

Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα (Τ.Ε.Ι) Αθήνας
Σχολή Επαγγελματιών Υγείας και Πρόνοιας
Τμήμα Ιατρικών Εργαστηρίων
Τομέας Μικροβιολογίας

Εργαστήριο Κλινικής Μικροβιολογίας

Υπεύθυνοι μαθήματος: Αγγελική Στάθη, B.sc., Ph.D., Κρανιωτάκη Ελένη, M.sc., Ph.D.

Ημερομηνία	12/11/2012
Τίτλος εργαστηριακής άσκησης	ΧΛΑΜΥΔΙΑ ΚΑΙ ΜΥΚΟΠΛΑΣΜΑΤΑ

Σκοπός

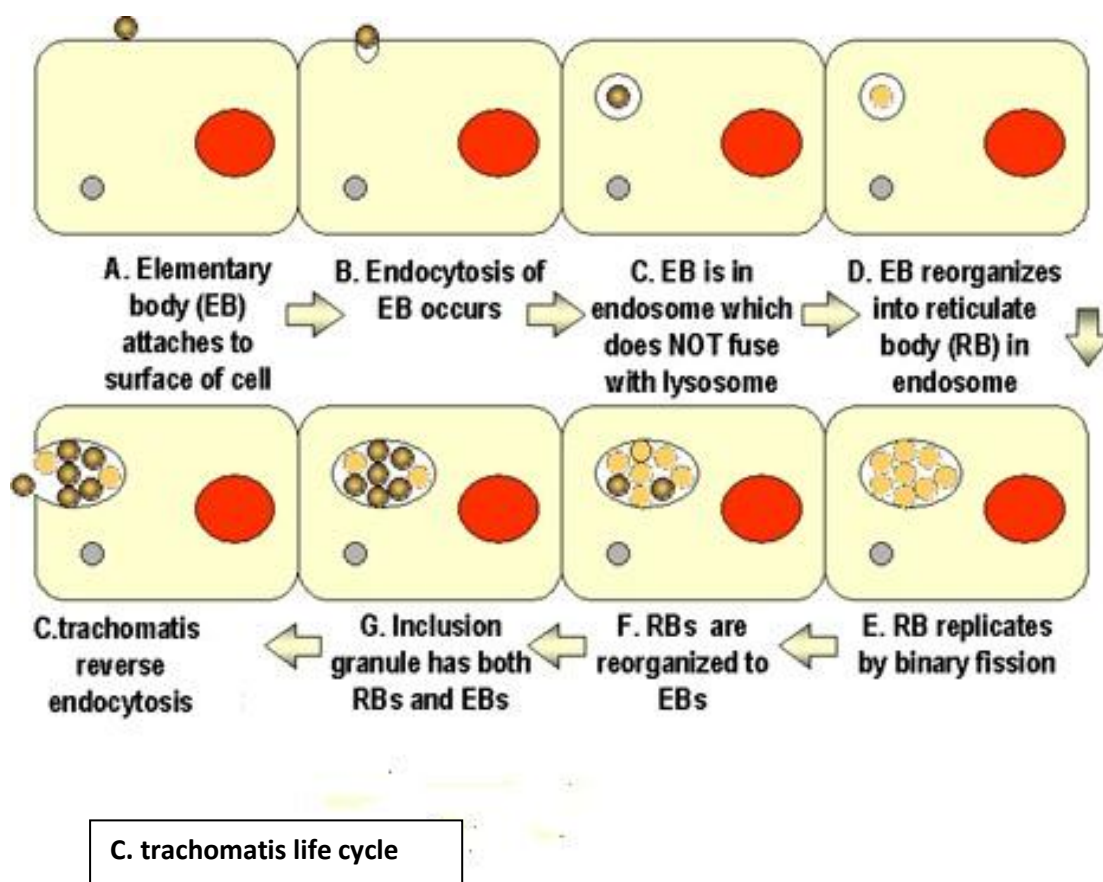
Η ταυτοποίηση των *Ureaplasma urealyticum* και *Mycoplasma hominis* που απομονώθηκαν από κλινικά δείγματα, μέσω ταυτοποιητικών κιτ του εμπορίου και η αναζήτηση μικροσκοπικά των αποικιών των παραπάνω μικροοργανισμών στο θρεπτικό υλικό A7. Επίσης η αναζήτηση *Chlamydia trachomatis* σε κλινικά δείγματα (ούρα και τραχηλικό επίχρισμα) με κιτ ανοσοχρωματογραφίας του εμπορίου.

1. ΧΛΑΜΥΔΙΑ

Το γένος *Chlamydia* περιλαμβάνει τα *Chlamydia trachomatis* οροτύπους A, B, B₁ & C, αίτιο του τραχώματος, τα *C. trachomatis* οροτύπους D έως K αίτιο λοιμώξεων του ουροποιογεννητικού συστήματος και τα *C. trachomatis* οροτύπους L₁, L₂, L₃ αίτιο του αφροδισίου λεμφοκοκκιώματος.

Τα χλαμύδια είναι υποχρεωτικά ενδοκυττάρια βακτήρια τα οποία περιέχουν DNA, RNA, έχουν κυτταρικό τοίχωμα και ριβονουκλεοσώματα. Διαφοροποιούνται από τα άλλα βακτηρίδια με βάση τον κύκλο αναπαραγωγής τους στον οποίο εμπλέκεται το κύτταρο- ξενιστής.

Διφασικός κύκλος ανάπτυξης, δύο μορφές του βακτηρίου: η λοιμογόνος, εξωκυττάρια μορφή, τα **στοιχειώδη σωμάτια (EB)** και η ενδοκυττάρια μορφή, τα **δικτυωτά σωμάτια (RB)**. Τα στοιχειώδη σωμάτια, προσκολλώνται στο κύτταρο, ενδοκυτταρώνονται και μέσα σε έγκλειστα, τα ενδοσώματα, μετατρέπονται σε δικτυωτά σωμάτια, αναπαράγονται με διχοτόμηση χρησιμοποιώντας τις ενεργειακές πηγές (ATP) του κυττάρου ξενιστή και στη συνέχεια οργανώνονται και πάλι σε στοιχειώδη σωμάτια, απελευθερώνονται από το κύτταρο και μολύνουν άλλα κύτταρα. Ο κύκλος αυτός διαρκεί 48-72 ώρες.



Λήψη- μεταφορά δειγμάτων

Ούρα πρώτης πρωινής ούρησης

Σπέρμα

Τραχηλικό έκκριμα ή επίχρισμα: λήψη εκκρίματος και κυττάρων από τον ενδοτράχηλο με κυτταρολογική βούρτσα ή στυλεό (όχι βαμβακοφόρο: dacron, rayon, αλγινικού ασβεστίου με πλαστικές ή μη αλουμινένιες συρμάτινες λαβές) με περιτροφικές κινήσεις 3-5 sec, αφού πρώτα καθαριστεί η είσοδος του τραχήλου από τη βλέννη με άλλο στυλεό. Κατά την έξοδο αποφεύγεται η επαφή του στυλεού με τα τοιχώματα του κόλπου.

Ουρηθικό έκκριμα: καθαρισμός της περιοχής με αποστειρωμένο φυσιολογικό ορό και λήψη του εκκρίματος με στυλεό (όχι βαμβακοφόρο: dacron, rayon, αλγινικού ασβεστίου με πλαστικές ή μη αλουμινένιες συρμάτινες λαβές).

Ουρηθικό επίχρισμα: εισαγωγή λεπτού στυλεού στην ουρήθρα σε βάθος 2-4 εκ. και λήψη του δείγματος με περιστροφικές κινήσεις, δύο ώρες μετά την ούρηση.

Υγρά παρακέντησης (επιδιδυμίδας, σαλπινγών κ.α)

Ορθικό επίχρισμα

Ξέσματα από έλκη

ΠΡΟΣΟΧΗ!! Η λήψη επιθηλιακών κυττάρων (δηλαδή επιχρίσματος), παράλληλα με τη λήψη εκκρίματος αυξάνει την πιθανότητα απομόνωσης του μικροοργανισμού.

Μετά τη λήψη τα δείγματα τοποθετούνται σε 1-2ml ειδικό υλικό μεταφοράς CTM(ChlamydiaTransportMedium).

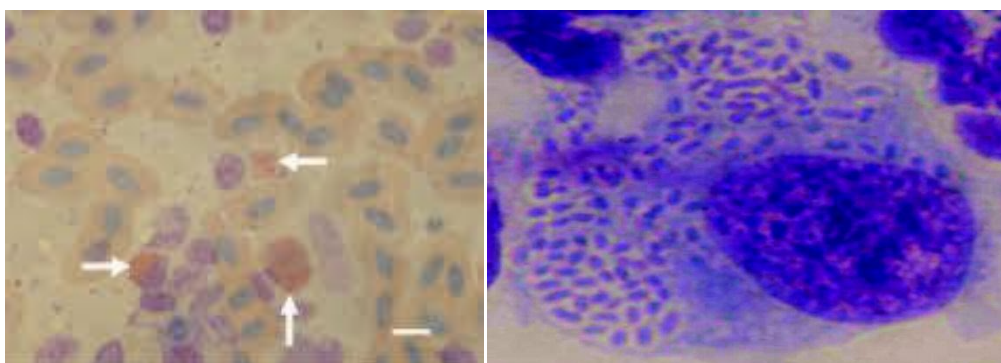
Τα δείγματα για κυτταροκαλλιέργεια μεταφέρονται σε υλικό μεταφοράς και σε πάγο. Η μεταφορά τους δεν πρέπει να υπερβαίνει τις 4 ώρες από τη στιγμή της λήψης. Αν τα δείγματα δεν εμβολιαστούν μέσα σε 48 ώρες στην κυτταροκαλλιέργεια καταψύχονται στους -70° C.



Μέθοδοι αναζήτησης χλαμυδίων σε κλινικά δείγματα

Οι εργαστηριακές μέθοδοι για τη διάγνωση των λοιμώξεων του ουροποιογεννητικού συστήματος περιλαμβάνουν την αναζήτηση των υποχρεωτικά ενδοκυτταρίων χλαμυδίων στα επιθηλιακά κύτταρα του ξενιστή με τις εξής μεθόδους:

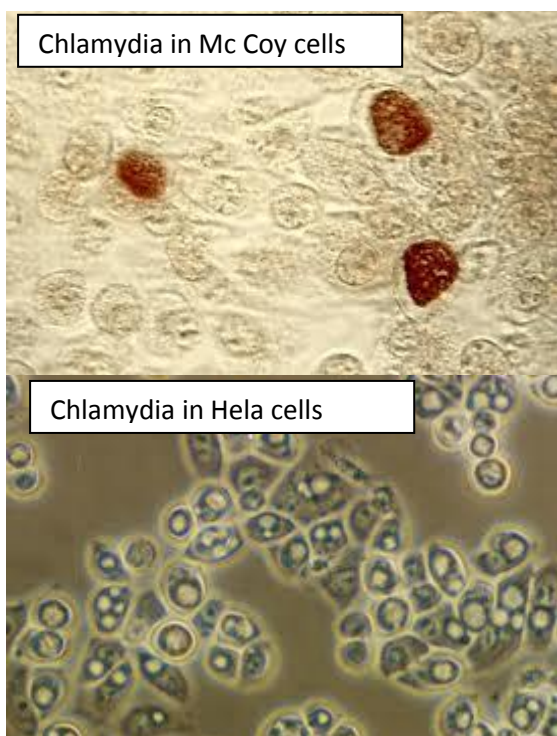
1. Άμεση μικροσκοπική μετά από χρώση Giemsa. Το παρασκεύασμα μονιμοποιείται με μεθανόλη (5 min), χρωματίζεται για 1h με αραιωμένη(1:40 ή 1:50) Giemsa και ξεπλένεται με αιθανόλη 95%. Χρησιμοποιείται σπάνια γιατί έχει χαμηλή ευαισθησία.



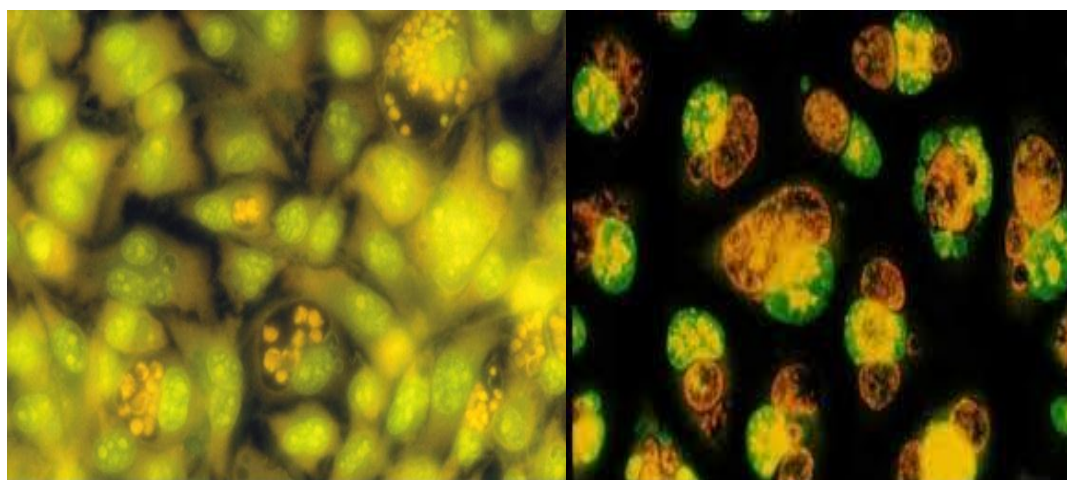
Χρώση Giemsa: *C. trachomatis*

2. **Κυτταροκαλλιέργεια:** κύρια μέθοδος διάγνωσης μέχρι τις αρχές της δεκαετίας του 1980. Σήμερα αποτελεί τη μόνη αποδεκτή μέθοδο από την ιατροδικαστική για την πιστοποίηση σεξουαλικής κακοποίησης ανηλίκου. Τα χλαμύδια καλλιεργούνται στον εμβρυϊκό σάκκο

εμβρύων όρνιθας και σε κυτταρικές σειρές McCoy, BGMK, HeLa κ.α. Η ευαισθησία της μεθόδου εξαρτάται από την ποιότητα των κλινικών δειγμάτων και τη διατήρηση των *C. trachomatis* σε ζώσα μορφή κατά τη διάρκεια της μεταφοράς των δειγμάτων στο εργαστήριο. Δαπανηρή και επίπονη μέθοδος.



3. **Ανοσοενζυμική** μέθοδος που χρησιμοποιεί πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι του LPS λιποπολυσακχαριδικού αντιγόνου. Είναι η πρώτη μέθοδος στη διαγνωστική μεθοδολογία της λοίμωξης, η οποία έκανε εφικτό σε σύντομο χρόνο τον έλεγχο μεγάλων πληθυσμιακών ομάδων, όπως εγκύων, σεξουαλικών συντρόφων νοσούντων, νεαρών εφήβων.
4. **Ο άμεσος ανοσοφθορισμός**, όπου χρησιμοποιούνται μονοκλωνικά ή πολυκλωνικά αντισώματα, έναντι της ειδικής OMP₁ πρωτεΐνης συνδεδεμένα με φλουορεσκεΐνη (FITC). Η μέθοδος αυτή μπορεί να εφαρμοσθεί σε μεγάλες πληθυσμιακές ομάδες με ευαισθησία 80% και η ειδικότητα 98-99%.

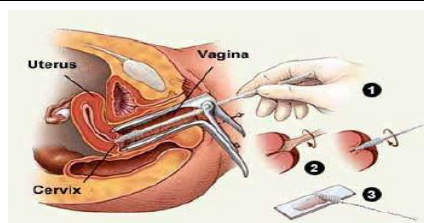
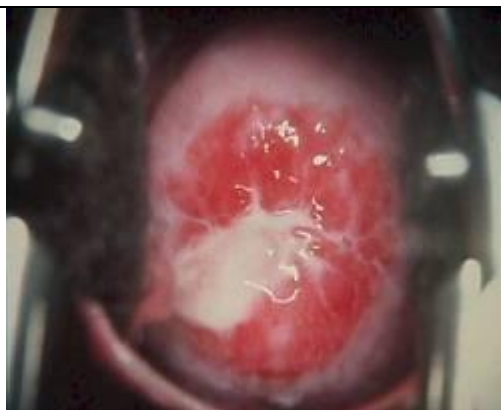


5. **Μοριακές μέθοδοι** που στηρίζονται στην ενίσχυση και πολλαπλασιασμό του νουκλεϊνικού οξέος των χλαμυδίων θεωρούνται οι πλέον ευαίσθητες και επιτρέπουν τον έλεγχο μεγάλων πληθυσμιακών ομάδων όπως και ασυμπτωματικών ατόμων. Διακρίνονται σε μεθόδους που στοχεύουν στην αναζήτηση rRNA των χλαμυδίων και μεθόδων που στοχεύουν στην ενίσχυση του DNA – Nucleic Acid Amplification Test (NAAT's). Η ευαισθησία των μεθόδων αυτών κυμαίνεται από 90.3 έως 97% και η ειδικότητα από 98 έως 99.1%.

Τραχηλίτιδα

C. trachomatis: 70% των γυναικών ασυμπτωματικές

- **Πυοσφαίρια!** Μεγάλος αριθμός χωρίς την ύπαρξη μικροοργανισμού
- **Όψη** τραχήλου: οιδηματώδης
- **Συμπτώματα:** βλεννοπυώδες τραχηλικό έκκριμα, δυσουρία, κοιλιακό **άλγος** αιμορραγία κατά την επαφή
- Συνύπαρξη λοίμωξης από άλλο σεξουαλικά μεταδιδόμενο μικρόβιο, συνήθως γονόκοκκο ή μυκόπλασμα, στο 40% των γυναικών



Ουρηθρίτιδα

C. trachomatis: 50% των ανδρών ασυμπτωματικοί

- **Πυοσφαίρια!** Μεγάλος αριθμός χωρίς την ύπαρξη μικροοργανισμού
- **Συμπτώματα:** ουρηθρικό έκκριμα, συχνουρία, δυσουρία, **πόνος** στους όρχεις, ευαισθησία στο περίνεο (επί προστατίτιδας)
- Συνύπαρξη λοίμωξης από άλλο σεξουαλικά μεταδιδόμενο μικρόβιο, συνήθως γονόκοκκο ή μυκόπλασμα, στο 20% των ανδρών



Αφροδίσιο λεμφοκοκκίωμα –C. trachomatis

Προκαλείται από το χλαμύδιο του τραχώματος (ορότυποι L1 ,L2, L3). Προσβάλλει πιο συχνά τους άνδρες. 7-20 μέρες μετά την επαφή αναπτύσσεται **ανώδυνη** φυσαλιδώδης ή βλατιδοφυσαλιδώδης βλάβη στα εξωτερικά γεννητικά όργανα, στον κόλπο, στον τράχηλο ή στον πρωκτό. Η βλάβη ελκοποιείται και επουλώνεται μετά από λίγες μέρες και **μπορεί να αγνοηθεί ή να περάσει απαρατήρητη**. Στη συνέχεια εμφανίζεται επιχώρια λεμφαδενίτιδα με συστηματικές εκδηλώσεις (ρίγος, εξάνθημα, μηνιγγίτιδα, πολυαρθρίτιδα κ.ά.). Η λεμφαδενίτιδα εξελίσσεται και δημιουργούνται αποστήματα, συρίγγια, λεμφοίδημα. Πρωκτίτιδα και πρωκτοκολίτιδα μπορεί να εμφανιστούν.

**Αναζήτηση χλαμυδιακού αντιγόνου:**

1. Με άμεσο ανοσοφθορισμό (DFA)
2. PCR
3. Κυτταροκαλλιέργεια

Ορολογικές μέθοδοι:

1. Έμμεσος ανοσοφθορισμός (IFA)
2. Σύνδεση συμπληρώματος

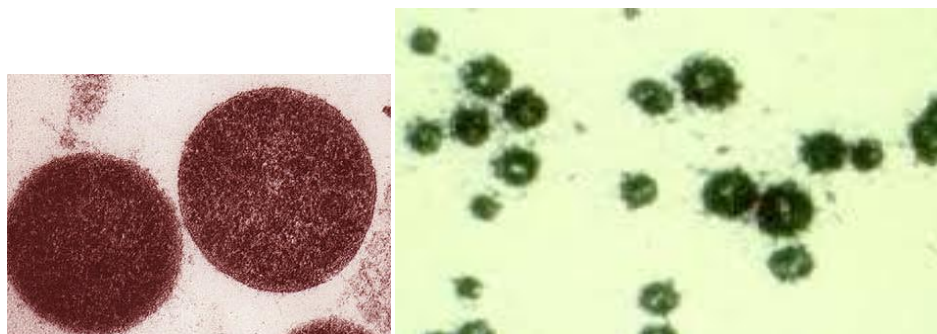
Χρώση Gram: ΔΕΝ ΓΙΝΕΤΑΙ

Στυλεοί με συνθετικές ίνες για λήψη – π.χ. Dacron, Rayon

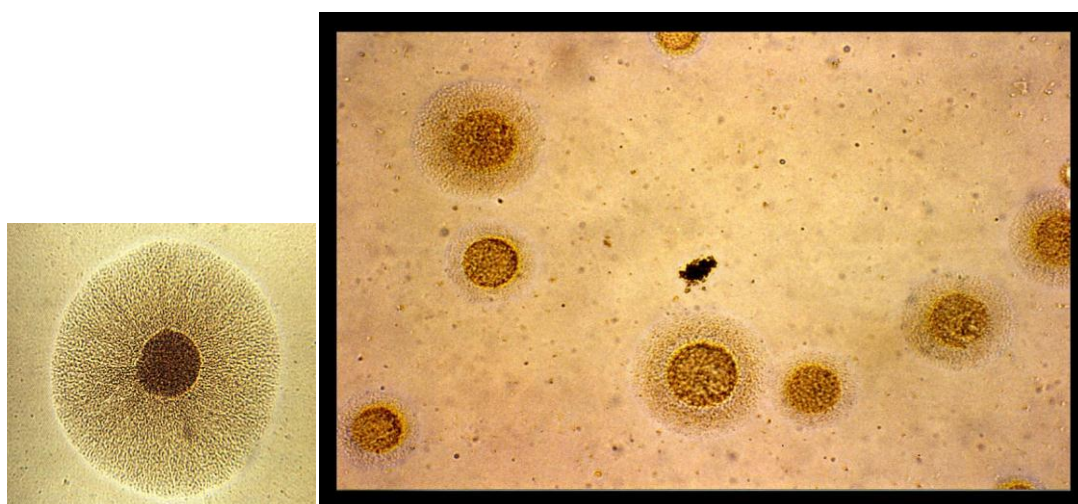
Μέθοδοι αναζήτησης σε κλινικά δείγματα

Η καλλιέργεια είναι μέθοδος επιλογής μόνο για τα *U. urealyticum* και *M. hominis*.

Το *U. urealyticum* ανιχνεύεται σε καλλιέργεια μέσα σε τουλάχιστον 24-48 ώρες. Οι αποικίες του είναι πολύ μικρές (15-60μm), στρογγυλές, κοκκώδεις, σκούρες καφέ ή μαύρες (θυμίζουν αχινό) και σε υλικό που περιέχει ουρία και ερυθρό της φαινόλης περιβάλλονται από κόκκινη άλω.



Το *Mycoplasma hominis* ανιχνεύεται σε καλλιέργεια μέσα σε τουλάχιστον 24-72 ώρες και έχει αποικίες τηγανιτού αυγού (200-300μm).



Η μέτρηση των αποικιών έχει σημασία όταν το *U. urealyticum* ή το *M. hominis* απομονώνονται σε μέρη που βρίθουν χλωρίδας: έτσι η παρουσία των μικροοργανισμών στο γεννητικό σύστημα σε ποσότητες κάτω από 10^4 cfu/ml δεν έχει συνήθως κλινική σημασία.

Αποικίες ανά οπτικό πεδίο (Μέσος όρος από 10 οπτικά πεδία)	Τίτλος στελέχους
1 έως 2	$\geq 10^3$ CFU/ml
2 έως 5	$\geq 10^4$ CFU/ml
5 έως 15	$\geq 10^5$ CFU/ml
15 και άνω	$\geq 10^6$ CFU/ml

Στο εμπόριο υπάρχουν καλλιεργητικά kits για την ανίχνευση και την ευαισθησία των μικροβίων σε αντιβιοτικά. Εμφανίζονται να υπερτερούν της κλασικής καλλιέργειας, στο μικρότερο χρόνο επώασης,

δεν μπορούν όμως να την αντικαταστήσουν: Δείγματα με αλκαλικό pH- λόγω ύπαρξης κάποιου άλλου μικροοργανισμού όπως π.χ. *Proteus spp.*, – είναι δυνατό να δώσουν ψευδώς θετικά αποτελέσματα.



Η PCR (Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης), έχει μεγάλη ευαισθησία, τουλάχιστον ίση με αυτή της καλλιέργειας. Η μέθοδος κερδίζει έδαφος τα τελευταία χρόνια, καθώς πλην της αξιοπιστίας της, προσφέρει το πλεονέκτημα της γρήγορης διάγνωσης (εντός 24 ωρών) και κατά συνέπεια της έγκαιρης έναρξης θεραπείας. Είναι η πιο κατάλληλη μέθοδος για την ανίχνευση των *M. genitalium* και *M. fermentans* που αναπτύσσονται πολύ αργά στην καλλιέργεια.

Ορολογική ταυτοποίηση: Αναζήτηση ειδικών αντισωμάτων (IgG και IgM ανοσοσφαιρίνες) στον ορό του αίματος. Η μέθοδος δεν χρησιμοποιείται συχνά στην διάγνωση λοιμώξεων του γεννητικού συστήματος.

2. ΜΥΚΟΠΛΑΣΜΑΤΑ

Τα μυκοπλάσματα (*Mycoplasmataceae*) είναι πολύ μικρά βακτήρια (0,3-0,7 μm), τα οποία διαθέτουν κυτταρική μεμβράνη, αλλά δεν διαθέτουν κυτταρικό τοίχωμα, γι' αυτό και δεν χρωματίζονται με τη χρώση Gram.

Τα *Mycoplasma hominis* και *Ureaplasma urealyticum* είναι τα πρώτα σε συχνότητα απομόνωσης μυκοπλάσματα από το γεννητικό σύστημα. Παρόλο που αποτελούν μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας του κόλπου, συχνά προκαλούν λοιμώξεις στο ουρογεννητικό σύστημα, είτε ενδογενείς είτε σεξουαλικά μεταδιδόμενες. Το *Ureaplasma urealyticum* **έχει ενοχοποιηθεί ως πιθανό αίτιο αποβολής του εμβρύου!!!**

Το *Mycoplasma genitalium* προκαλεί μη γονοκοκκική ουρηθρίτιδα και έχει συσχετισθεί με ενδομητρίτιδα και τραχηλίτιδα, αλλά και το *Mycoplasma fermentans* είναι σε κάποιες περιπτώσεις παθογόνο.

Το *Mycoplasma spermophilum* έχει ανιχνευθεί σε σπέρμα ανδρών με υπογονιμότητα, επηρεάζοντας την κινητικότητα και την μορφολογία των σπερματοζωαρίων.

Λήψη- μεταφορά δειγμάτων

Ούρα πρώτης πρωινής ούρησης

Σπέρμα

Ουρηθρικό επίχρισμα

Προστατικό έκκριμα

Αμνιακό υγρό

Κολπικό επίχρισμα: με κολποδιαστολέα και εισαγωγή στυλεού από τον οπίσθιο θόλο του κόλπου.

Τραχηλικό επίχρισμα

Δεν χρησιμοποιείται ποτέ βαμβακοφόρος στυλεός (τοξικός): dacron, rayon, αλγινικού ασβεστίου με πλαστικές ή μη αλουμινένιες συρμάτινες λαβές). Όχι αντισηπτικά και λιπαντικές ουσίες κόλπου (τοξικά για τα μυκοπλάσματα) πριν τη λήψη.

Τα δείγματα πρέπει αμέσως μετά τη λήψη να τοποθετούνται σε ειδικό υλικό μεταφοράς. ΑΝ η μεταφορά διαρκέσει πάνω από 1 ώρα, τότε το δείγμα φυλάσσεται στους 4° C για 24 ώρες, αλλιώς στους -70° C για >24 ώρες (στους -20° C μειώνεται η βιωσιμότητα).

Το πιο κατάλληλο υλικό μεταφοράς είναι ο ζυμός που χρησιμοποιείται για την καλλιέργεια των μυκοπλάσμάτων.

Θρεπτικά υλικά

• Ζυμός 10B Arginine (περιέχει αμινοξέα, νιτρώδη και το αντιβιοτικό cefoperazone)
• SP-4 broth (με βάση τη γλυκόζη)
• A7 ή A8 άγαρ
• DNA-PPLOάγαρ

**Ενοφθαλισμός των δειγμάτων**

Τα δείγματα ενοφθαλμίζονται σε ζυμό και σε άγαρ A7. Οι ζυμοί επωάζονται στους 37° C σε αερόβιες συνθήκες και τα τρυβλία επωάζονται στους 37° C σε ατμόσφαιρα με 5-10% CO₂. Το *U. urealyticum* υδρολύει την ουρία και απελευθερώνει αμμωνία, ενώ το *M. hominis* υδρολύει την αργινίνη. Οι ζυμοί ανάπτυξης περιέχουν ουρία και αργινίνη, αλλά και το δείκτη ερυθρό της φαινόλης. Η αντίδραση (υδρόλυση ουρίας ή αργινίνης) οδηγεί σε αλλαγή του pH (αλκαλικό) και αλλαγή του χρώματος του ζυμού (κόκκινο από κίτρινο). Η υδρόλυση της ουρίας /αργινίνης γίνεται αρκετά γρήγορα μεεπακόλουθο το θάνατο των μικροοργανισμών. Αμέσως μετά την αλλαγή χρώματος απαιτείται ανακαλλιέργεια σε στερεό μέσο. Ο ζυμός ελέγχεται καθημερινά για αλλαγή χρώματος. Το άγαρ ελέγχεται μικροσκοπικά για αποικίες (10X).

Βιβλιογραφία

1. Αντωνιάδης Α., Ν. Ι. κ. Λεγάκης. 2005. Ιατρική Μικροβιολογία. Εκδόσεις Πασχαλίδη. Αθήνα.
2. Χαρθάλου Αικατερίνη. Πρωτόκολλα Κλινικής Μικροβιολογίας. Σύνοψη εργαστηριακής προσπέλασης βακτηριακών λοιμώξεων. Εκδόσεις Πασχαλίδη. 2007.
3. Elias J., Frosch M., Vogel U., 2012. NeiManual of Clinical Microbiology, 10th ed., ASM, Chapter 32, pp. 559-573.
4. Carder C., Mercey D., Benn P., 2006. Chlamydia trachomatis. Sex Trans Infect, 82 (4), pp. iv10-12.
5. Cook R.L., Hutchison S.L., Østergaard L., Braithwaite R.S., Ness R.B., 2005. Systematic review: non invasive testing for Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae. AnnInternMed., 142(11), pp.914-25.
6. Jensen I.P., Fogh H., Prag J., 2003. Diagnosis of Chlamydia trachomatis infections in a sexually transmitted disease clinic: evaluation of a urine sample tested by enzyme immunoassay and polymerase chain reaction in comparison with a cervical and/or a urethral swab tested by culture and polymerase chain reaction. ClinMicrobiolInfect, 9, pp. 194-201.
7. MMWR Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines, vol. 55, RR-11, 2006.
8. Murray PR., et al: Manual of Clinical Microbiology, 2007.
9. Sweet RL., Gibbs RS: Infectious diseases of the female genital tract, 2009.
10. Winn W., et al: Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 2006.
11. <http://pathmicro.med.sc.edu/mayer/chlamyd.htm>
12. <http://images.wellcome.ac.uk/indexplus/image/W0044992.html>