες. Οι θέσεις, στις οποίες εντοπίστηκαν μεταλλάξεις έχουν σκιαστεί με πράσινο χρώμα.

M N T Q P H A S H T D S N T L M I G R Y	20
ATGAATACGCAACCGCACGCTTCCCATACCGATTCCAACACGCTGATGCTCGGCCGATAC	60
A E R A Y L E Y A M S V V K G R A L P E	40
GCCGAACGCGCCTATCTCGAATACGCCATGAGCGTGGTCAAAGGCCGCGCTGCCTGAA	120
V S D G Q K P V Q R R I L F A M R D M G	60
GTTTCAGACGGCCAAAAGCCCGTGCAGCGGCGCATTGTTGTTGCCATGCGCGATATGGGT	180
L T A G A K P V K S A R V V G E I L G K	80
TTGACGGCGGGGGCGAAGCCCGTGAAATCGGCGCGCTGGTTCGGCGAGATTTGGGTA	240
Y H P H G ^{86 87 88} D S S A Y ⁹¹ E A M V R M A Q D F	100
TACCATCCGCACGGCGACAGTTCGCCTATGAGGCGATGGTGCATGGCTCAGGATTTT	200
T L R Y P L I D G I G N F G S R D G D G	120
ACCTTGCCTATCCCTTAATCGACGGCATCGGCAACTTCGGTTCGCGCGACGGCGACGGG	360
A A A M R Y T E A R L T P I A E L L L S	140
GCGGCGGCGATGCGTTACACCGAAGCGCGGCTCACGCCGATTGCGGAATTGCTGTTGTCC	420
E I N Q G T V D F M P N Y D G A F D E P	160
GAAATCAATCAGGGGACGGTGGATTTATGCCGAACACGACGGCGGCTTTCGACGAGCCG	480
L H L P A R L P M V L L N G A S G I A V	180
CTGCACCTTCCC GCCCGCTTGCCTATGGTGTGCTCAACGGCGCGTCGGGCATCGCGGTG	540
G M A T E I P S H N L N E V T Q A A I A	200
GGTATGGCGACCGAGATTCCGTCGCACAATTTGAACGAAGTCACGCAGGCGGCGATTGCA	600
L L K K P T L E T A D L M Q Y I P A P D	220
CTGTTGAAGAAACCGACGCTGGAAACCGCCGACCTGATGCAATATATTCTGCTCCCGAT	660
F A G G G Q I I T P A D E L R R I Y E T	240
TTTGCCGGCGGCGTCAAATCATCACGCCGGCGGACGAATTGCGCCGATTTACGAAACC	720
G K G S V R V R A R Y E I E K L A R G Q	260
GGCAAGGGCAGCGTGCCTGCGTGCCTGCGGTTATGAAATCGAGAAATTGGCGCGCGGACAG	780
W R V I V T E L P P N A N S A K I L A E	280
TGGCGCGTCATCGTAACCGAACTGCCGCCGAACGCCAATTCGCCAAAATCCTTGCCGAA	840
I E E Q T N P K P K A G K K Q L N Q D R	300
ATCGAAGAGCAAACCAACCCGAAACCGAAAGCGGGCAAGAAGCAGCTCAACCAAGACCGG	900
L N T K K L M L D L I D R V R D E S D G	320
CTAATACCAAAAAGCTGATGCTGGATTAATCGACCGCGTGCCTGACGAGTCCGACGGC	960
E H P V R L V F E P K S S R I D T D T F	340
GAACATCCCGTGCCTTGTATTTGAACCGAAATCCAGCCGCATCGATACCGATACCTTC	1020
I N T L M A Q T S L E G N V S M N L V M	360
ATCAACACGCTGATGGCGCAAACCTTCGCTGGAAGGCAATGTGTCCATGAACTTGGTGATG	1080
M G L D N R P A Q K N L K T I L Q E W L	380
ATGGGTTTGGACAACCGCCCCGCGCAGAAAAACCTGAAAACGATTTGTCAGGAATGGCTG	1140
D F R I V T V T R R L K F R L N Q V E K	400
GATTTCCGCATCGTTACCGTAACACGCCGTCTGAAATTCGGTTAAACCAAGTGGA	1200
R L H I L E G R L K V F L H I D E V I K	420
CGGCTGCACATCCTCGAAGGCCGTCTGAAAGTCTTTCTGCACATCGACGAAGTGATTA	1260

Εικόνα 19 (α). Νουκλεοτιδική αλληλουχία γονιδίου *parC* (νουκλεοτίδια 1-1260) και αμινοξική αλληλουχία της πρωτεΐνης ParC (αμινοξέα 1-420)

Αποτελέσματα

V I R E S D D P K A D L M A V F G L T E	440
GTCATCCGCGAATCGGACGACCCGAAAGCCGATTTGATGGCGGTGTTCTGGGCTGACCGAA	1320
I Q A E D I L E I R L R Q L A R L E G F	460
ATCCAGGCCGAAGACATTTTGGAAATCCGCCTGCGTCAGTTGGCGCGTTTGGAAAGTTTC	1380
K L E K E L N E I R E E Q G R L N I F L	480
AAACTCGAAAAAGAATTGAACGAATTGCGCGAAGAACAAGGCCGTCTGAATATCTTTTTG	1440
G D E N E K R K L I I K E M Q A D M K Q	500
GGCGACGAAAACGAAAACGCAAGCTGATTATCAAAGAGATGCAGGCCGACATGAAGCAG	1500
F G D A R R T L V E E A G R A V L T Q T	520
TTCGGCGACGCGCGCCGACGCTGGTGAAGAGGCCGCGACGCGCCGTGCTGACACAAACC	1560
A A D E P I T L I L S E K G W I R S R A	540
GCCGCCGACGAACCCATCACGCTGATTTTGTGCGAAAAGGCTGGATACGCAGCCGTGCC	1620
G H N E D L S Q T A F K E G D R L K Q T	560
GGACATAATCTCGATTTGAGCCAAACC GCGTTCAAAGAAGGCGACCGCCTCAAACAAACC	1680
L E G P H C F T R R H P R F I R G R T Y	580
CTTGAAGGACCGCACTGTTTTACCCGTCGTCATCCTCGATTTCATCCGCGGCAGAACCTAC	1780
S I D A A E I P G G R G D G V P V S S L	600
TCGATCGATGCCGCCGAAATCCCCGGCGGACGCGGCGACGGCGTACCGGTTTCTCCTTA	1800
I E L Q N G A K P V A M L T G L P E Q H	620
ATCGAGTTGCAAAACGGCGCGAAACCCGTCGCGATGTTGACAGGATTGCCGGAACAACAT	1860
Y L L S S S G G Y G F I A K L G D M V G	640
TATTTATTATCAAGCAGCGGCGGCTACGGCTTTATCGCCAAGCTGGGCGATATGGTCGGA	1920
R V K A G K V V M T A D S G E T V L P P	660
CGCGTGAAAGCGGGCAAAGTGGTGATGACCGCAGACAGCGGCGAAACCGTCTGCCGCCG	1980
V A V Y A S S F I N P D C K I I A A T S	680
GTTGCCGTCTATGCCTCCTCGTTCATCAACCCGACTGCAAAATCATTGCAGCCACCAGT	2040
Q N R A L A F P I G E L K I M A K G K G	700
CAAAACCGCGCCCTCGCCTTCCCCATCGGCGAATTGAAAATTATGGCGAAAGGCAAAGGA	2100
L Q I I G L N A G E S M T H T A V S S E	720
CTGCAAAATCATCGGATTAACGCCGGCGAATCGATGACGCATACCGCCGTTTCTTCCGAG	2160
P E I L I E S E G R R G A A H K D R L P	740
CCGGAATCCTGATTGAAAGCGAAGGCAGGCGCGGCGCGGCACAAAGACCGCCTCCCC	2220
V A L I E A K R G K K G R L L P I S G S	760
GTCGCCCTGATTGAGGCAAACGCGGCAAAAAGGCAGACTGTTGCCCATATCGGGCAGC	2280
L K Q L S S P K #	
CTGAAACAGCTTTCTTCCCCCAAATAA	

Εικόνα 19 (β). Νουκλεοτιδική αλληλουχία γονιδίου *parC* (νουκλεοτίδια 1261-2280) και αμινοξική αλληλουχία της πρωτεΐνης ParC (αμινοξέα 421-760)

GeneBank accession no.U08907. Η περιοχή που καθορίζει την αντοχή στις κινολόνες (QRDR) παρουσιάζεται με κόκκινα στοιχεία. Οι περιοχές πρόσδεσης των εκκινήτων (primers) που χρησιμοποιήθηκαν (PAR1 & PAR2) είναι υπογραμμισμένες. Οι θέσεις, στις οποίες εντοπίστηκαν μεταλλάξεις έχουν σκιαστεί με πράσινο χρώμα.

Οι μεταλλαγές που προσδιορίστηκαν στα 54 QRNG στελέχη παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα 14.

Πίνακας 14. Μεταλλαγές γυράσης και τοποϊσομεράσης IV QRNG στελεχών και επίπεδα αντοχής τους στις κινολόνες

Αριθμός Στελεχών	Μεταλλαγές		Εύρος τιμών MIC (mg/l)		ναλιδιξικού οξέος
	γυράσης	τοποϊσομεράσης	σιπροφλοξακίνης	νορφλοξακίνης	
39	Ser91Phe	-	0,047–12	0,19–8	>256
3	Asp95Asn	-	0,125 / 0,75 / >32	0,38 / 1 / 24	>256
4	Ser91Phe	Asp86Asn	1 – 1,5	3 – 4	>256
6	Ser91Phe Asp95Gly	Asp86Asn	12 – >32	0,125 – 256	>256
1	Ser91Phe Asp95Gly	Ser87Asn	2	6	>256
1	Ser91Phe Asp95Gly	Ser87Asn Ser88Pro	8	1,5	>256

Συνολικά, 42 από τα 54 QRNG στελέχη της περιόδου 1998–2002 έφεραν από μία μόνο μεταλλαγή στο γονίδιο *gyrA* ως αιτία για τη μειωμένη ευαισθησία ή την αντοχή τους στις κινολόνες, ενώ τα υπόλοιπα έφεραν διάφορους συνδυασμούς μεταλλαγών γυράσης και τοποϊσομεράσης. Δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση μεταξύ των τιμών MIC νορφλοξακίνης και σιπροφλοξακίνης και του αριθμού των μεταλλαγών που έφεραν τα στελέχη.

4. Συμβατική Τυποποίηση Στελεχών Γονοκόκκου

Αυξότυποι PPNG, TRNG, και QRNG στελεχών

Αυξοτυπία έγινε στα στελέχη με υψηλού επιπέδου πλασμιδιακή αντοχή (PPNG, TRNG), καθώς και στα ανθεκτικά ή μειωμένης ευαισθησίας στις νεότερες κινολόνες (QRNG) στελέχη και στα στελέχη με συνδυασμούς των παραπάνω φαινοτύπων αντοχής. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 15. Οι αυξότυποι παρουσιάζονται επίσης στον Πίνακα 17, που περιγράφει όλα μαζί τα χαρακτηριστικά των PPNG, TRNG & QRNG στελεχών.

Στα αμιγώς PPNG στελέχη επικρατέστερος αυξότυπος (50%) ήταν η τροφική απαίτηση για υποξανθίνη (H^-), ενώ τα QRNG στελέχη ήταν στην πλειονότητά τους (93%) πρωτότροφα. Τα TRNG στελέχη και τα σχετικά σπάνια στελέχη με διασταυρούμενους μηχανισμούς αντοχής υψηλού επιπέδου ήταν κυρίως πρωτότροφα ή εκδήλωναν άλλες τροφικές απαιτήσεις, χωρίς επικράτηση κάποιου συγκεκριμένου αυξότυπου, όπως ήταν αναμενόμενο λόγω του μικρού αριθμού και της ετερόκλητης γεωγραφικής προέλευσης των στελεχών αυτών.

Πίνακας 15: Κατανομή PPNG, TRNG και QRNG στελεχών σε αυξότυπους

Αυξότυποι	PPNG	TRNG	QRNG	PP/TR	PP/QR	TR/QR	PP/TR/QR
Proto	13 (23,2%)	5 (50%)	40 (93%)	4		2	2
P^-	7 (12,5%)	2	2 (4,%)	1	2		2
H^-	28 (50 %)	1			1		
PH^-	2 (3,6%)						
UHM^-	2 (3,6%)						
CHU^-	1 (1,8%)						
$PHUM^-$		1					
NNGR	3 (5,3%)	1	1				2
ΣΥΝΟΛΟ	56	10	43	5	3	2	6

Proto: πρωτότροφα στελέχη. P^- , H^- , M^- , U^- , C^- : τροφική απαίτηση για προλίνη, υποξανθίνη, μεθειονίνη, ουρακίλη και κιτρουλλίνη, αντίστοιχα. NNGR: Καμμία ανάπτυξη στο πλήρες υλικό NEDA (No-NEDA Growth), δηλαδή μη-τυποποιήσιμο με αυτή τη μέθοδο.

Κατανομή Γονοκοκκικού Πληθυσμού σε Ορότυπους

Οροτυπία έγινε στο σύνολο των 526 στελεχών της υπό μελέτη περιόδου. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα 16. Η κατανομή του γονοκοκκικού πληθυσμού σε ορότυπους, καθώς και οι κυριότερες συσχετίσεις μεταξύ συγκεκριμένων οροτύπων και φαινοτύπων αντοχής παρουσιάζονται επίσης σε γραφική παράσταση, στην *Εικόνα 20*, όπου παρατίθεται για σύγκριση και η αντίστοιχη κατανομή στο δείγμα της αμέσως προηγούμενης πενταετίας.

Η διαμόρφωση του δείγματος γονοκόκκων ήταν παρόμοια και στις δύο περιόδους, με ισχυρή επικράτηση της IB έναντι της IA οροομάδας και ανισομερή κατανομή των στελεχών σε δύο περιοχές διαφορετικής ετερογένειας. Συγκεκριμένα, κατά την περίοδο 1998-2002, το 90% των στελεχών ανήκαν στην IB και το 10% στην IA οροομάδα (έναντι 93% IB και 7% IA, κατά την προηγούμενη πενταετία). Τα 526 στελέχη της υπό μελέτη περιόδου κατανέμονταν σε 60 διακριτούς ορότυπους, από τους οποίους οι 43 συγκέντρωναν μόλις το 16,6% των στελεχών (εκπροσωπούμενοι από 1-5 στελέχη έκαστος), ενώ ο κύριος όγκος του δείγματος (83,4%) παρουσίαζε λιγότερο ετερογενή κατανομή, σε 17 ορότυπους, από τους οποίους ωστόσο, μόνον πέντε συγκέντρωναν ποσοστό στελεχών $\geq 4\%$ ο καθένας. Αντίστοιχα, στο δείγμα των 357 στελεχών της προηγούμενης πενταετίας, το «υψηλώς ετερογενές» τμήμα συγκέντρωνε το 18,5% των στελεχών, κατανεμημένο σε 39 από 54 ορότυπους, ενώ τα υπόλοιπα στελέχη κατανέμονταν σε 15 μόνον ορότυπους.

Η οροτυπική σύσταση του δείγματος διαφοροποιήθηκε από τη μία πενταετία στην επόμενη, υποδεικνύοντας έντονη διακίνηση σποραδικών στελεχών. Αναλυτικά, από τους 60 ορότυπους που εντοπίστηκαν κατά τη διάρκεια της περιόδου 1998-2002, μόνον οι 39 απαντούσαν και κατά την προηγούμενη πενταετία. Παράλληλα, από 54 ορότυπους που είχαν καταγραφεί κατά τη διάρκεια της προηγούμενης πενταετίας, οι 18 δεν επανεμφανίστηκαν κατά την υπό μελέτη περίοδο. Οι περισσότεροι από τους νεοεμφανιζόμενους, καθώς και οι μη-επανεμφανιζόμενοι ορότυποι, αντιστοιχούσαν σε μεμονωμένα ή ολιγάριθμα στελέχη, που ανήκαν στο μικρότερο, υψηλώς ετερογενές τμήμα του γονοκοκκικού δείγματος.

Η σειρά επικράτησης των κυρίαρχων οροτύπων επίσης μεταβλήθηκε, με το σύμπλεγμα των οροτύπων B[r]or[t], που επικρατούσαν την προηγούμενη πενταετία, να μειώνεται δραματικά από 28 σε 10%, και το σύμπλεγμα B[r][p]yust, που απαντούσε στο 7,8% των στελεχών, να αναδεικνύεται στην επικρατέστερη οροτυπική ομάδα κατά την υπό μελέτη περίοδο, καταλαμβάνει-

Αποτελέσματα

νοντας το 24,5% του συνολικού δείγματος γονοκόκκων της πενταετίας 1998-2002.

Άλλες, λιγότερο θεαματικές μεταβολές που παρατηρήθηκαν στη σειρά επικράτησης οροτύπων, αφορούσαν στη μείωση των οροτύπων B[r]opyt (από 6,4 σε 2,3%), σε αυξήσεις των οροτύπων B[r]opyst (από 16 σε 20,6%) και Arst (από 4,5 σε 8%), και στην ανάδειξη του προηγουμένως σπάνιου οροτύπου Boys σε πέμπτο κατά σειρά επικράτησης κατά τη διάρκεια της περιόδου 1998-2002, με αύξηση από 0,3 σε 4,4% (Εικόνα 20).

Πίνακας 16. Κατανομή 526 στελεχών *Neisseria gonorrhoeae* περιόδου 1998–2002 σε ορότυπους – Συσχέτιση οροτύπων με χαρακτηριστικούς φαινότυπους ανοχής

GC Ορότυποι	Αριθμός (%) στελεχών	PPNG	TRNG	QRNG	QDS ¹	ΔXA ²	ΔYA ³
IA (WI)							
1. Arst	42 (8)		1		25		8
2. Arost	3 (0,6)						1
3. Aost	4 (0,8)	1					1
4. Ar (v) ⁴	1 (0,2)						
5. Av	1 (0,2)		1				
6. Ar/Bo (v)	2 (0,4)	2					
7. At/Bo (v)	1 (0,2)						
IB (WII/III)							
8. Brpyust	76 (14,4)						
9. B pyust	31 (5,9)	1					
10. Br yust	20 (3,8)			1			
11. B yust (v)	2 (0,4)						
12. Broypst	76 (14,4)	5		2		25	
13. B opyst	32 (6,1)	8		9		2	
14. Bropt	31 (5,9)			1		2	
15. Brop	21 (4)		2	2			
16. B opt	4 (0,8)						
17. Boys	22 (4,2)	22					
18. Bys	1 (0,2)	1					
19. Bpyvut	15 (2,8)	1	1				
20. Bpyut	9 (1,7)						
21. Brpyut	6 (1,1)						
22. Bryut (v)	5 (1)						
23. Byvut	4 (0,8)		1				
24. Brpst (v)	13 (2,5)	1					
25. Bpst	9 (1,7)	2				1	

Πίνακας 16 (συνέχεια)

GC Ορότυποι	Αριθμός (%) στελεγχών	PPNG	TRNG	QRNG	QDS ¹	ΔΧΑ ²	ΔΥΑ ³
26. Bropst	10 (1,9)	1		1		1	
27. Bopst	5 (1)	1				1	1
28. Bopyt	9 (1,7)		1				3
29. Bropyt	3 (0,6)	1					
30. Bropyust ⁴	8 (1,5)						
31. Bropyvust	2 (0,4)						
32. Broput	9 (1,7)						
33. Brpust	5 (1)						
34. Brput	3 (0,6)						
35. Bos	5 (1)					2	
36. Bs	4 (0,8)	4					
37. Bopys (v)	3 (0,6)	1	1				
38. Broyst (v)	3						
39. Boyst (v)	2 (0,4)		1				
40. B pyst (v)	2	1					
41. Bops	1 (0,2)	1					
42. Brpyus	1						
43. Bropust	1						
44. Bpust	1						
45. Bput (v)	1						
46. Brpvut (v)	1						
47. Broyt (v)	1						
48. Broys (v)	1						1
49. Brot	1			1			
50. Bros	1	1					
51. Bro (v)	1			1			
52. Bst (v)	1	1					
53. Bp (v)	1		1				
54. Bpt	1						1
55. Brpt	1						
56. Bpyt	1						
57. Brpyst	1						
58. Boyut (v)	1						
59. Brout (v)	1						
60. Brust (v)	1						
ΣΥΝΟΛΑ	526	56	10	18	25	34	16

¹QDS: Φαινότυπος QRNG στελεγχών με αντοχή μόνο στο βαλιδιζικό οξύ και μειωμένη μόνο ευαισθησία στις νεότερες φθοριωμένες κινολόνες. ²ΔΧΑ: Διασταυρούμενη χρωμοσωματική αντοχή χαμηλού επιπέδου (χαρακτήρες αντοχής για δύο ή περισσότερα από τα αντιβιοτικά πενικιλίνη, τετρακυκλίνη και ερυθρομυκίνη). ³ΔΥΑ: Διασταυρούμενη παρουσία αντοχής υψηλού επιπέδου (PP, TR, QR -NG)

⁴ (v): νεοεμφανιζόμενος ορότυπος (σε σχέση με την προηγούμενη πενταετία)



Εικόνα 20. Κατανομή στελεχών *Neisseria gonorrhoeae* σε ορότυπους κατά τις χρονικές περιόδους 1993-1997 και 1998-2002

Συσχέτιση οροτύπων με κυριότερους φαινότυπους αντοχής

■ PPNG ■ TRNG ■ QRNG ■ QDS ■ ΔYA ■ ΔXA

■ Υπόλοιπα στελέχη, με μεμονωμένους ή καθόλου χαρακτήρες αντοχής

άλλοι: Πλειάδα οροτύπων που απαντούν σε 1-5 (=1%) στελέχη ο καθένας

Συσχέτιση αποτελεσμάτων συμβατικής τυποποίησης με φαινότυπους ευαισθησίας και επιδημιολογικά δεδομένα

Το σύνολο των χαρακτηριστικών των στελεχών με υψηλού επιπέδου αντοχή (ορότυποι, αυξότυποι πλασμιδιακό περιεχόμενο) παρουσιάζονται στον Πίνακα 17 (α-γ), μαζί με πληροφορίες από τα ιστορικά των ασθενών σχετικά με το χρόνο και τον τόπο απόκτησης των αντίστοιχων λοιμώξεων. Από την αντιπαράθεση των δεδομένων αυτών και τη συσχέτιση των οροτύπων με την ευαισθησία των στελεχών (Εικόνα 20) προκύπτουν οι ακόλουθες παρατηρήσεις:

(α) Συσχέτιση του οροτύπου Arst με μειωμένη ευαισθησία στις κινολόνες (QDS). Εικοσιπέντε (59%) από τα 42 στελέχη οροτύπου Arst που απομονώθηκαν κατά την πενταετία 1998–2002 ήταν ανθεκτικά στο ναλιδιζικό οξύ, ενώ παρουσίαζαν μικρή μόνο μείωση της ευαισθησίας τους στις νεότερες κινολόνες (τιμές MIC σιπροφλοξακίνης 0,047–0,125 mg/L). Τα στελέχη αυτά ήταν όλα πρωτότροφα και είχαν το ίδιο πλασμιδιακό περιεχόμενο, χαρακτηριζόμενα από παρουσία του συζευκτικού (24,5 MDa) και απουσία του κρυπτικού (2,6MDa) πλασμιδίου του γονοκόκκου (conj⁺cr⁻) (Πίνακας 17β). Πέρα από την αντοχή στο ναλιδιζικό οξύ και τη μειωμένη ευαισθησία τους στις νεότερες κινολόνες, που οφειλόταν σε μία και την αυτή μεταλλαγή γυράσης (Ser91(Phe), τα στελέχη αυτά ήταν όλα πιο ευαίσθητα από τον υπόλοιπο γονοκοκκικό πληθυσμό σε όλα τα άλλα αντιβιοτικά που ελέγχθηκαν. Ο συνδυασμός αυτών των χαρακτηριστικών δεν απαντούσε σε στελέχη άλλων οροτύπων. Στελέχη του τύπου Arst/Proto/conj⁺cr⁻ είχαν απομονωθεί και κατά την προηγούμενη πενταετία. Συγκεκριμένα, απομονώθηκαν για πρώτη φορά το 1996 σε συχνότητα 5,4% και έφθασαν σε συχνότητα 9,3% το 1997. Κατά την υπό μελέτη περίοδο έφθασαν στο μέγιστο της συχνότητάς τους (15,9%) το 1998, περιορίστηκαν σε 4,1% το 1999 και έκτοτε δεν επανεμφανίστηκαν έως και το 2002 (βλ. και *Εικ. 13*). Η συσσώρευση στελεχών αυτού του τύπου κατά το έτος 1998 αιτιολογεί τη μεταβολή στη σειρά επικράτησης του οροτύπου Arst, από 4,5%, την προηγούμενη πενταετία, σε 8% κατά την υπό μελέτη περίοδο (*Εικόνα 20*).

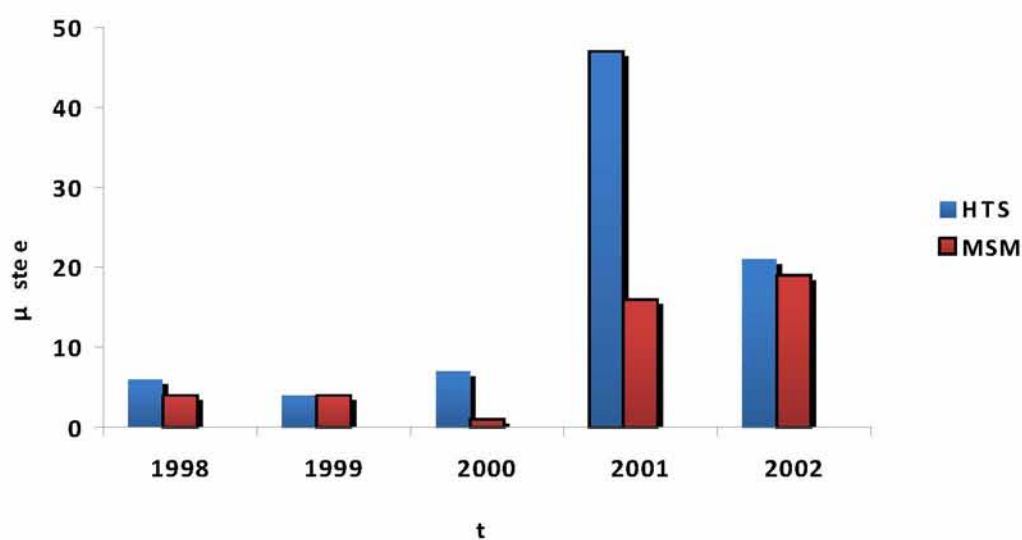
(β) Μεταβολή στη σειρά επικράτησης του συμπλέγματος οροτύπων B[r]opyst, που κατά τα προηγούμενα χρόνια είχε συσχετιστεί με διασταυρούμενη χρωμοσωματική αντοχή (ΔΧΑ). Κατά την υπό μελέτη περίοδο, η συσχέτιση διατηρήθηκε, με τον πολυανθεκτικό φαινότυπο ΔΧΑ να εμφανίζεται κατά κύριο λόγο σε στελέχη των οροτύπων B[r]opyst ($P < 10^{-9}$). Παρόλ' αυτά, το φαινόμενο εξασθένησε, καθώς άρχισαν να εμφανίζονται ολοένα και περισσότερα στελέχη των οροτύπων B[r]opyst που δεν ήταν πολυανθεκτικά, ενώ παράλληλα τα στελέχη με τον πολυανθεκτικό φαινότυπο ΔΧΑ ελαττώθηκαν σημαντικά. Το εύρημα αυτό αιτιολογεί την πτωτική τάση στη συνολική χρωμοσωματική αντοχή του γονοκοκκικού πληθυσμού που διαμορφώθηκε κατά την περίοδο 1993 – 2002 (βλ. και *Εικ. 14*).

(γ) Συσχέτιση του οροτύπου Boys με αμιγώς PPNG στελέχη. Από τα 56 αμιγώς PPNG στελέχη που απομονώθηκαν κατά τη διάρκεια της περιόδου 1998–2002, τα 22 εμφάνιζαν τον ίδιο ορότυπο, Boys, έφεραν όλα αφρικανικού τύπου πλασμίδιο αντοχής συνοδευόμενο από το συζευκτικό πλασμίδιο του γονοκόκκου (afr^+) και είχαν αυξοτροφική απαίτηση για υποξανθίνη (Hyx^-) (Πίνακας 17α). Ο ορότυπος Boys δεν παρατηρήθηκε σε στελέχη με άλλα χαρακτηριστικά, ενώ μόνον πέντε αμιγώς PPNG στελέχη με πλασμιδιακό τύπο afr^+ και αυξότυπο Hyx^- ανήκαν σε άλλους ορότυπους (Bopyst, Bs, Aost). Κατά την προηγούμενη πενταετία, ο τύπος Boys/ Hyx^-/afr^+ εκπροσωπήθηκε από ένα μοναδικό στέλεχος που είχε απομονωθεί το 1995.

(δ) Συσχέτιση του συμπλέγματος οροτύπων B[r][p]yust, που αναδείχθηκε στην πρώτη θέση επικράτησης στο δείγμα στελεχών της πενταετίας 1998–2002, με ευαίσθητα στελέχη. Με εξαίρεση δύο στελέχη (PPNG και QRNG, αντίστοιχα), όλα τα στελέχη που ανήκαν στον ορότυπο Bpnyust ή τις παραλλαγές του (B_pyust, Br_yust και B__yust) παρουσίαζαν φαινότυπους χωρίς καθόλου χαρακτήρες αντοχής (φαινότυποι FS, I/S) είτε με οριακή αντοχή σε μεμονωμένα αντιβιοτικά (φαινότυποι 1-R). Η συσχέτιση αυτή δεν ήταν εμφανής κατά την προηγούμενη πενταετία (*Εικ. 20*).

Αποτελέσματα

Τα στελέχη του οροτυπικού συμπλέγματος B[r][p]yust αυξήθηκαν σε συχνότητα κατά την διετία 2001-2002 και απομονώνονταν από ασθενείς που απέκτησαν την λοίμωξη εντός Ελλάδας. Το 34% αυτών των στελεχών προήλθαν από ομο/αμφιφυλόφιλους ασθενείς (MSM), ενώ συνιστούσαν το 32% των στελεχών που απομονώθηκαν από σύνολο 137 ασθενών που δήλωσαν αυτή τη σεξουαλική προτίμηση κατά τη διάρκεια της πενταετίας 1998-2002 (Εικόνα 21).



Εικόνα 21: Ετήσια κατανομή στελεχών B[r][p]yust στις ομάδες των ετεροφυλόφιλων (HTS) και των ομο/αμφιφυλόφιλων (MSM) ασθενών κατά τη χρονική περίοδο 1998-2002.

Πίνακας 17 (α). Χαρακτηριστικά αμιγώς PPNG στελεχών περιόδου 1998 – 2002

Πλασμιδιακό περιεχόμενο	Αριθμός στελεχών	Ορότυπος	Αυξότυπος	Προέλευση Λοίμωξης, χρονολογία απομόνωσης	
PPNG (n=56)					
african⁺ (n=49)	22	Boys	H ⁻	Ελλάδα, 1998-2002	
	1	Bys	NNGR	Ελλάδα-2000	
	8	Bopyst	Proto (4) H ⁻ (2) UHM ⁻ (2)	Ρουμανία-1998, Αθήνα 1998, Θεσ/νίκη-1998, Ελλάδα-2001 Ρουμανία-1998, Αθήνα-1998 Ρουμανία-1998, Ελλάδα-2001	
	5	Bropyst	Proto (2) P ⁻ (2) PH ⁻ (1)	Ρουμανία-2000, Ιταλία-2000 Θεσ/νίκη-1998, Αθήνα-2000 Ελλάδα (Ρουμάνοι)-1999	
	1	Bopys	Proto	Ελλάδα-2000	
	1	B pyst	NNGR	Ελλάδα-2000	
	1	Bropst	Proto	Ρουμανία-1999	
	1	Bopst	P ⁻	Θεσ/νίκη-1999	
	2	Bpst	Proto	Ελλάδα-1999	
	1	Bst	Proto	Ελλάδα-1999	
	3	Bs	Proto (1) H ⁻ (2)	Ελλάδα-1999 Ελλάδα (Ρουμάνοι)-1999, Ελλάδα-2000	
	1	Bpyust	Proto	Ελλάδα-1998	
	1	Bpyvut	PH ⁻	Ρουμανία-1999	
	1	Aost	H ⁻	Ελλάδα-2001	
	african⁻ (n= 4)	1	Bropyt	P ⁻	Ελλάδα-1998 (Ρουμάνοι πόρνη)
		1	Bops	P ⁻	Σκόπια-1999
1		Brpst	NNGR	Ελλάδα-1999 (MSM)	
1		Bros	P ⁻	Ελλάδα-2000 (MSM)	
asian⁺ (n= 2)	2	Ar-Bo	P ⁻	Ελλάδα-1998, 1999	
asian⁻ (n= 1)	1	Bs	CHU ⁻	Θεσ/νίκη-1999	

Πίνακας 17 (β). Χαρακτηριστικά αμιγώς TRNG και αμιγώς QRNG στελεχών γονοκόκκου περιόδου 1998 – 2002

Πλασμιδιακό περιεχόμενο	Αριθμός στελεχών	Ορότυπος	Αυξότυπος	Προέλευση Λοίμωξης, χρονολογία απομόνωσης
TRNG (n=10)				
TetM-A (n=5)	1	Arst	H ⁻	Κούβα-1998
	2	Bropt	Proto	Ελλάδα (μετανάστες)-2000, 2001
	1	Bp	NNGR	Ελλάδα (MSM)-2001
	1	Av	Proto	Ελλάδα-2001
TetM-D (n=5)	1	Bpyvut	P ⁻	Αφρική-1998
	1	B yvut	P ⁻	Ελλάδα (MSM)-2002
	1	Bopyt	Proto	Σποράδες (τουρίστρια)-1998
	1	Bopys	PCHUM ⁻	Ελλάδα-2000
	1	Boyst	Proto	Ελλάδα (MSM)-2000
QRNG (n=43)				
conj⁺ cryptic⁻	25	Arst	Proto	Ελλάδα-1998, 1999 (MSM, 12:25)
conj⁻ cryptic⁺	1	Bropt	Proto	Ελλάδα (Ουκρανή)-2002
	2	Bropt	Proto	Ελλάδα-2000
	1	Bropt	NNGR	Ελλάδα-2000
	1	Bropt	Proto	Ελλάδα-2002
conj⁺ cryptic⁺	1	Bropt	Proto	Ελλάδα (Αγγλίδας)-1998
	9	Bropt	Proto	Ελλάδα (7 MSM) -2001,2002
	1	Bryust	Proto	Αθήνα (Βουλγάρων)-2001
	1	Brot	P ⁻	Ελλάδα (Αγγλίδας)-2001
	1	Bro	P ⁻	Ελλάδα (Ιταλίδας)-2002

Πίνακας 17 (γ). Χαρακτηριστικά στελεχών γονοκόκκου με συνδυασμούς χαρακτήρων αντοχής υψηλού επιπέδου (1998 – 2002)

Πλασμιδιακό περιεχόμενο	Αριθμός στελεχών	Ορότυπος	Αυξότυπος	Προέλευση Λοίμωξης, χρονολογία απομόνωσης
PP/TR NG (n=5)				
asian⁺ TetM-D	1	Arst	Proto	Φιλιππίνες (ναυτικός)-1998
	1	Arst	Proto	Κολομβία (ναυτικός)-1998
	1	Bpyt	P ⁻	Βόλος (ναυτικός)-1998
	1	Bpt	Proto	Ελλάδα (Ινδονησιανή)-1999
rio⁺ TetM-D	1	Arst	Proto	Βραζιλία (ναυτικός)-1999

PP/QR NG (n=3)

toronto⁺	1	Bopst	P ⁻	Ταϊλάνδη-1998
african⁺	1	Arst	H ⁻	Ταϊλάνδη-2001
african⁻	1	Arst	P ⁻	Ελλάδα (MSM)-2002

TR/QRNG (n=2)

TetM-D	2	Arst	Proto	Ελλάδα-1998, Ταϊλάνδη-2002
---------------	---	------	-------	----------------------------

PP/TR/QR NG (n=6)

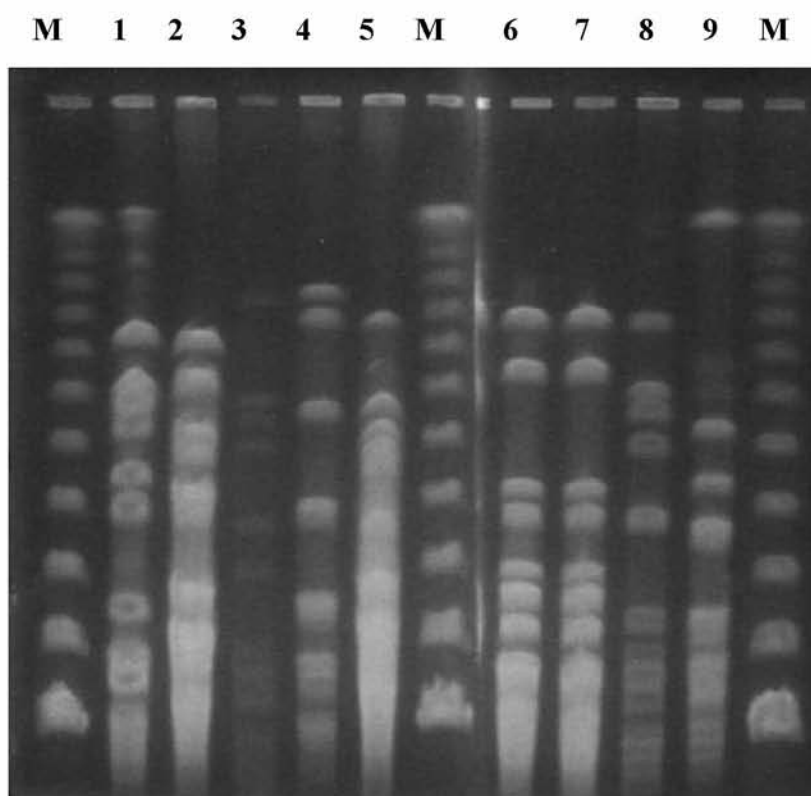
african⁺ TetM-D	1	Arst	Proto	Ταϊλάνδη (ναυτικός)-1999
	1	Aost	P ⁻	Μπαγκλαντές-2000
african⁺ TetM-A	2	Bopyt	NNGR	Ταϊλάνδη-2001
	1	Broys	P ⁻	Ταϊλάνδη (ναυτικός)-2002
toronto⁺ TetM-D	1	Arst	Proto	Ελλάδα (Αγγλίδα)-2002

Συντομογραφίες

conj: ενδογενές συζευκτικό πλασμίδιο του γονοκόκκου (24,5 MDa). **asian**, **afr**, **tor**: ασιατικού, αφρικανικού, και Toronto -τύπου πλασμίδια αντοχής στην πενικιλίνη, αντίστοιχα. (†) ή (), παρουσία ή απουσία και συζευκτικού πλασμιδίου. **Tet-M-A & Tet-M-D**: συζευκτικό πλασμίδιο αντοχής στην τετρακυκλίνη (25.2 MDa), αμερικανικού και ολλανδικού τύπου, αντίστοιχα. **cr**: κρυπτικό πλασμίδιο

5. Μοριακή τυποποίηση Επιλέκτων Στελεχών Γονοκόκκου με PFGE

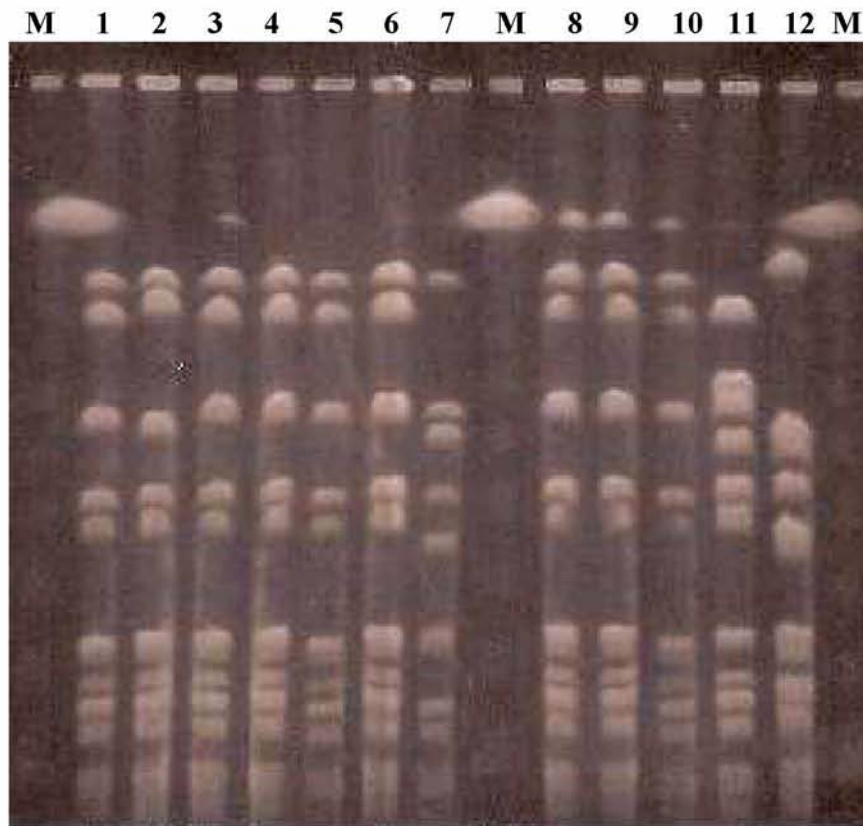
Μοριακή τυποποίηση με PFGE εφαρμόστηκε στα στελέχη με πλασμιδιακή αντοχή στην τετρακυκλίνη, λόγω της σπανιότητάς τους, καθώς και σε αθροίσματα φαινοτυπικά ομοίων στελεχών που παρουσίασαν έξαρση, ενδεικτική πιθανής κλωνικής διασποράς, κατά τη διάρκεια της πενταετίας 1998-2002. Συγκεκριμένα, προσδιορίστηκαν και συγκρίθηκαν οι SpeI παλσότυποι των PPNG στελεχών του τύπου Boys/afr⁺ και των ευαίσθητων στελεχών του οροτυπικού συμπλέγματος B[γ][p]yust, για τα οποία οι ενδείξεις πιθανής επιδημικής διασποράς προέκυψαν από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης. Η κλωνικότητα των QDS στελεχών του τύπου Arst/Proto/conj⁺/cfr⁻, καθώς και των πολυανθεκτικών στελεχών του οροτυπικού συμπλέγματος B[γ]opyst, που βρίσκονταν σε αποδρομή κατά την υπό μελέτη περίοδο, είχε ήδη διερευνηθεί πριν από την έναρξη της παρούσας διατριβής, για μεν τα πρώτα για το διάστημα 1991–1999, για δε τα δεύτερα για το διάστημα 1991–1998 (Mavroidi et al. 2000 & Mavroidi et al. 2001, αντίστοιχα). Στην παρούσα διατριβή, μοριακή τυποποίηση εφαρμόστηκε στα στελέχη B[γ]opyst που απομονώθηκαν μετά το έτος 1998, ώστε να διερευνηθεί ο βαθμός συγγενείας τους με τα αντίστοιχα των προηγούμενων ετών. Για στελέχη του κλώνου Arst/Proto/conj⁺/cfr⁻ δεν προέκυψε ανάγκη περαιτέρω χαρακτηρισμού, γιατί δεν επανεμφανίστηκαν μετά το 1999.



Εικόνα 22: PFGE αντιπροσωπευτικών TRNG στελεχών (1-9). Στις διαδρομές 6 & 7, τα δύο μοναδικά TRNG στελέχη που είχαν πανομοιότυπους SpeI παλσότυπους. M: DNA ladder, 8200, 3500, 2700, 1700, 800, 500 bp.

Παλσότυποι στελεχών με πλασμιδιακή αντοχή στην τετρακυκλίνη

Η PFGE ανάλυση των 23 στελεχών που φιλοξενούσαν πλασμίδια αντοχής στην τετρακυκλίνη έδειξε ότι συνιστούσαν ετερογενή πληθυσμό, όπως άλλωστε ήταν αναμενόμενο από την ετερογένεια των φαινοτυπικών τους χαρακτήρων. Συγκεκριμένα, τα 23 στελέχη διακρίθηκαν σε 22 παλσότυπους που διέφεραν μεταξύ τους κατά δύο ή περισσότερες ζώνες, ενώ η συμβατική τυποποίηση τα είχε διαφοροποιήσει σε 20 διακριτούς S/A/Pc-τύπους (βλ. Πίνακα 17γ). Δύο μόνο στελέχη PP/TR/QR αποδείχθηκαν ίδια και αυτά πράγματι προέρχονταν από ζεύγος συζύγων. Αντιπροσωπευτική φωτογραφία TRNG στελεχών σε PFGE παρουσιάζεται στην *Εικόνα 22*.



Εικόνα 23: PFGE αντιπροσωπευτικών PPNG στελεχών του αθροίσματος Boys/Hyx⁻/afr⁺ (1-6 & 8-9). Στις διαδρομές 7, 10, 11 και 12, PPNG στελέχη με διαφορετικά φαινοτυπικά χαρακτηριστικά (S/A/Pc τύποι Bopyst/Hyx⁻/afr⁺, Bys/NNGR/afr⁺, Bs/Hyx⁻/afr⁺ & Bopys/Proto/afr⁺, αντίστοιχα). M: DNA ladder, 8200, 3500, 2700, 1700, 800, 500 bp.

Παλσότυποι πενικιλλινασοπαραγωγών στελεχών ορότυπου Boys

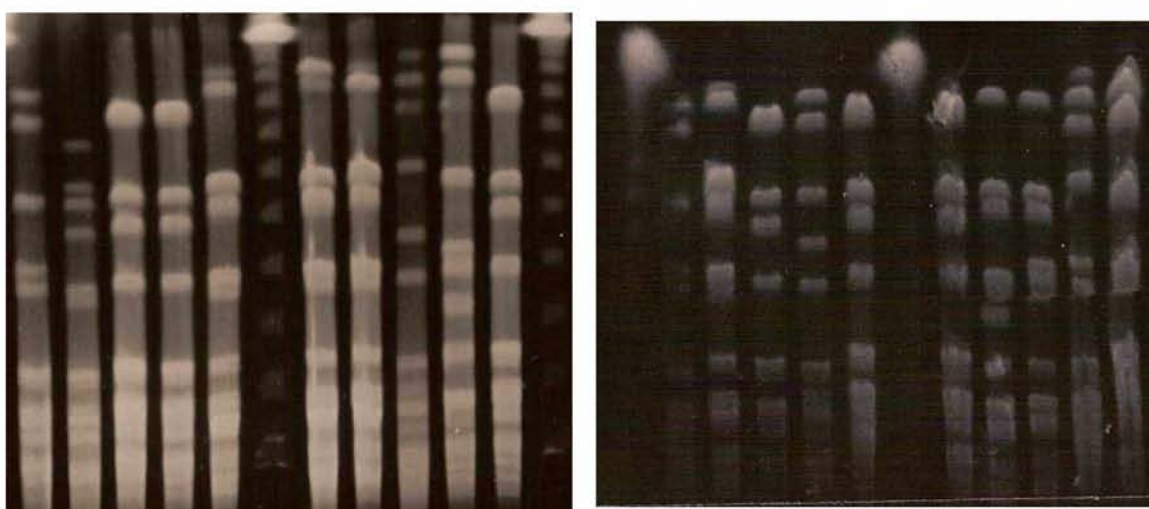
Τα αποτελέσματα από την PFGE τυποποίηση έδειξαν ότι τα 22 PPNG στελέχη που είχαν όμοιους φαινοτυπικούς χαρακτήρες (Boys/Hyx⁻/afr⁺, βλ. και Πίνακα 17α) ήταν και γενετικά όμοια, καθώς παρουσίασαν όλα πανομοιότυπους παλσότυπους. Ίδιο παλσότυπο εμφάνισε επίσης ένα στέλεχος με παρεμφερή ορότυπο και ίδια κατά τα άλλα χαρακτηριστικά (Bys/Hyx⁻/afr⁺) Τρία στελέχη, που ελέγχθηκαν παράλληλα επειδή είχαν διαφορετικούς μεν, αλλά παραπλήσιους φαινοτυπικούς χαρακτήρες, παρουσίασαν διαφορετικούς παλσότυπους (Εικόνα 23).

Αποτελέσματα

Παλσότυποι ευαίσθητων στελεχών του συμπλέγματος οροτύπων B[r][p]yust

Η τυποποίηση με PFGE ταξινόμησε τα 129 στελέχη που ανήκαν σε έναν από τους ορότυπους Brgyust, Bryust, Brgyust ή Byust σε δύο κύριους πλασότυπους, A και B (Εικόνα 24). Ο επικρατέστερος, A, με τέσσερις υπότυπους (A1, A2, A3, A4) συγκέντρωνε 112 (86,8%) στελέχη, ενώ ο δεύτερος πλασότυπος, B, με τρεις υπότυπους (B1, B2, B3), εκπροσωπήθηκε από 15 από τα 129 στελέχη (11,6%).

B U A A A₁ M A₁ A₂ B₁ B₂ A M B A₂ A B₃ A M A A₃ A₄ B₁ B₂



Εικόνα 24: PFGE αντιπροσωπευτικών στελεχών του οροτυπικού συμπλέγματος B[r][p]yust. Διακρίνονται οι επικρατέστεροι SreI παλσότυποι, A και B, και οι υπότυποί τους. U: πλασότυπος εκπροσωπούμενος από ένα μόνο στέλεχος (Unique). M: DNA ladder, 8200, 3500, 2700, 1700, 800, 500 bp.

Πίνακας 18: Κατανομή 129 στελεχών οροτύπων B[r][p]yust σε PFGE-τύπους

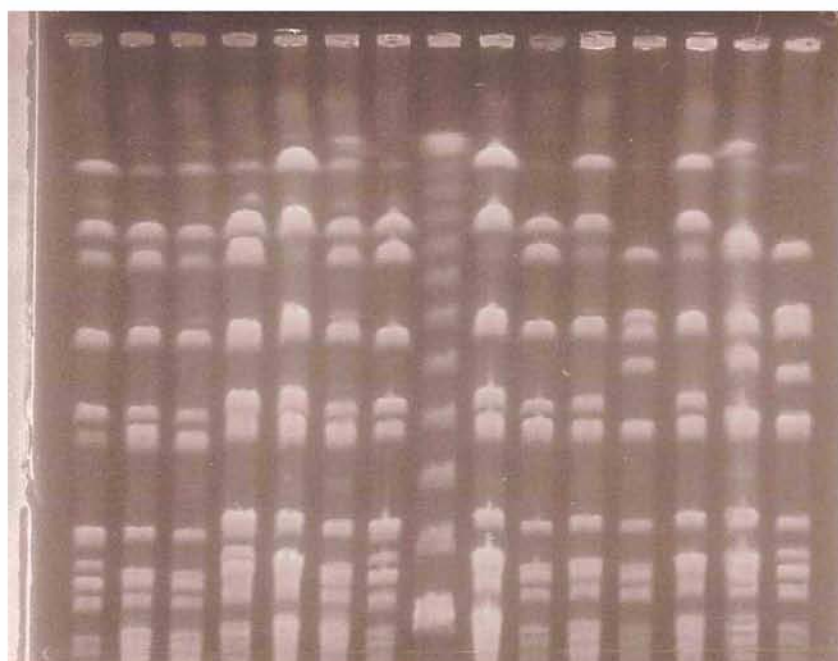
Ορότυπος	A	A1	A2	A3	A4	B	B1	B2	B3	U	Σύνολο
Brgyust	45	14	7	4		6					76
B_ryust	7	16			3		2	2	1		31
Br_yust	10	6				3				1	20
B__yust						1				1	2
Σύνολο	62	36	7	4	3	10	2	2	1	2	129

Οι υπότυποι συνιστούσαν ποικιλίες που διέφεραν από τον βασικό παλσότυπο κατά μία ζώνη. Τα δύο στελέχη του συμπλέγματος οροτύπων B[r][p]yust που δεν ήταν ευαίσθητα, συγκεκριμένα ένα στέλεχος PPNG (Bryust/Proto/afr⁺) και ένα QRNG (Bryust/Proto/conj⁺cr⁺) είχαν μοναδικούς παλσότυπους (U). Η κατανομή των 129 στελεχών στους δύο κύριους παλσότυπους και τους υπότυπους τους παρουσιάζεται στον Πίνακα 18.

Παλσότυποι πολυανθεκτικών στελεχών των οροτύπων B[r]opyst

Κατά την τυποποίηση με PFGE των 27 στελεχών B[r]opyst που απομονώθηκαν μετά το 1998 και είχαν φαινότυπους διασταυρούμενης χρωμοσωματικής αντοχής ή

A₁ A₂ A₂ A₃ A₄ A₅ A₂ M A₄ A₂ A₁ C A₁ O C₁



Εικόνα 25. PFGE 11 αντιπροσωπευτικών στελεχών B[r]opyst με φαινότυπους ΔΧΑ που απομονώθηκαν μετά το 1998.

Διακρίνονται ποικιλίες του παλσότυπου A και οι παλσότυποι C, C₁ και O, τριών B[r]opyst στελεχών με άλλους φαινότυπους.

M: DNA ladder

μειωμένης ευαισθησίας (ΔΧΑ), ανιχνεύθηκε ο επικρατέστερος από τους τρεις παλσότυπους (A, B, C) στους οποίους είχαν κατανεμηθεί τα B[r]opyst πολυανθεκτικά στελέχη που απομονώθηκαν κατά την περίοδο 1991–1998.

Συγκεκριμένα, τα 25 από τα 27 στελέχη εμφάνισαν ποικιλίες (A1-A5) του παλσότυπου A (Εικόνα 25), ο οποίος είχε προηγουμένως βρεθεί στα μη-PPNG πολυανθεκτικά B[r]opyst στελέχη της περιόδου 1993-1998. Κατά τα λοιπά τους χαρα-

Αποτελέσματα

κτηριστικά, όπως προέκυψαν από τα αποτελέσματα της συμβατικής τυποποίησης, τα 25 πολυανθεκτικά στελέχη B[γ]oryst που εμφάνισαν παλσότυπους A ήταν πρωτότροφα και φιλοξενούσαν μόνο το ενδογενές κρυπτικό πλασμίδιο του γονοκόκκου (Proto/cr), όπως και τα αντίστοιχα της περιόδου 1993 – 1998.

Από τα υπόλοιπα στελέχη οροτύπων B[γ]oryst που απομονώθηκαν μετά το 1998, αλλά παρουσίαζαν άλλους φαινότυπους αντοχής (81 στελέχη, βλ. Πίνακα 16), μοριακή τυποποίηση με SpeI ανάλυση σε PFGE εφαρμόστηκε στα PPNG στελέχη και σε δέκα ακόμα, που επελέγησαν τυχαία από 57 μη-PPNG στελέχη που δεν είχαν πολυανθεκτικούς φαινότυπους. Τα PPNG B[γ]oryst εμφάνισαν παλσότυπους που προσομοίαζαν με τον παλσότυπο C, που απαντούσε και σε αντίστοιχων φαινοτύπων στελέχη της προηγούμενης πενταετίας, ενώ τα στελέχη με ευαίσθητους φαινότυπους εμφάνισαν διαφορετικούς (O –από “Other”) παλσότυπους (*Εικ. 25*).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Από προηγούμενες μελέτες έχει τεκμηριωθεί ότι η επίπτωση της γονόρροιας στην Ελλάδα μειώθηκε απότομα το 1986 και έκτοτε διατηρήθηκε σταθερή, σε χαμηλά επίπεδα, έως και το 1996 (Kyriakis et al. 1999). Ανάλογες μειώσεις στην επίπτωση της νόσου παρατηρήθηκαν κατά τη δεκαετία του 1980 σε όλες σχεδόν τις ανεπτυγμένες χώρες του Δυτικού Κόσμου (Β. Αμερική, Δυτική Ευρώπη), καθώς και στην Αυστραλία και, γενικά, σε γεωγραφικές περιοχές που χαρακτηρίζονται από υψηλό βοιοτικό επίπεδο (Aral & Holmes 1990, Treurniet & Davidse 1993, Falk & Vandbakk 1993, Mayer et al. 1994, Fox et al. 1998, Austr GSP 1993). Το φαινόμενο αυτό, που σε παγκόσμια κλίμακα αποδόθηκε σε μεταβολές στη σεξουαλική συμπεριφορά του γενικού πληθυσμού, λόγω της πρόσφατης, τότε, εμφάνισης του AIDS, ακολούθησαν περιγραφές των πληθυσμιακών χαρακτηριστικών της γονόρροιας που υποδεικνύουν μεταβολές στη σύνθεση του νοσούντος πληθυσμού, με αυξανόμενη συγκέντρωση των κρουσμάτων σε ομάδες υψηλού κινδύνου. Οι πληθυσμιακές αυτές ομάδες, στις οποίες συγκεντρώνεται η νόσος σε περιόδους χαμηλής επίπτωσης (ομάδες πυρήνες ή “core groups”), θεωρείται ότι συνιστούν εστίες συντήρησης και μελλοντικής αναζωπύρωσης της νόσου (Barnes 1984, Carne et al. 1987, Austr GSP 1988, van de Laar et al. 1990, Boily & Brunham 1993).

Οι μεταβολές στα πληθυσμιακά χαρακτηριστικά της γονόρροιας αντανακλώνται σε μεταβολές και στα μικροβιολογικά χαρακτηριστικά της νόσου, καθώς η επικίνδυνη σεξουαλική συμπεριφορά που χαρακτηρίζει τις ομάδες-πυρήνες διευκολύνει τη μετάδοση και την παραμονή των ίδιων τύπων στελεχών γονοκόκκου στην κοινότητα και ευνοεί την ανάπτυξη και διασπορά της αντοχής. Ήδη από το τέλος της δεκαετίας του '80 είχε διατυπωθεί η παρατήρηση ότι «όσο η επίπτωση της γονόρροιας μειώνεται, η επικράτηση ανθεκτικών στελεχών αυξάνεται» (Easmon 1990). Επιπλέον, στην περίοδο χαμηλής επίπτωσης της γονόρροιας εμπίπτουν χρονικά οι πρώτες αναφορές για στελέχη γονοκόκκου που δεν υπήρχαν προηγουμένως στη *Neisseria gonorrhoeae*. Χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι η εμφάνιση στελεχών με πλασμίδια αντοχής στην τετρακυκλίνη, στις Η.Π.Α και στην Ολλανδία το 1985 (CDC 1985, Morse et al. 1986), καθώς και η ανάδυση και ταχεία εξάπλωση αντοχής στις νεότερες κινολόνες (QRNG)

κατά τη δεκαετία του 1990 (Dan 2004a).

Σε ανταπόκριση προς το παραπάνω γνωστικό υπόβαθρο, η παρούσα εργασία σχεδιάστηκε με στόχο την παρακολούθηση της ευαισθησίας της *N. gonorrhoeae* στα αντιβιοτικά στην Ελλάδα κατά την πενταετία 1998–2002. Τα αποτελέσματα εκτιμήθηκαν σε συνάρτηση με τους επιδημιολογικούς δείκτες της γονόρροιας, όπως αυτοί διαμορφώθηκαν σε συνέχεια προηγούμενων ετών. Από τα ευρήματα, εντοπίστηκαν μεταβολές που επισυνέβησαν κατά την υπό μελέτη πενταετία σε σύγκριση με την αμέσως προηγούμενη ισοετή περίοδο (1993–1997).

Η επίπτωση της γονόρροιας παρέμεινε αμετάβλητη κατά τη διάρκεια της πενταετίας που μελετήθηκε, κυμαινόμενη στα χαμηλά επίπεδα, στα οποία έχει καθηλωθεί από την αρχή της δεκαετίας του 1990 (1-2‰). Αντίθετα, στη σύνθεση του πληθυσμού που νόσησε παρατηρήθηκαν σημαντικές μεταβολές, με εντυπωσιακές αυξήσεις στα ποσοστά των επαφών που σχετίζονταν με οικονομικούς μετανάστες, καθώς και αυτών των ομο- και αμφιφυλοφίλων (MSM). Στο σύνολο του δείγματος, η παρουσία οικονομικών μεταναστών έφθασε σε 28%, έναντι 15% την προηγούμενη πενταετία, ενώ των MSM σε 23%, έναντι 10,6% την προηγούμενη πενταετία. Και για τις δύο αυτές ομάδες, η αύξηση ήταν προοδευτική, διαγράφοντας μεταξύ των ετών 1993 και 2002 συνεχή τάση αύξησης, των μεν οικονομικών μεταναστών από 8,4% σε 30,8%, των δε MSM από 4,6% σε 36,2%.

Η προέλευση των οικονομικών μεταναστών, που είτε νόσησαν είτε μετέδωσαν τη νόσο, ήταν κυρίως από τις ανατολικές χώρες (31% από την Αλβανία, 23% από άλλες χώρες των Βαλκανίων και 30%, στο σύνολο των μεταναστών, από τις χώρες της πρώην Σοβιετικής Ένωσης). Για αυξανόμενη επίπτωση της γονόρροιας σε ομάδες μεταναστών δεν υπάρχουν παρά λίγες σύγχρονες αναφορές από άλλες χώρες (Prins 1994). Η παρατήρηση του φαινομένου αυτού στην Ελλάδα είναι ευεξήγητη, καθώς η αύξηση που παρατηρήθηκε συμπίπτει χρονικά με την αθρόα συρροή οικονομικών μεταναστών στη χώρα κατά τη δεκαετία του '90 και εναρμονίζεται με την υπόθεση της εστίασης των κρουσμάτων σε ομάδες-πυρήνες (core-groups). Οι μετανάστες, όπως και οι MSM, λόγω των στοιχείων που τους διαφοροποιούν από το γενικό πληθυσμό (βιοτικό επίπεδο, προέλευση, γλώσσα επικοινωνίας, ήθη) συνιστούν ιδιαίτερα δίκτυα μετάδοσης

της νόσου και συγκεντρώνουν τα χαρακτηριστικά ομάδων-πυρήνων, στις οποίες είναι αναμενόμενο να συγκεντρώνεται και να συντηρείται η γονόρροια (Verkleij 1976, Hooykaas C et al. 1991, Prins et al. 1994).

Η αυξανόμενη παρουσία των MSM στον πληθυσμό που προσβάλλεται από γονόρροια έχει αναφερθεί από πολλούς συγγραφείς στη διεθνή βιβλιογραφία (Goulet et al. 2000, Fox et al. 2001, Geisler et al. 2002, Ciesielski 2003). Σε μερικές μάλιστα από τις αναφορές αυτές, οι αυξήσεις στα κρούσματα των MSM συσχετίζονται με τάσεις συνολικής ανάκαμψης της γονόρροιας, που έχουν αρχίσει να διαφαίνονται σε πολλές χώρες, όπως στις Η.Π.Α., στην Αγγλία, την Ολλανδία, τη Σουηδία, το Ισραήλ κ.α. (Fox et al. 2001, Geisler et al. 2001, Fenton 2000, van der Heyden et al. 2000, Berglund 2001, Green 2003). Τα φαινόμενα αυτά αποδίδονται σε υποστροφή των MSM στην πρότερη επικίνδυνη σεξουαλική τους συμπεριφορά, λόγω της ανακούφισης από το φόβο του AIDS που επέφερε η εισαγωγή αποτελεσματικών θεραπευτικών σχημάτων για την αντιμετώπισή του (CDC 2000, Stolte et al. 2002, Ciesielski 2003). Η χαλάρωση της μέριμνας για μέτρα προφύλαξης και ασφαλείς επαφές, η αύξηση του αριθμού των ερωτικών συντρόφων και η καθυστέρηση στην αναζήτηση θεραπείας αυξάνουν τον κίνδυνο λοίμωξης όσο και τη διάρκεια μεταδοτικότητας της γονόρροιας και είναι αναμενόμενο να οδηγούν σε διασπορά της νόσου, αρχικά μέσα στις ομάδες που επιδεικνύουν αυτή τη συμπεριφορά και, σε δεύτερο στάδιο, στο γενικό πληθυσμό.

Τα ευρήματα της εργασίας ως προς τα μικροβιολογικά χαρακτηριστικά της γονόρροιας ήταν ανάλογα με εκείνα άλλων χωρών της Ευρώπης και, σε γενικές γραμμές, ερμηνεύονται στα πλαίσια της επιδημιολογικής εικόνας που περιγράφηκε παραπάνω, υποδεικνύοντας και αυτά τη συγκέντρωση της νόσου σε ομάδες-πυρήνες.

Όσον αφορά την ευαισθησία του γονοκοκκικού δείγματος της περιόδου 1998- 2002, διαπιστώθηκαν υψηλές συχνότητες απομόνωσης ανθεκτικών στελεχών και στελεχών με μέτρια ευαισθησία σε όλα τα αντιβιοτικά που εξετάστηκαν, με εξαίρεση την κεφοταξίμη και τη σπεκτινομυκίνη. Συγκριτικά με την προηγούμενη πενταετία, τα συνολικά ποσοστά αντοχής δεν μεταβλήθηκαν σημαντικά. Ωστόσο, περαιτέρω ανάλυση των φαινοτύπων ευαισθησίας αποκάλυψε ποιοτική διαφοροποίηση στην ευαισθησία του ελληνικού δείγματος γονοκόκκων, αναδεικνύοντας αυξητική τάση στη συχνότητα στελεχών με υψηλού επιπέδου αντοχή (PPNG, TRNG, QRNG) και, αντίθετα, πτωτική

τάση στη συχνότητα στελεχών με χρωμοσωματική αντοχή (CMR) (Stathi et al. 2006). Σε προηγούμενες μελέτες του ΕΚΑΓ, που αφορούσαν τα δείγματα γονοκόκκου που είχαν απομονωθεί από την ελληνική κοινότητα από το 1991 έως και το 1998, είχαν επισημανθεί υψηλά ποσοστά CMR στελεχών με διασταυρούμενη αντοχή στην πενικιλίνη, τετρακυκλίνη, ερυθρομυκίνη και χλωραμφαινικόλη, τα οποία είχαν αποδοθεί κυρίως σε επιδημική διασπορά πολυανθεκτικών κλώνων του οροτυπικού συμπλέγματος B[γ]opyst στα δίκτυα των MSM και των οικονομικών μεταναστών (Tzelepi et al. 1997, Mavroidi et al. 2001). Ο χαρακτηρισμός των στελεχών της περιόδου 1998–2002 έδειξε ότι η ελάττωση που παρατηρήθηκε από το 1998 και εξής στις συχνότητες CMR στελεχών οφειλόταν, αφενός σε μερική αποδρομή των πολυανθεκτικών κλώνων B[γ]opyst και, αφετέρου, στην ευρεία επικράτηση άλλου τύπου στελεχών, που ανήκαν στο σύμπλεγμα οροτύπων B[γ][p]yust και είχαν σχετικά ευαίσθητους φαινότυπους. Η εξέταση των ιστορικών των ασθενών, από τους οποίους απομονώθηκαν τα ευαίσθητα B[γ][p]yust στελέχη, συσχέτισε τον τύπο αυτό με επιδημική έξαρση που εκδηλώθηκε το 2001 στο δίκτυο των MSM και εξαπλώθηκε στη συνέχεια, κατά το 2002, και στους ετεροφυλόφιλους. Η διασπορά των κλώνων B[γ][p]yust είναι η πρώτη, στην Ελλάδα, περιγραφή επιδημικής έξαρσης που προκαλείται από εξάπλωση μη-ανθεκτικών στελεχών.

Κατά την υπό μελέτη περίοδο, σημειώθηκαν οι υψηλότερες συχνότητες απομόνωσης πενικιλίνασοπαραγωγών (PPNG) στελεχών που έχουν καταγραφεί ως τώρα στην Ελλάδα από το 1982 και εξής, δηλαδή αφότου άρχισε να γίνεται συστηματική καταγραφή της αντοχής των στελεχών γονοκόκκου που απομονώνονται από την ελληνική κοινότητα. Συγκεκριμένα, οι ετήσιες συχνότητες απομόνωσης PPNG στελεχών που καταγράφηκαν στην παρούσα εργασία για τα έτη 1998–2002 κυμάνθηκαν από 11,4% έως 16,3%, ενώ οι αντίστοιχες συχνότητες κατά τα προηγούμενα χρόνια ήταν 6-7,5% από το 1982 έως το 1996 και 9,3% το 1997 (Sima & Mavrommati-1986, Mavrommati et al. 1988, Tzelepi et al. 1991, Tzelepi et al. 1997, Stathi et al. 2006). Επίσης, ενώ κατά τα προηγούμενα είχε παρατηρηθεί ότι τα πενικιλίνασοπαραγωγά στελέχη που απομονώνονταν στην Ελλάδα παρουσίαζαν οροτυπική ετερογένεια και ήταν ποικίλης γεωγραφικής προέλευσης (Tzelepi et al. 1991 & 1997, Kyriakis et al. 1999), αυτά της πενταετίας 1998–2002 συνιστούσαν πιο ομοιογενή πληθυσμό και, στην πλειονότητά τους (73%), προέρχονταν από λοιμώξεις που αποκτή-

θηκαν εντός Ελλάδας.

Ως προς την προέλευση, όσο και ως προς την ομοιογένεια, παρατηρήθηκε διαφοροποίηση μεταξύ των αμιγώς PPNG και των «μεικτών» PPNG, που έφεραν ταυτόχρονα και άλλους μηχανισμούς αντοχής υψηλού επιπέδου (PP/TR, PP/QR, PP/TR/QR). Τα μεικτά PPNG (20% στο σύνολο των πενικιλινασοπαραγωγών στελεχών) είχαν τα χαρακτηριστικά ετερόκλητου πληθυσμού και τα περισσότερα από αυτά (78%) απομονώθηκαν από περιστατικά (κυρίως ναυτικούς) που μολύνθηκαν σε εξωτικές γεωγραφικές περιοχές (Φιλιππίνες, Ταϊλάνδη, Μπαγκλαντές, Βραζιλία, Κολομβία). Αντίθετα, από τα 56 αμιγώς PPNG στελέχη, μόνον 11 (19,6%) σχετιζόνταν με λοιμώξεις που αποκτήθηκαν στο εξωτερικό ή από αλλοδαπούς, με σχεδόν αποκλειστική χώρα προέλευσης τη Ρουμανία. Τα στελέχη από τη Ρουμανία απομονώθηκαν κατά τα τρία πρώτα έτη της υπό μελέτη περιόδου (1998-2000) και συγκαταλέγονταν στα B[γ]opyst/af⁺ στελέχη παλσοτύπου C, τα οποία συνδύαζαν πλασμιδιακή αντοχή στην πενικιλίνη και χρωμοσωματικούς χαρακτήρες πολλαπλής αντοχής. Ο τύπος αυτός στελεχών είχε εμφανιστεί στην Ελλάδα ήδη από το 1994 και, σε προηγούμενες μελέτες, είχε εξακριβωθεί ότι συνιστούσε κλώνο που διεσπάρη στο δίκτυο των μεταναστών που προέρχονταν από τη Ρουμανία και τη Ρωσία (Mavroidi et al. 2001). Κατά την εδώ εξεταζόμενη περίοδο διαπιστώθηκε σταδιακή αποδρομή του κλώνου αυτού των PPNG μεταξύ των ετών 1998 και 2001.

Σε επικρατέστερο τύπο PPNG στελεχών κατά την υπό μελέτη περίοδο αναδείχθηκε ο τύπος Boys/Proto/af⁺, ο οποίος ανιχνεύθηκε σε 22 (39,3%) από τα αμιγώς PPNG στελέχη. Η φαινοτυπική και γονοτυπική ομοιότητα των στελεχών του τύπου αυτού δείχνει ότι η επικράτησή τους οφειλόταν επίσης σε κλωνική διασπορά, η οποία όμως, στην περίπτωση αυτή, δεν συσχετιζόταν με καμία ιδιαίτερη πληθυσμιακή ομάδα. Τα PPNG στελέχη του τύπου Boys/Proto/af⁺ απομονώνονταν σε όλη τη διάρκεια της περιόδου 1998-2002 και προέρχονταν όλα από περιστατικά λοιμώξεων που αποκτήθηκαν στην Ελλάδα, σε επαφές μεταξύ ετεροφυλοφίλων ελληνικής εθνικότητας. Ανάλογα στοιχεία προέλευσης είχε και το πρώτο και μοναδικό στέλεχος γονοκόκκου αυτού του τύπου που είχε απομονωθεί πριν από την υπό μελέτη περίοδο, συγκεκριμένα το 1995 (αδημοσίευτα στοιχεία ΕΚΑΓ). Τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν ότι ο τύπος Boys/Proto/af⁺ συνιστά ενδημικό κλώνο PPNG στελεχών που έχει εγκατασταθεί στην ελληνική κοινότητα. Η διασπορά του στο γενικό πληθυσμό φαίνεται να είναι ο κύριος

παράγοντας που προκάλεσε την αριθμητική αύξηση όσο και την αύξηση της ομοιογένειας στο δείγμα των PPNG στελεχών κατά την περίοδο που μελετήθηκε.

Το 13% των στελεχών που απομονώθηκαν στην Ελλάδα κατά την υπό μελέτη περίοδο ήταν ανθεκτικά στην τετρακυκλίνη. Από αυτά, το 1/3 (4,4%) ήταν στελέχη με υψηλού επιπέδου αντοχή στην τετρακυκλίνη, που οφειλόταν στην παρουσία συζευκτικών πλασμιδίων TetM ολλανδικού είτε αμερικανικού τύπου. Το 56% των TRNG (13 στελέχη) ήταν «μεικτά TRNG», δηλαδή έφεραν και άλλους μηχανισμούς αντοχής υψηλού επιπέδου (πλασμίδια αντοχής στην πενικιλίνη ή/και μεταλλαγές αντοχής στις κινολόνες). Στο σύνολό τους, τα TRNG στελέχη ήταν φαινοτυπικά και γονοτυπικά ετερογενή. Ως προς την προέλευση, παρατηρήθηκε διαφοροποίηση μεταξύ των αμιγών και των μεικτών TRNG. Τα αμιγώς TRNG προέρχονταν κυρίως από την ελληνική κοινότητα (7:10), ενώ τα μεικτά συνοδεύονταν όλα από επιδημιολογικά ιστορικά με ενδείξεις εισαγωγής από ποικίλες γεωγραφικές περιοχές (Πίνακας 17, β & γ). Αν και σε σύγκριση με την προηγούμενη πενταετία παρατηρήθηκε μικρή αύξηση στον αριθμό των TRNG στελεχών (αμιγή: 1,9% από 1,4% / μεικτά: 2,5% από 1,9%), η ετερογένειά τους και οι χαμηλές κατ' έτος συχνότητες απομόνωσής τους δείχνουν χαμηλή ενδημικότητα, χωρίς τάσεις διασποράς στην ελληνική κοινότητα.

Στελέχη γονοκόκκου με πλασμιδιακή αντοχή είτε στην πενικιλίνη είτε στην τετρακυκλίνη απαντούν πλέον σε όλο τον κόσμο και σχεδόν παντού απομονώνονται σε συχνότητες που υπερβαίνουν το κρίσιμο όριο του 5%, το οποίο θεωρείται απαγορευτικό για την εμπειρική χορήγηση των αντιβιοτικών αυτών χωρίς προηγούμενο έλεγχο ευαισθησίας (Tapsall 2002). Παρά το ότι τα PPNG στελέχη εμφανίστηκαν δέκα χρόνια νωρίτερα από τα TRNG, η γεωγραφική κατανομή των δύο τύπων είναι σήμερα παρόμοια, λόγω της συχνής συνύπαρξης των δύο ειδών πλασμιδίων στα ίδια στελέχη. Σε γενικές γραμμές οι υψηλότερες συχνότητες PPNG, TRNG και PP/TRNG στελεχών (>50%) αναφέρονται κυρίως από τις χώρες του Τρίτου Κόσμου (Αφρική, Ασία, Λατινική Αμερική), όπου άλλωστε και η συνολική επίπτωση της γονόρροιας ήταν ανέκαθεν υψηλότερη και παρέμεινε αμετάβλητη κατά την περίοδο της κάμψης της γονόρροιας στον πιο ανεπτυγμένο κόσμο. Στις χώρες με υψηλότερο βοιοτικό επίπεδο, όπως οι Η.Π.Α. ο Καναδάς, οι χώρες της Ευρώπης, η Αυστραλία και Ν. Ζηλανδία και η Ιαπωνία, τα αναφερόμενα ποσοστά PPNG και TRNG στελεχών είναι κατά κανόνα χαμηλότερα (<20%), αλλά παρουσιάζουν αποκλίσεις και διακυμάνσεις, ανάλογα με την

εγκατάσταση ενδημικών ή την ευκαιριακή εξάπλωση επιδημικών στελεχών (Tapsall 2001, Τζελέπη 2005). Η σεξουαλική συμπεριφορά του πληθυσμού ή ομάδων του πληθυσμού, αλλά και άλλοι παράγοντες, όπως οι μικρότερης ή μεγαλύτερης κλίμακας μετακινήσεις πληθυσμών, είναι οι συνηθέστερες από τις αιτίες στις οποίες αποδίδονται οι μεταβολές αυτές.

Στην Ευρώπη, οι υψηλότερες συχνότητες PPNG και TRNG κατά την περίοδο χαμηλής επίπτωσης της γονόρροιας έχουν αναφερθεί από την Πορτογαλία (27% PPNG, το 1988 και 52% TRNG, το 1995), την Ισπανία (54% PPNG, το 1994, και 14% TRNG, το 1995) και την Ολλανδία (PPNG 31%, το 1990, και TRNG 18% το 1995 (van Duynhoven 1999, Arreaza 2003, Prins 1994). Ειδικότερα για την Ολλανδία, η αυξημένη συχνότητα PPNG (31%) που σημειώθηκε κατά τη διετία 1989-1990 στο γενικό πληθυσμό του Άμστερνταμ διαπιστώθηκε πως οφειλόταν κυρίως σε σεξουαλικές επαφές ανάμεσα σε Τούρκους μετανάστες και πόρνες που είχαν μεταναστεύσει από χώρες της Κεντρικής και της Ν. Αμερικής (Prins 1994). Τα χαμηλότερα ποσοστά PPNG και TRNG στελεχών (5,5% και 4,1%, αντίστοιχα) έχουν αναφερθεί από τη Φινλανδία (Nissinen et al. 1997, van Duynhoven YTHP 1999). Στις υπόλοιπες ευρωπαϊκές χώρες, οι συχνότητες απομόνωσης PPNG στελεχών κυμαίνονται από 14% έως 24% (το 1998, στη Γαλλία και τη Σουηδία, αντίστοιχα), ενώ η πλασμιδιακή αντοχή στην τετρακυκλίνη κυμαίνεται σε χαμηλότερα ποσοστά (van Duynhoven 1999, Tapsall 2001, Τζελέπη 2005).

Όσον αφορά την αντοχή στις κινολόνες, στην πενταετία που μελετήθηκε εμπίπτουν δύο ενδιαφέροντα ευρήματα: η επιδημική έξαρση του κλώνου Arst/Proto/conj⁺/cr⁻, που αφορούσε στελέχη μειωμένης ευαισθησίας, και η αυξανόμενη συχνότητα απομόνωσης άλλων τύπων QRNG στελεχών με υψηλά επίπεδα αντοχής στις νεότερες κινολόνες.

Ο μειωμένης ευαισθησίας τύπος Arst/Proto/conj⁺/cr⁻ πρωτοεμφανίστηκε το 1996 σε σποραδικά στελέχη γονοκόκκου και σταδιακά απέκτησε μεγάλη διασπορά, φθάνοντας στη μέγιστη συχνότητά του το 1998. Η παρουσία και η κλωνική σχέση των στελεχών αυτού του τύπου έγινε αμέσως αντιληπτή από τα σπάνια φαινοτυπικά χαρακτηριστικά τους –κυρίως από τον εξαιρετικά ασυνήθιστο συνδυασμό των ενδογενών τους πλασμιδίων (έλλειψη κρυπτικού, παρουσία συζευκτικού). Η γονοτυπική ομοιότητα και η προέλευση των στελεχών αυτών είχε διερευνηθεί σε προηγούμενη εργασία του ΕΚΑΓ, κατά την οποία η αυξημένη παρουσία τους συσχετίστηκε με κλωνική διασπορά

κυρίως μέσω του δικτύου των MSM (Mavroidi et al. 2000). Στην παρούσα εργασία διαπιστώθηκε ο περιορισμός και η εξαφάνιση, μετά το 1999, του κλώνου Arst/Proto/conj⁺/cr⁻. Ο αυτοπεριορισμός της επιδημικής εξάρσης που προκλήθηκε από τον ιδιόμορφο αυτό QRNG κλώνο, είναι πολύ πιθανό να σχετίζεται με τη φυσική ευαισθησία του τύπου αυτού στελεχών, τα οποία, αν και διέθεταν μηχανισμό αντοχής στις κινολόνες, ήταν στην ουσία ευαίσθητα σε όλα τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται στην κλινική πράξη για την αντιμετώπιση της γονόρροιας, με τιμές MIC πενικιλίνης, τετρακυκλίνης και ερυθρομυκίνης πολύ χαμηλότερες από όλο τον υπόλοιπο γονοκοκκικό πληθυσμό και τιμές MIC νορφλοξακίνης και σιπροφλοξακίνης στα όρια μεταξύ ευαισθησίας και μέτριας ευαισθησίας. Από άλλη οπτική γωνία, η παραδοχή ότι η εξαφάνιση του συγκεκριμένου κλώνου προήλθε από διακοπή της αλυσίδας διασποράς του, λόγω θεραπευτικής αντιμετώπισης –που θα μπορούσε να επιτευχθεί με οποιοδήποτε αντιβιοτικό– έρχεται σε αντίθεση με την παρατεταμένη παρουσία του στην κοινότητα επί 2 ½ περίπου χρόνια και, έμμεσα, υποδεικνύει ένα από τα χαρακτηριστικά των ομάδων υψηλού κινδύνου, συγκεκριμένα την αμέλεια στην έγκαιρη αναζήτηση ιατρικής βοήθειας.

Εξαιρουμένης της παρουσίας του παραπάνω κλώνου, η συχνότητα απομόνωσης γνήσιων QRNG στελεχών, με αντοχή ή μέτρια ευαισθησία στη σιπροφλοξακίνη και/ή τη νορφλοξακίνη, σημείωσε θεαματική αύξηση μέσα στην περίοδο που μελετήθηκε, εκκινώντας από 2,6% το 1998 για να φθάσει προοδευτικά σε 10% το 2002. Συνολικά, στο σύνολο των 526 στελεχών που απομονώθηκαν κατά την περίοδο 1998-2002, τα «γνήσια» QRNG συνιστούσαν το 5,6% (27 στελέχη), ενώ πριν από το 1998 η παρουσία τους στην Ελλάδα είχε εκπροσωπηθεί από δύο μόνο στελέχη, που είχαν απομονωθεί το 1990 και το 1997, αντίστοιχα. Αντίθετα προς τα μειωμένης ευαισθησίας στελέχη του κλώνου Arst/Proto/conj⁺/cr⁻, που συσχετίστηκαν με το δίκτυο των MSM και οικογενή διασπορά, τα ανθεκτικά στις νεότερες κινολόνες QRNG στελέχη παρουσίαζαν μεγάλη ετερογένεια τύπων (κατανομή σε 17 συνδυασμούς S/A/Pc –βλ. Πίνακα 17, β & γ), ενώ όσα από αυτά συνδύαζαν και άλλους μηχανισμούς, πλασμιδιακής αντοχής (11:27), συνδέονταν με ιστορικά απόκτησης στο εξωτερικό, προερχόμενα κυρίως από χώρες του Τρίτου Κόσμου, όπου ενδημούν στελέχη αυτού του τύπου.

Οι παρατηρήσεις της παρούσας εργασίας, σχετικά με την παρουσία ανθεκτικών και μειωμένης ευαισθησίας QRNG στελεχών στο ελληνικό δείγμα γονοκόκκων της περι-

όδου που μελετήθηκε, παρουσιάζουν μεγάλη αναλογία με αντίστοιχες που έγιναν στην Αγγλία, στα πλαίσια της ίδιας χρονικής περιόδου. Πιο συγκεκριμένα, σε μία μελέτη που έγινε στο Λονδίνο το 2000 σε δείγμα γονοκόκκων ενός εξαμήνου, ανιχνεύτηκαν QRNG στελέχη με μειωμένη ευαισθησία και QRNG με αντοχή στις νεότερες κινολόνες, σε ποσοστά 10% και 1,3%, αντίστοιχα. Και εκεί, όπως και στην Ελλάδα, τα μειωμένης ευαισθησίας QRNG, παρά το ότι διαπιστώθηκε ότι μπορούσαν εύκολα να εκριζωθούν με σιπροφλοξακίνη, εξελίχθηκαν σε ενδημικά, ενώ τα ανθεκτικά QRNG ήταν σπανιότερα και είχαν εξωγενή προέλευση (Ivens et al. 2000).

Σε παγκόσμια κλίμακα, η αντοχή στις νεότερες κινολόνες εμφανίστηκε σχετικά πρόσφατα, κατά τη δεκαετία του '90, και ήδη σήμερα η διασπορά QRNG στελεχών έχει δημιουργήσει σοβαρό πρόβλημα στην αντιμικροβιακή θεραπεία της γονόρροιας, που μάλιστα έχει οδηγήσει τους Διεθνείς Οργανισμούς που καθορίζουν τις οδηγίες αντιμικροβιακής θεραπείας, όπως η WHO και το CDC, να αποσύρουν για ορισμένες γεωγραφικές περιοχές τις κινολόνες από το φάσμα των φαρμάκων που συνιστώνται ως πρώτη εκλογή για την αντιγονορροϊκή θεραπεία (CDC 2004). Τα QRNG στελέχη έχουν κατακλύσει την Ασία, ενώ έχουν ευρέως διαδοθεί και στις περισσότερες χώρες του ανεπτυγμένου κόσμου (Tapsall 2001, Τζελέπη 2005). Η συχνότητά τους ποικίλλει, συχνά και μέσα στην ίδια χώρα, όπου μπορεί να ενδημούν μόνο σε μία περιοχή ή σε μία ομάδα του πληθυσμού, όπως π.χ. στη Χαβάη και στο Nottingham (CDC 2004, Goold & Bignell 2006). Αξιοσημείωτο είναι, ότι η παρουσία QRNG στελεχών δεν έχει αναφερθεί έως τώρα από την Λατινική Αμερική, ούτε από το μεγαλύτερο μέρος της Αφρικής. Αυτό θα μπορούσε να ερμηνευθεί ως αποτέλεσμα είτε μη-χορήγησης νεότερων κινολονών, λόγω του υψηλού τους κόστους, είτε αδυναμιών στα συστήματα καταγραφής της αντοχής στις λιγότερο ανεπτυγμένες χώρες αυτών των περιοχών.

Τα μόνα αντιβιοτικά που διατήρησαν σταθερά την αποτελεσματικότητά τους έναντι του συνόλου των στελεχών γονοκόκκου και σε όλη τη διάρκεια της περιόδου που μελετήθηκε ήταν η κεφοταξίμη και η σπεκτινομυκίνη. Το εύρημα αυτό βρίσκεται σε συμφωνία με ότι ισχύει έως τώρα, τόσο στην Ελλάδα όσο και σε όλο σχεδόν τον υπόλοιπο κόσμο. Πρόσφατες αναφορές για ανθεκτικά στη σπεκτινομυκίνη στελέχη δεν υπάρχουν. Ωστόσο, η εταιρεία που παρασκευάζει τη σπεκτινομυκίνη έχει αποφασίσει να διακόψει την διάθεσή της στην αγορά (CDC 2001), με αποτέλεσμα σήμερα να μην

είναι πλέον διαθέσιμη σε πολλές χώρες, συμπεριλαμβανομένης και της Ελλάδας. Για τις κεφαλοσπορίνες 3^{ης} γενιάς, οι κυριότερες αναφορές σχετικά με αντοχή προέρχονται από την Ιαπωνία και αφορούν τοπική επιδημική εξάπλωση στελεχών με μειωμένη ευαισθησία στην κεφτριαζόνη και στην κεφιξίμη (Akasaka et al. 2001, Ameyama 2002). Εξαιτίας των αναφορών αυτών έχει ενταθεί η επιτήρηση της ευαισθησίας του γονοκόκκου στις κεφαλοσπορίνες 3^{ης} γενιάς, οι οποίες προφανώς αποτελούν τη στιγμή αυτή την τελευταία λύση που έχει απομείνει για την ασφαλή αντιμετώπιση της γονόρροιας.

Συμπερασματικά, από την ανάλυση που έγινε στην παρούσα μελέτη προκύπτει ότι η επίπτωση της γονόρροιας παραμένει χαμηλή στην Ελλάδα, χωρίς να παρουσιάζει για την ώρα τάσεις ανάκαμψης. Ωστόσο, οι μεταβολές που παρατηρήθηκαν, τόσο στη σύνθεση του πληθυσμού που νόσησε όσο και στα χαρακτηριστικά των στελεχών γονοκόκκου που απομονώθηκαν κατά την περίοδο 1998–2002, υποδεικνύουν ότι η κατάσταση αυτή είναι αναμενόμενο να μεταβληθεί σύντομα, όπως ήδη έχει αρχίσει να συμβαίνει σε άλλες χώρες της Ευρώπης και, γενικότερα, του Δυτικού Κόσμου, όπου παρατηρούνται παρόμοιες μεταβολές. Η συνεχής αύξηση των κρουσμάτων στις ομάδες υψηλού κινδύνου αναπόφευκτα θα οδηγήσει σε συνολική αύξηση της γονόρροιας στο γενικό πληθυσμό, καθώς η επικίνδυνη σεξουαλική συμπεριφορά των ομάδων αυτών συντελεί στην αύξηση της μεταδοτικότητας, ενώ παράλληλα υποθάλπει και διασπείρει ανθεκτικά στελέχη που είναι δύσκολο να εκριζωθούν. Η αύξηση της ομοιογένειας του δείγματος γονοκόκκων αντανακλά τις συχνές επιδημικές εξάρσεις από τον ένα ή τον άλλο τύπο στελεχών, ενώ η μακροχρόνια παραμονή ορισμένων από αυτούς τους τύπους στην κοινότητα προδίδει τάση προς αυξημένη ενδημικότητα. Η εναλλαγή επικράτησης ανθεκτικών και ευαίσθητων στα αντιβιοτικά τύπων γονοκόκκου, από τη μία περίοδο στην άλλη, δείχνει ότι η ευαισθησία της *N. gonorrhoeae* στην Ελλάδα επηρεάζεται, αυτή τουλάχιστον τη χρονική στιγμή, περισσότερο από επιδημιολογικούς παράγοντες που σχετίζονται με τη συμπεριφορά του πληθυσμού, παρά από τα σχήματα της αντιμικροβιακής θεραπείας που εφαρμόζεται για την αντιμετώπιση της γονόρροιας. Παρόλ' αυτά, η τάση προς υψηλότερα επίπεδα και πιο πολύπλοκα σχήματα γονοκοκκικής αντοχής, που διαπιστώθηκε στο ελληνικό δείγμα γονοκόκκων, υπογραμμίζει και επαυξάνει την ανάγκη για επιτήρηση της αντοχής στα αντιβιοτικά και επιβάλλει μεγάλη προσοχή κατά την εφαρμογή εμπειρικής αντιγονορροϊκής θεραπείας.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της μελέτης ήταν η επιδημιολογική καταγραφή και ανάλυση της αντοχής στα αντιβιοτικά στα στελέχη *Neisseria gonorrhoeae* που απομονώθηκαν στην Ελλάδα κατά την πενταετία 1998–2002. Τα αποτελέσματα εκτιμήθηκαν σε σύγκριση με την αμέσως προηγούμενη ισοετή περίοδο (1993–1997) και σε συνάρτηση με τους λοιπούς μικροβιολογικούς και πληθυσμιακούς δείκτες της γονόρροιας, όπως και αυτοί διαμορφώθηκαν στην ελληνική κοινότητα σε συνέχεια προηγούμενων ετών.

Η ευαισθησία στα αντιβιοτικά και οι μικροβιολογικοί τύποι της *N. gonorrhoeae* διερευνήθηκαν σε συνεχές δείγμα 526 στελεχών, ενώ η εκτίμηση των πληθυσμιακών δεικτών προέκυψε από την αξιολόγηση 690 επιδημιολογικών ιστορικών. Όλο το υλικό προήλθε από τα περιστατικά γονόρροιας που διαγνώστηκαν στα εξωτερικά ιατρεία δύο ελληνικών νοσοκομείων αφροδισίων νόσων κατά την υπό μελέτη περίοδο.

Τα ευρήματα της μελέτης ως προς τους πληθυσμιακούς δείκτες της γονόρροιας έδειξαν διατήρηση της συνολικής επίπτωσης της νόσου στα χαμηλά επίπεδα στα οποία κυμαίνεται στην Ελλάδα από την αρχή της δεκαετίας του '90 (1–2‰), αλλά παράλληλα εντυπωσιακή αύξηση περιστατικών στις πληθυσμιακές ομάδες των ομο-/αμφιφυλοφίλων (MSM) και των οικονομικών μεταναστών.

Από τον έλεγχο της ευαισθησίας των στελεχών διαπιστώθηκε ότι, με εξαίρεση την κεφοταξίμη και τη σπεκτινομυκίνη που ήταν δραστικές έναντι του συνόλου του δείγματος γονοκόκκων, για όλα τα άλλα αντιβιοτικά που ελέγχθηκαν (φθοριωμένες κινολόνες, πενικιλίνη, τετρακυκλίνη, ερυθρομυκίνη, χλωραμφαινικόλη) σημειώθηκαν σημαντικά ποσοστά αντοχής και μέτριας ευαισθησίας. Σε σχέση με τα προηγούμενα χρόνια, η συνολική αντοχή του γονοκοκκικού πληθυσμού δεν μεταβλήθηκε σημαντικά, αλλά παρουσίασε ποιοτική διαφοροποίηση, με τάση επικράτησης στελεχών με μηχανισμούς που προσδίδουν υψηλά επίπεδα αντοχής (PPNG, TRNG, QRNG) και, αντίθετα, ελάττωση των στελεχών με μη-ειδική αντοχή που εκφράζεται σε χαμηλά επίπεδα. Ο χαρακτηρισμός των στελεχών έδειξε τάση προς αύξηση της οροτυπικής ομοιογένειας του γονοκοκκικού δείγματος και αποκάλυψε ότι οι μεταβολές στις τάσεις αντοχής οφείλονταν, κατά το μεγαλύτερο μέρος τους, σε επικράτηση ή αποδρομή ενδημικών στελεχικών τύπων με διαφορετικούς φαινότυπους ευαισθησίας. Στις περισσότερες περιπτώσεις, η επιδημική διασπορά κλωνικά συνδεδεμένων στελεχών

Περίληψη

συσχετιζόταν με πληθυσμιακές ομάδες υψηλού κινδύνου, συγκεκριμένα τις ομάδες των MSM ή των οικονομικών μεταναστών.

Τα αποτελέσματα της μελέτης συμφωνούν με ευρήματα που αναφέρονται και από άλλες χώρες για την ίδια χρονική περίοδο και, στο σύνολό τους, υποδεικνύουν συσπείρωση της γονόρροιας σε πυρήνες του πληθυσμού (core groups) που χαρακτηρίζονται από επικίνδυνη σεξουαλική συμπεριφορά και συντηρούν τη νόσο σε περιόδους χαμηλής επίπτωσης, όπως αυτή που διανύεται στην Ελλάδα και σε ολόκληρο το Δυτικό Κόσμο την τελευταία εικοσαετία.

SUMMARY

The aim of study was the surveillance of antimicrobial susceptibility trends in *Neisseria gonorrhoeae* strains isolated in Greece during a five-year period, from 1998 through 2002. Results were evaluated in comparison to those obtained by analysing the gonococcal sample of the previous five-year period (1993-1997) and in conjunction to other microbiological and epidemiological features of gonorrhoea.

Antibiotic susceptibilities and microbiological types of *N. gonorrhoeae* were investigated in a sample of 526 consecutive isolates, while demographic and epidemiological information resulted from the evaluation of 690 cases of gonorrhoea, through a standard questionnaire answered by the patients. The gonorrhoea cases and gonococcal isolates used in the study ensued from the outpatients' clinics of the two major Greek Venereal hospitals, located in Athens and Thessaloniki.

Findings of the study showed that the incidence of gonorrhoea remained unchanged during the study period, at levels comparable to those recorded in Greece since the 1990's (1 – 2 ‰). Whereas, remarkable increases in the rates of MSM and economical refugees among the patients were observed, indicating changes in the synthesis of the affected population.

By antimicrobial susceptibility testing, only cefotaxime and spectinomycin were found active against all *N. gonorrhoeae* isolated during the study period. For all other antibiotics tested (penicillin G, tetracycline, erythromycin, chloraphenicol and fluoroquinolones) high rates of resistance and intermediate susceptibility were recorded.

Comparatively to previous years, the total resistance of the Greek gonococcal sample has not been significantly altered. Nevertheless, a qualitative differentiation was ascertained, with increasing isolation frequencies of strains with mechanisms conferring higher levels of resistance (PPNG, TRNG, QRNG and combinations) and a decreasing trend of chromosomally encoded low-level resistance, which is usually attributed to non-specific mechanisms.

Typing of the isolates showed increased serovar homogeneity, while further characterization, using molecular typing methodology, revealed that the observed

Summary

changes in antimicrobial susceptibility of the total gonococcal sample were due, at least in part, to the spread or outgoing of clusters of clonally related strains with similar susceptibility profiles. In most cases, outbreak clones were associated with high-risk groups in the population, mainly the groups of MSM and economic refugees.

In conclusion, the findings of the study show that gonorrhoea infection in Greece follows the global trends of a low-incidence era. Accordingly, changes in the features of the affected population indicate a trend of a disease acquiring core-group characteristics, with increasing numbers of cases in subgroups of the population exhibiting high-risk behaviour.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Akasaka S., Muratani T., Yamada Y., et al. (2001). Emergence of cepheems and aztreonam high-resistant *Neisseria gonorrhoeae* that does not produce β -lactamase. *J Infect Chemother* 2001, 7: 49.
- American Academy of Pediatrics (1998). Committee on child abuse and neglect gonorrhea in prepubertal children. *Pediatrics* 101, 134-135.
- Ameyama S., Onodera S., Takahata M., et al. (2002). Mosaic-like structure of penicillin-binding protein 2 gene (*penA*) in clinical isolates of *Neisseria gonorrhoeae* with reduced susceptibility to cefixime. *Antimicrob Agents Chemother* 46, 3744.
- Anderson JE, Sparling PF, Cornelissen CN (1994). Gonococcal transferring-binding protein 2 facilitates but is not essential for transferring utilization. *J Bacteriol*, 176, 3162-3170.
- Apicella MA, Westerink, Morse SA, Schneider H, Rice PA, Griffiss J (1986). Bactericidal antibody response of normal human serum to the lipooligosaccharide of *Neisseria gonorrhoeae*. *J Infect Dis* 153, 520.
- Aral SO, Holmes KK (1990). Epidemiology of sexual behavior and sexually transmitted diseases. *In*: Holmes KK, March, PA, Sparling PF, et al. (eds), *Sexually Transmitted Diseases*. New York: Mc Graw-Hill, pp 19-36.
- Arreaza L, Salcedo C, Alcalá B, Berrón S, Martín E, Vázquez JA (2003). Antibiotic susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* in Spain: trends over the last two decades. *J Antimicrob Chemother* 51, 153-156.
- Ashford WA, Golash RG, Hemming VG (1976). Penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae*. *Lancet* 25(2), 657-8.
- Australian Gonococcal Surveillance Program (1988). Changing patterns of gonococcal infection in Australia, 1981-1987. *J Austr Med* 149, 609- 612.
- Australian Gonococcal Surveillance Program (1993). The incidence of gonorrhea and the antibiotic sensitivity of gonococci in Australia 1981-1991. *Genitourin Med* 69, 364-369.

Βιβλιογραφία

- Ayala P, Vasquez B, Wetzler L, So M (2002). *Neisseria gonorrhoeae* porin P1.B induces endosome exocytosis and a redistribution of Lamp1 to the plasma membrane. *Infect Immun* 70, 5965-5971.
- Bardin T (2003). Gonococcal arthritis. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology* 17, 201-208.
- Barnes R & Homes KK (1984). Epidemiology of gonorrhea: current perspectives. *Epidemiologic Reviews* 6, 1-30.
- Belland RJ, Morrison SG, Ison C, Huang WM (1994). *Neisseria gonorrhoeae* acquires mutations in analogous regions of *gyrA* and *parC* in fluoroquinolone-resistant isolates. *Mol Microbiol* 14, 371-380.
- Berglund T, Fredlund H, Giesecke J (2001). Epidemiology of the reemergence of gonorrhea in Sweden. *Sex Transm Dis* 28, 111-114.
- Benedek TG (2005). Gonorrhea and the Beginnings of Clinical Research Ethics. *Perspectives in Biology and Medicine* 48, 54-57.
- Biswas GD and Sparling PF (1995). Characterisation of IbpA, the structural gene for a lactoferrin receptor in *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect Immun* 63, 2958-2967.
- Black JR, Black WJ, Cannon JG (1985). Neisserial antigen H8 is immunogenic in patients with disseminated gonococcal and meningococcal infections. *J Infect Dis* 151, 650-665
- Blake MS & Gotschlich EC (1982). Purification and partial characterization of the major outer membrane protein of *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect Immun* 36, 277-283.
- Boily MC, Brunham RC (1993). The impact of HIV and other STDs on human populations. Are predictions possible? *Infect Dis Clin North Am* 7, 771-792.
- Bonin P, Tanino TT, Handsfield HH (1984). Isolation of *Neisseria gonorrhoeae* on selective and nonselective media in a sexually transmitted clinic. *J Clin Microb*, 19, 218-220.
- Brannigan JA, Tirodimos IA, Zhang Q-Y, Dowson CG, Spratt BG (1990). Insertion of an extra amino acid is the main cause of the low affinity of

Βιβλιογραφία

- penicillin-binding protein 2 in penicillin-resistant strains of *Neisseria gonorrhoeae*. *Molec Microbiol* 4, 913-919.
- Brooks GF & Lammel CJ (1989). Humoral immune response to gonococcal infections. *Clin Microbiol Rev* 2 [Suppl], S5-S10.
 - Brunham RC, Plummer F, Slaney L, Rand F, DeWitt W (1985). Correlation of auxotype and protein I type with expression of disease due to *Neisseria gonorrhoeae*. *J Infect Dis* 152, 339-343.
 - Buchanan TM (1975). Antigenic heterogeneity of gonococcal pilli. *J.Exp.Med.* 151:1470.
 - Buchanan TM & Hildebrandt FJ (1981). Antigen-specific serotyping of *Neisseria gonorrhoeae*: characterization based upon principal outer membrane protein. *Infect Immun* 32, 985-994.
 - Bygdeman S, Danielson D, Sandstrom E (1983). Gonococcal W serogroups in Scandinavia: a study with polyclonal and monoclonal antibodies. *Acta Pathol Immunol Scand* 91, 293-305.
 - Bygdeman SM, Mårdh PA, Sandström EG (1984). Susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* to rifampicin and thiamphenicol: correlation with protein I antigenic determinants. *Sex Transm Dis* 11 [4 Suppl], 366-370.
 - Bygdeman SM, Gillenius E, Sandstrom EG (1985). Comparison of two different tests of monoclonal antibodies for the serological classification of *Neisseria gonorrhoeae*. *In*: Schoolink GK, Brooks GF, Morse AS (eds). The pathogenic *Neisseria gonorrhoeae*. Washington, DC, American Society for Microbiology, pp. 31-6.
 - Bygdeman SM, Ruden A-K, Jonson A, Lidbrink P, Olfsson M-B, Backman M (1993). Antibiotic susceptibility, serovars and auxotypes of gonococcal isolates in Stockholm. Relation to geographical origin of infection. *Intern J of STD and AIDS* 4, 33-40.
 - Cannon JG, Black WJ, Nachamkin I, Stewart PW (1984). Monoclonal antibody that recognizes an outer membrane antigen common to the pathogenic *Neisseria* species but not to most nonpathogenic *Neisseria* species. *Infect Immun* 43, 994-999.

Βιβλιογραφία

- Cannon JG & Sparling PF (1984). The genetics of the gonococcus. *Ann Rev Microbiol* 38, 111-133.
- Carbonetti NH, Simnad VI, Seifert HS, So M, Sparling PF (1988). Genetics of protein I of *Neisseria gonorrhoeae*: construction of hybrid porins. *Proc Natl Acad Sci USA* 85, 6841-6845.
- Carne CA, Weller IV, Johnson AM, Loveday C, Pearce F, Hawkins A, Smith A, Williams P, Tedder RS, Adler MW (1987): Prevalence of antibodies to human immunodeficiency virus, gonorrhoea rates, and changed sexual behaviour in homosexual men in London. *Lancet* 1, 656-658.
- Catlin BW (1973). Nutritional profiles of *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, and *Neisseria lactamica* in chemically defined media and the use of growth requirements for gonococcal typing. *J Infect Dis* 128, 178-194.
- Catlin BW & Pace PJ (1977). Auxotypes and penicillin susceptibilities of *Neisseria gonorrhoeae* isolated from patients with gonorrhea involving two or more sites. *Antimicrob Ag Chemother* 12, 147-156.
- CDC (1985). Tetracycline-resistant *Neisseria gonorrhoeae* – Georgia, Pennsylvania, New Hampshire. *MMWR* 34, 563-569.
- CDC (1998). Guidelines for Treatment of Sexually Transmitted Diseases. *MMWR* 47, 1-118.
- CDC (2000). Gonorrhea-United States. *MMWR* 49: 538-542.
- CDC (2001). Notice to readers: Shortage of spectinomycin. *MMWR* 50, 470.
- CDC (2002a). Guidelines for Treatment of Sexually Transmitted Diseases. 51, 1-8.
- CDC (2002b). Screening tests to detect *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* Infections. *MMWR* 51, 1-39
- CDC (2004). Increases in fluoroquinolone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* among men having sex with men – United States, 2003 and revised recommendations for gonorrhea treatment. *MMWR* 63, 335.
- CDC (2007). Guidelines for Treatment of Sexually Transmitted Diseases. 56, 332-336.
- Chen CJ, Sparling PF, Lewis LA, Dyer DW, Elkins C (1996). Identification and purification of a hemoglobin-binding outer membrane protein from

Neisseria gonorrhoeae. *Infect Immun* 64, 5008-5014

- Chu G, Vollthra D & Davis RV (1986). Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric fields. *Science* 234, 1582-1585.
- Ciesielski CA (2003). Sexually Transmitted Diseases in Men who have sex with men: an epidemiologic review. *Curr Infect Dis Rep* 5, 145-152.
- Clark VL, Campell LA, Palermo DA, Evans TM, Klimpel KW (1987). Induction and repression of outer membrane proteins by anaerobic growth of *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect Immunol* 55: 1359-1364.
- Cohen MS & Cannon JG (1999). Human experimentation with *Neisseria gonorrhoeae*: progress and goals. *J Infect Dis* 179[Suppl 2], S375-S379.
- Cooke SJ, de la Paz H, La Poh C, Ison CA, Heckels JE (1997). Variation within serovars of *Neisseria gonorrhoeae* detected by structural analysis of outer-membrane protein PIB and by pulsed-field gel electrophoresis *Microbiology* 143, 1415-1422.
- Dan M (2004a). The use of fluoroquinolones in gonorrhea: the increasing problem of resistance. *Expert Opin Pharmacother* 5: 829-854.
- Dan M (2004b). The return of gonorrhea. *Isr Med Assoc J* 6, 164-166.
- Danielson D, Sandstrom E, Bygdeman S, Backman M & Gnarpe H (1985). W-serogroup (protein I) and serovar patterns of gonococci isolated during two different periods in urban and rural districts of Sweden. *In*: Schoolnik G K, Brooks GF, Falkow S, Frasch E, Knapp JS, McCutchan and Morse SA (ed). The pathogenic *neisseriae*. *American Society for Microbiology*, Washington DC. pp 71-77.
- Dasi M, Nogueira JM, Camarena JJ, Gil C, Garcia-Verdú R, Barberá JL, Barberá J (1992). Use of genomic fingerprinting in the characterization of *Neisseria gonorrhoeae* isolated in Valencia, Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 11, 804-809.
- Degushi T, Yasuda M, Asano M, Tada K, Iwata H, Komeda H, Ezaki T, Saito I, Kawada Y (1995). DNA gyrase mutations in quinolone-resistant clinical isolates of *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrob Agents Chemother* 39, 561-563.
- Degushi T, Yasuda M, Nakano M, Ozeki S, Ezaki T, Saito I, Kawada Y (1996). Quinolone-resistant *Neisseria gonorrhoeae*: correlation of alterations in the GyrA subunit of DNA gyrase and the ParC subunit of topoisomerase IV

- with antimicrobial susceptibility profiles. *Antimicrob Agents Chemother* 40, 1020-1023.
- Degushi T, Saito I, Tanaka M, Sato K, Degushi K, Yasuda M, Nakano M, Nishino Y, Kanematsu E, Ozeki S & Kawada Y (1997). Fluoroquinolone treatment failure in gonorrhoea. Emergence of a *Neisseria gonorrhoeae* strain with enhanced resistance to fluoroquinolones. *Sex Transm Dis* 24, 247-250.
 - Degushi T, Yasuda M, Maeda SI, Saito I, Kawada Y (1998). Serotyping of quinolone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* isolates with alterations in GyrA and ParC. *J Antimicrob Chemother* 41, 418-420.
 - Dillon JAR, Yeung KH (1989). β -Lactamase plasmids and chromosomally mediated antibiotic resistance in pathogenic *Neisseria* species. *Clin Microb Rev (Suppl.)*, S125-S133
 - Easmon CS, Ison CA (1987). *Neisseria gonorrhoeae*: A versatile pathogen. *J Clin Path* 40, 1088-1097.
 - Easmon CSF (1990). The changing pattern of antibiotic resistance of *Neisseria gonorrhoeae*. *Genitourin Med* 66, 55-56.
 - Edwards JL & Apicella MA (2004). The molecular mechanisms used by *Neisseria gonorrhoeae* to initiate infection differ between men and women. *Clin. Microbiol. Rev*, 17, 965-981.
 - Evangelista AT, Beilstein HR & Abramson (1993). Laboratory diagnosis of gonorrhoea, p. 1. In Evangelista AT, Beilstein HR & Abramson C (ed.), Cumulative Techniques and procedures in clinical microbiology (CUMITECH 4A), *American Society of Microbiology, Washington D.C.*
 - Falk ES, Bjorvatn B, Danielsson D, Kristiansen BE, Melby K, Sørensen B (1984). Restriction endonuclease fingerprinting of chromosomal DNA of *Neisseria gonorrhoeae*. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand [B]* 92, 271-278.
 - Falk ES, Danielsson D, Bjorvatn B, Melby K, Sørensen B, Kristiansen BE (1985). Genomic fingerprinting in the epidemiology of gonorrhoea. *Acta Derm Venereol.* 65(3):235-9.

Βιβλιογραφία

- Falk ES, Bygdeman SM, Birkeland NK, Bjorvatn B, Kallings I, Sandström EG (1988). Genotypes and phenotypes of beta lactamase producing strains of *Neisseria gonorrhoeae* from African countries. *Genitourin Med.* Aug;64(4):226-32.
- Falk ES, Vandbakk O (1993). Declining rates in some sexually transmitted diseases in Norway between 1975 and 1991, with special reference to a Lapp population. *Acta Derm Venereol Suppl (Stckh)* 182, 15-20.
- Fenton KA, Rogers PA, Simms I, Maguire H, Catchpole M (2000). Increasing gonorrhoea reports – not only in London. *The Lancet.* 355, 1907.
- Fischer SH & Rest RF (1988) Gonococci possessing only certain P.II outer membrane proteins interact with humans neutrophils. *Infect Immun* 56,1574-1579
- Forest KT, Bernstein SL, Getzoff ED, So M, Tribbick G, Geysen HM, Deal CD, Tainer JA (1996). Assembly and antigenicity of the *Neisseria gonorrhoeae* pilus mapped with antibodies. *Infect. Immun* 64:644-652.
- Fox KK, Whittington WL, Levine WC, Moran JS, Zaidi AA, Nakashima AK (1998). Gonorrhea in the United States, 1981 – 1996. Demographic and geographic trends. *Sex Transm Dis* 25, 386-393.
- Fox KK, del Rio C, Holmes KK, Hook III EW, Judson FN, Knapp JS, et al. (2001). Gonorrhea in the HIV era: a reversal in trends among men who have sex with men. *American Journal of Public Health* 91, 959-964.
- Galimand M., Gerbaud G., and Courvalin P (2000). Spectinomycin Resistance in *Neisseria spp.* Due to Mutations in 16S rRNA. *Antimicrob. Agents and Chemoth* 44, 1365-66.
- Gascoyne DM, Heritage J, Hawkey PM, Turner A, van Klingeren B (1991). Molecular evolution of tetracycline-resistance plasmids carrying Tet M found in *Neisseria gonorrhoeae* from different countries. *J Antimicrob Chemother.* 28, 173-83
- Gascoyne –Binzi DM, Hawkey PM, Heritage J. The distribution of variants of the Tet M determinant in tetracycline resistant *Neisseria gonorrhoeae*. *J Antimicrob Chemother* 1994, 33, 1011-6.

Βιβλιογραφία

- Geisler QM, Whittington WLH, Suchland RJ, Stamm WE (2002). Epidemiology of anorectal chlamydial and gonococcal infections among men having sex with men in Seattle, utilizing serovar and auxotype strain typing. *Sex Transm Dis* 29, 189-195.
- Greco V, Ng LK, Catana R, Li H, Dillon JA (2003). Molecular epidemiology of *Neisseria gonorrhoeae* isolates with plasmid-mediated tetracycline resistance in Canada: temporal and geographical trends (1986-1997). *Microb Drug Resist* 9, 353-360.
- Green MS, Anis E, Gandacu D, Grott I (2003). The fall and rise of gonorrhoea in Israel: an international phenomenon? *Sex Transm Infect* 79, 116-118.
- Gotschlich EC, Seiff ME, Blake MS, Koomey M (1987): Porin protein of *Neisseria gonorrhoeae*: cloning and gene structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 184, 8135-9.
- Goulet V, Sednaoui P, Laporte A, Desenclos JC. The number of gonococcal infections identified by the RENAGO network is increasing. *Eurosurveillance* 2000, 5, 2-5.
- Griffiss JM, O'Brien JP, Yamasaki R, Williams GD, Rice PA & Schneider H (1987): Physical heterogeneity of neisserial lipooligosaccharides reflects oligosaccharides that differ in apparent molecular weight, chemical composition and antigenic expression. *Infect Immunol* 55:1792-1800.
- Gutman LT (1999): Gonococcal diseases in infants and children. In Holmes KK, Mardh P, Sparling PF, Lemon SM, Stamm WE, Piot P & Wasserheit JN (ed.) *Sexually Transmitted Diseases*, (3rd ed.), New York, Mc Graw-Hill Book Company, 1145-1153.
- Harnett N, Brown S, Terro R, Krishnan C, Pauzé M., Yeung K-H (1997). High-level tetracycline-resistant *Neisseria gonorrhoeae* in Ontario, Canada – Investigation of a cluster of isolates, showing chromosomally mediated resistance to penicillin combined with plasmid-mediated resistance to tetracycline. *Journal of Infectious Diseases* 176, 1269-76.
- Hendry AT & Stewart IO (1979). Auxanographic grouping and typing of *Neisseria gonorrhoeae*. *Can J Microbiol* 25, 512-521.

Βιβλιογραφία

- Handsfield HH (1997). Sex science and society. A look at sexually transmitted diseases. *Postgraduate Medicine* 101 (www.postgradmed.com/issues/1997/0597/std.htm), Vol 101.
- Hitchcock PJ (1984). Analyses of gonococcal lipopolysaccharide in whole-cell lysates by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis: stable association of lipopolysaccharide with the major outer membrane protein (protein I) of *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect Immun* 46, 202-212.
- Hook EW & Handsfield HH (1999). Gonococcal infections in the adult. *In*: Holmes KK, Mardh P, Sparling PF, Lemon SM, Stamm WE, Piot P & Wasserheit JN (ed) *Sex Transm Dis* (3rd ed.), Mc Graw-Hill Book Company New York, p 451.
- Hook EW & Holmes KK (1985). Gonococcal Infections. *Ann Intern Med* 102, 229-243.
- Hooper DC (1998). Bacterial topoisomerases, anti-topoisomerases, and anti-topoisomerase resistance. *Clin Infect Dis* 27 [Suppl.], S54-S63.
- Hooykaas C, van der Velde FW, van der Linden MMD, van Doornum GJJ, Coutinho RA (1991). The importance of ethnicity as a risk factor for STDs and sexual behaviour among heterosexuals. *Genitourin Med* 67, 378-383.
- Ison CA, McKean K, Gedney J, Munday PE, Coghill D, Smith R, Harris JRW, Easmon CSF (1985). Evaluation of a direct immunofluorescence test for diagnosing gonorrhoea. *J Clin Pathol.* 38:1142-1145.
- Ison CA (1996). Antimicrobial agents and Gonorrhoea: therapeutic choice, resistance and susceptibility testing. *Genitourin Med* 72, 253-257.
- Ison CA (1998). Genotyping of *Neisseria gonorrhoeae*. *Current Opinion in Infectious Diseases.* 11, 43-46.
- Ivens D, Martin I, Ison C (2000). *Neisseria gonorrhoeae* in a London sexually transmitted infection clinic not fully sensitive to quinolones: are isolates imported and how effective is ciprofloxacin as a first-line treatment? *Int J STD AIDS*, 11, 774-776.
- Iverson CJ, Wang SA, Lee MV, Ohye RG, Trees DL, Knapp JS, et al. (2004).

- Fluoroquinolone resistance among *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Hawaii, 1990-2000: role of foreign importation and increasing epidemic spread. *Sex. Transm. Dis.* 31: 702.
- Judd RC (1989). Protein I: structure, function, and genetics. *Clin Microbiol Rev* 2[Suppl.1], S41-S488.
 - Kaufmann ME & Pitt TL (1994). Pulsed-Field Gel Electrophoresis of bacterial DNA. *In*: H. Chart (ed), *Methods in Practical Laboratory Bacteriology*. CRC Press, London 1994, pp 83-92.
 - Kawula TH, Spinola SM, Klapper DG, Cannon JG (1987). Localization of a conserved epitope and an azurin-like domain in the H.8 protein of pathogenic *Neisseria*. *Mol Microbiol* 1, 179-185.
 - Kellogg DS, Peacock WR Jr, Deacon WE, Brown L, Pirkle DI (1963). *Neisseria gonorrhoeae* I. Virulencegenetically linked to clonal variation *J Bacteriol* 85, 1274-1279.
 - Knapp JS, Holmes KK (1975). Disseminated gonococcal infections caused by *Neisseria gonorrhoeae* with unique nutritional requirements. *J Infect Dis.* 132, 204-8.
 - Knapp JS, Thornsberry C, Schoolnik GA, Wiesner PJ, Homes KK (1978). Phenotypic and epidemiologic correlates of auxotype in *Neisseria gonorrhoeae*. *J Infect Dis* 138, 160-165.
 - Knapp JS, Tam MR, Sandstrom EG (1984). Serological classification of *Neisseria gonorrhoeae* with use of monoclonal antibodies to gonococcal membrane protein I. *J.Infect. Dis.*150:44-8.
 - Knapp JS, Bygdeman S, Holmes KK (1985). Nomenclature for the serological classification of *Neisseria gonorrhoeae*. *IN*: Schoolink G, Brooks GF, Morse SA.-The pathogenic *Neisseria*. Washington DC *American Society for Microbiology*, 4.
 - Knapp J (1988). Historical Perspectives and Indetification of *Neisseria* and Related species. *Clin.Microbiol.Rev.* 415-431.
 - Kyriakis KP,Tzelepi E, Flemetakis A, Avgerinou H, Tzouvelekis LS, Frangouli E (1999). Epidemiologic Aspects of Male Gonococcal Infection in Greece.*Sex Transm Disease*, 78, 43-48.

- Levens E (2003). Disseminated gonococcal infection. *Inf Dis Up* 10, 217-219
- Liljeros F, Edling C, Nunes Amaral LA (2003). Sexual networks: implications for the transmission of sexually transmitted infections. *Microbes and Infection* 5, 189-196.
- LiMaye AR (2003). Disseminated gonococcal infection in women. *Inf Dis update*. 10, 186-190
- Lin L, Ayala P, Larson J, Mulks M, Fukuda M, Carlsson SR, Enns C, So M (1997). The *Neisseria* Type 2 Iga₁ protease cleaves LAMP1 and promotes survival of bacteria within epithelial cells. *Mol Microbiol* 24, 1083-1094.
- Lind I (1979): The laboratory diagnosis of gonorrhoea, *JCS*. 519, 3-14.
- Lowndes CM, Fenton KA, ESSTI Network (2004). Surveillance systems for STIs in the European Union: facing a changing epidemiology. *Sex Transm Infect* 80, 264-271.
- Maness MJ, Foster GC, Sparling PF (1974). Ribosomal resistance to streptomycin and spectinomycin in *Neisseria gonorrhoeae*. *J Bacteriol* 120, 1293-1299.
- Mayer L, Goulet V, Massari V, Lepoutre-Toulemon A (1994). Surveillance of sexually transmitted diseases in France: recent trends and incidence. *Genitourin Med* 70, 15-21.
- Mavroidi A, Tzouvelekis LS, Tassios PT, Fletmetakis A, Daniilidou M, Tzelepi E (2000). Characterization of *Neisseria gonorrhoeae* strains with decreased susceptibility to fluorokinolones isolated in Greece during 1996-1999. *J Clin Microbiol*. 38, 3489-91.
- Mavroidi A, Tzouvelekis LS, Kyriakis KP, Avgerinou H, Daniilidou M, Tzelepi E (2001). Multidrug-resistant strains of *Neisseria gonorrhoeae* in Greece. *Antimicrob Agents Chemother* 45, 2651-2654.
- Mavrommati L, Tzelepi E, Sima A, Tzanakki G, Kokla A, Fletmetakis A (1988). Antibiotic resistance, plasmid content and auxotypes of *Neisseria gonorrhoeae* in Greece. *J Antimicrob Chemother* 21, 571-579.
- Maxwell A (1999). DNA gyrase as a drug target. *Biochem Soc Trans* 27, 48-53.

Βιβλιογραφία

- McMillan A, McNeillage G, Gilmour HM, Lee FD (1983). Histology of rectal gonorrhoea in men, with a note of anorectal infection with *Neisseria meningitidis*. *J Clin Pathol* 36, 511-514.
- Mennen FC (1976). Instrument for the detection of *Neisseria gonorrhoeae* and the like - US Patent (3, 954, 564), 1-5.
- Moodley P, Moodley D, Willem Sturm A (2004). Ciprofloxacin resistant *Neisseria gonorrhoeae* in South Africa. *Int J Antimicrob Agents*; 24, 192-193.
- Morello JA, Lerner SA & Bohnhoff M (1976). Characteristics of atypical *Neisseria gonorrhoeae* from disseminated and localized infections. *Infect Immun* 13:1510-16.
- Morello JA, Janda WM & Bohnhoff M. *Neisseria* and *Branhamella* (1985). *In*: Lennette EH, Balows A, Hausler WJ, Shadonmy HJ (eds), *Manual of Clinical Microbiology*, 4th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C. pp 176-192.
- Morse SA, Jonson SR, Biddle JW, Roberts MC (1986). High-level tetracycline resistance in *Neisseria gonorrhoeae* is a result of acquisition of streptococcal Tet M determinant. *Antimicrob Agents Chemother.* 30, 664-670.
- Mulks MH & Knapp JS. (1987) Immunoglobulin A, protease types of *Neisseria gonorrhoeae* and their relationship to auxotype and serovar. *Infect Immunol* 55:931-936.
- Murray MG & Thompson WF (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucl. Acids Res.* 8:4321-4325
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (1997): Performance standards for antimicrobial susceptibility testing – sixth edition. Approved standard. NCCLS document M2 -A6, [suppl] M100S7, 17, *National Committee for Clinical Laboratory Standards*, Wayne, Pa.
- Nissinen A, Jarvinen H, Limatainen O, Jahkola M, Huovinen P, and the Finish Study Group for Antimicrobial Resistance (1997). Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in Finland, 1976 to 1995. *Sex Transm Dis* 24, 576-581.
- O'Rourke M & Stevens E (1993). Genetic structure of *Neisseria gonorrhoeae* populations: a non-clonal population. *J Gen Microbiol* 11, 769.

Βιβλιογραφία

- Phillips I (1976). Beta-lactamase-producing, penicillin-resistant gonococcus. *Lancet*, 2, 656-657.
- Poh CL, Khng HP, Lim CK & Loh GK (1992a). Molecular typing of *Neisseria gonorrhoeae* by restriction fragment length polymorphisms. *Genitourin. Med.* 68:106-110.
- Poh CL, Ocampo JC & Loh GK (1992b). Genetic relationships among *Neisseria gonorrhoeae* serovars analysed by multilocus enzyme electrophoresis. *Epidemiol. Infect.* 108: 31-38.
- Pohlner J, Halter R, Beyreutherk & Meyer TF (1987). Gene structure and extracellular secretion of *Neisseria gonorrhoeae* IgA protease. *Nature* 325, 458-62.
- Portnoy DA, Moseley SL, Falkow S (1981). Characterisation of Plasmids Associated Determinants of *Yersinia enterocolitica* Pathogenesis. *Infect Immun* 31, 775-782.
- Potterat JJ, Rothenberg RB, Woodhouse DE (1985). Gonorrhea as a social disease. *Sex Transm Dis* 12, 25-32.
- Prins M, Bindels PJE, Coutinho RA, Henquet CJM, van Doornum GJJ, van den Hoek JAR (1994). *Genitourin Med* 70, 247-252.
- Riou JY, Guibourdenche M, Courvalin P (1981). Antibiotic susceptibility testing of *Neisseria gonorrhoeae* by disk-agar diffusion. *Ann Microbiol*, 132B, 23-39.
- Riou JY, Martin PM, Guibourdenche M (1984). Epidemiological surveillance of beta-lactamase producing gonococci. I. Auxotyping of 83 strains isolated in France *Presse Med* 13, 1133-1136.
- Riou JY, Lind I, Guibourdenche M (1985). Antibiotic susceptibility of 83 penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* strains isolated in France *Antimicrob Chemother*, [Suppl A], 209-12.
- Roberts MC, Wagenvoort JHT, van Klinger B, Knapp JS (1988). Tet M and β -lactamase-containing *Neisseria gonorrhoeae* (tetracycline resistant and penicillinase producing) in the Netherlands. *Antimicrob Agents Chemother.* 32, 158.

Βιβλιογραφία

- Roberts MC (1989). Plasmids of *Neisseria gonorrhoeae* and other *Neisseria* species. *Clin Microbiol Rev* 2 [Suppl], S18-S23.
- Roberts M.C., Chung W.O., Roe D., Xia M., Marquez C., Borthagaray G., Whittington W.L., and Holmes K.K (1999). Erythromycin- Resistant *Neisseria gonorrhoeae* and Oral Commensal *Neisseria spp* Carry Known rRNA Methylase Genes. *Antimicrob. Agents and Chem.* June: 1367-1372.
- Rothenberg RB (1983): The geografhy of gonorrhea: Empirical demonstration of core group transmission *Am J Epidemiol* 117:668
- Sandstrom EG, Danielson D (1980). Serology of *Neisseria gonorrhoeae* classification by coaglutination. *Acta Pathol Microbiol Scand* 88:27-38.
- Sandstrom EG, Chen KCB, Buchanan TM (1982a). Serology of *Neisseria gonorrhoeae*: coaglutination serogroups WI and WII/W III correspond to different outer membrane protein I. *Infect. Immun.* 38:462-70.
- Sandstrom EG, Knapp JS, Buchanan TM (1982b). Serology of *Neisseria gonorrhoeae*: W-antigen serogrouping by coaglutination and protein I antigens. *Infect. Immun.* 35:229-36.
- Sandstrom EG, Lindel P, Harfast B, Blomberg F, Ryden AC, Bygdeman S (1985). Evaluation of a new set of *Neisseria gonorrhoeae* serogroup W-specific monoclonal antibodies for serovar determination. *In*: Schoolink G, Brooks GF, Morse SA (eds). The pathogenic *neisseriae* Washington, DC. *American Society for Microbiology*, pp 26-30.
- Sanger F, Nilken S & Coulson AR (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Na. Sc. USA* 74, 5463.
- Sarafian SK & Knapp JS (1989). Molecular epidemiology of gonorrhea. *Clin Microbiol Rev* 2 [Suppl], S49-S55.
- de Schrijver K, Fenton K, Kiehl W, Salmaso S, Suligoj B, Aavitsland P et al. (2000). European trends in gonorrhoea. *Eurosurveillance Weekly*, 4 (www.eurosurveillance.org/ew/2000/000413) .
- Scwebke J.R., Whittington W., Rice R.J., et al. (1995). Trends on susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* to ceftriaxone from 1985 through 1991. *Antimicrob Agents Chemother* 39, 917.

Βιβλιογραφία

- Sima A & Mavrommati L (1986). Plasmid profile of penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* in Greece. *Eur J Epidemiol* 2, 191-196.
- Smith H, Parsons NJ & Cole JA (1995). Sialylation of *Neisseria* lipopolysaccharide: a major influence on pathogenicity. *Microbiol Pathogen* 19, 365-377.
- Sparling PF et al (1967). Colonial morphology of *Neisseria gonorrhoeae* isolated from males and females. *J Bacteriol* 93, 513.
- Sparling PF (1999). Biology of *Neisseria gonorrhoeae*. In Holmes KK, Sparling PF, Mardh PA, Lenn SM, Stamm WE, Piot P, Wasserheit JN. *Sex. Transm. Dis.* 3rd ed, McGraw-Hill New York, 433-450.
- Stathi M, Fliemetakis A, Miriagou V, Avgerinou H, Kyriakis KP, Maniatis AN, Tzelepi E (2006). Antimicrobial susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* in Greece: data for the years 1994-2004. *J Antimicrob Chemother* 57, 775-9.
- Stolte IG, Dukers NHTM, de Wit JBF, Fennema H, Coutinho RA (2002). A summary report from Amsterdam: increase in sexually transmitted diseases and risky sexual behaviour among homosexual men in relation to the introduction of new anti-HIV drugs. *Eurosurveillance* 7, 19-22.
- Struelens MJ & the Members of the European study Group on Epidemiological Markers (ESGEM), of the European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) (1996). Consensus guidelines for appropriate use and evaluation of microbial epidemiologic typing systems. *Clin Microbiol Infect* 2, 2.
- Sugasawara RJ, Cannon JG, Black WJ, Nachamkin I, Sweet RL & Brooks GF (1983): Inhibition of *Neisseria gonorrhoeae* attachment to HeLa cells with monoclonal antibody directed against a protein II. *Infect Immunol* 42, 980-985.
- Swanson J (1978). Studies on gonococcus infection: XIV. Cell Wall protein differences among color/opacity colony variants of *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect Immunol* 21, 292.
- Swanson J, Mayer LW, Tam MR (1982). Antigenicity of *Neisseria gonorrhoeae* outer membrane protein(s) III detected by immunoprecipitation & Western blot transfer with a monoclonal antibody. *Infect Immun* 38, 668-72.

Βιβλιογραφία

- Swanson J et al. (1987). Gene conversion variations generate structurally distinct pilin polypeptides in *Neisseria gonorrhoeae*. *J Exp Med* 165, 1016.
- Tam MR, Buchanan TM, Sandstrom EG, Holmes KK, Knapp JS (1982). Serological classification of *Neisseria gonorrhoeae* with monoclonal antibodies. *Infect Immun* 36, 1042-1053.
- Tanaka M, Takahashi K, Saika T, Kobayashi I, Ueno T & Kumuzawa J (1998 a). Development of fluoroquinolone resistance and mutations involving GyrA and ParC proteins among *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Japan. *J Urol* 159, 2215-2219.
- Tanaka M, Takahashi K, Nagahuzi T, Kobayashi I & Kumuzawa J (1998b). Analysis of quinolone resistance in *Neisseria gonorrhoeae* isolates in vitro. *Sex Transm Infect* 74, 59-62.
- Tanaka M, Nakayama H, Haraoka M, Saika T, Kobayashi I & Naito S (2000). Antimicrobial resistance of *Neisseria gonorrhoeae* and high prevalence of ciprofloxacin-resistant isolates in Japan, 1993 to 1998. *J Clin Microbiol* 38, 521-525.
- Tapsall J (2001). Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. WHO/CDC/CRS/2001.3. *World Health Organization*.
- Tapsall J (2002). Current concepts in the management of gonorrhoea. *Expert Opin Pharmacother*. 3, 147-157.
- Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 33, 2233-9.
- Trees DL, Sandul AL, Whittington WL & Knapp JS (1998). Identification of novel mutation patterns in the parC gene of ciprofloxacin-resistant isolates of *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 42, 2103-2105.
- Treurniet HF, Davidse W (1993). Sexually Transmitted Diseases reported by STD services in the Netherlands 1984-1990. *Genitourin Med* 69, 434-438.
- Turner A, Jephcott AE, Gough KR (1991). Laboratory detection of ciprofloxacin resistant *Neisseria gonorrhoeae*. *J Clin Pathol* 44, 169-170.

Βιβλιογραφία

- Tzelepi E, Fragouli E, Athanassopoulou V, Tzanakaki G, Tseliou P (1991). *Neisseria gonorrhoeae* in Athens, Greece. Epidemiologic classification and antimicrobial susceptibility patterns of strains isolated between 1986 and 1989. *Sex Transm Dis* 18, 238-244.
- Tzelepi E, Avgerinou H, Kyriakis KP, Tzouvelekis LS, Flemetakis A, Kalogeropoulou A, Frangouli E (1997). Antimicrobial Susceptibility and types of *Neisseria gonorrhoeae* in Greece. Data for the period 1990 to 1993. *Sex Transm Dis* 24, 378-85.
- Τζελέπη Ε (2005). Αντοχή στα αντιβιοτικά στη *Neisseria gonorrhoeae*. *Κλινικά Φροντιστήρια* 17 (3), σελ. 91–115. Εκδόσεις Ιατρικής Εταιρείας Αθηνών, Αθήνα 2005.
- Van Doornum GJJ, Schouls ML, Pijl A, Cairo I, Buimer M & Bruisten S (2001). Comparison between the LCx Probe system and the COMBAS AMPLICOR System for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* infections in patients attending a clinic for treatment of sexually transmitted diseases in Amsterdam, The Netherlands. *J Clin Microb* 829-835.
- van Duynhoven YTHP (1999). The Epidemiology of *Neisseria gonorrhoeae* in Europe. *Microbes and Infection*. 455-464.
- van Dyck E, Smet H, vanDamme L & Laga M (2001). Evaluation of the Roche *Neisseria gonorrhoeae* 16S rRNA PCR for confirmation of AMPLICOR PCR-Positive samples and comparison of its diagnostic performance according to storage conditions and preparation of endocervical specimens. *J Clin Microb* 39, 2280-2282.
- van der Heyden JHA, Catchpole MA, Paget WJ, Stroobant A, and the European Study Group (2000). Trends in gonorrhoea in nine western European countries, 1991-6. *Sex Transm Infect* 76, 110-116.
- van de Laar MJ, Pickering J, van den Hoek JA, van Griensven GJ, Coutinho RA, van de Wattrer HP (1990). Declining gonorrhoea rates in the Netherlands, 1976-1988: consequences for the AIDS epidemic. *Genitourin Med* 66, 148-55.
- van Putten JPM (1993). Phase variation of lipopolysaccharide directs interconversion of invasive and immunoresistant phenotypes of *Neisseria gonorrhoeae*. *EMBO J* 12, 4043-4051.

Βιβλιογραφία

- van Putten JPM (1995): Molecular mechanisms and implications for infection of lipopolysaccharide variation in *Neisseria*. *Mol Microbiol* 16:847.
- Veal WL, Nicholas RA, Shafer WM (2002). Overexpression of the MtrC-MtrD-MtrE efflux pump due to an *mtrR* mutation is required for chromosomally mediated penicillin resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Bacteriol.* 184:5619-5624.
- Verkleij H (1976). Gonorrhoea and foreign immigrants at Rotterdam University Hospital. *Br J Vener Dis* 52, 84-7.
- Walstad DL, Guymon LF & Sparling PF (1977). Altered outer membrane protein in different colonial types of *Neisseria gonorrhoeae*. *J Bacteriol* 129, 1623-1627.
- Wang SP, Holmes KK, Knapp JS, Ott SJ, Kyzer DD (1977). Immunologic classification of *Neisseria gonorrhoeae* with immunofluorescence. *J Immunol* 119, 794-803.
- West SHE & Sparling PF (1985): Response of *Neisseria gonorrhoeae* to iron limitation: Alterations in expression of membrane proteins without apparent siderophore production. *Infect Immunol* 47, 388-394.
- World Health Organisation Western Pacific Region Gonococcal Antimicrobial Surveillance Programme (2001). Surveillance of Antibiotic susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* in the WHO Western Pacific region. *Commun Dis Intel* 125, 274.
- Woods CR (2005). Infections in neonates and young children. *Semin Pediatr Infect Dis* 16, 258-270.
- Χατζηβασιλείου Μ (2002). Γονοκοκκική Λοίμωξη – Σύγχρονες Απόψεις. *Εφαρμοσμένη Κλινική Μικροβιολογία και Εργαστηριακή Διαγνωστική*. Περίοδος Β, Τόμος 7, Τεύχος 2, σελ 61-81.
- Xia M, Whittington WL, Holmes KK, Plummer FA, Roberts MC (1995). Pulsed-Field gel electrophoresis for genomic analysis of *Neisseria gonorrhoeae*. *J Infect Dis* 171, 455-8.
- Zarantonelli I, Borthagaray G, Eun-Hee L, Shafer WM (1999). Decreased azithromycin susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* due to *mtrR* mutations. *Antimicrob Agents Chemother* 43, 2468-2472.