

Molekularna dijagnostika bakterije *Mycoplasma genitalium*

Abramović, Lucija

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split / Sveučilište u Splitu**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:176:470701>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-20**

Repository / Repozitorij:



Sveučilišni odjel zdravstvenih studija
SVEUČILIŠTE U SPLITU

[Repository of the University Department for Health Studies, University of Split](#)



zir.nsk.hr



UNIVERSITY OF SPLIT



DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU

Podružnica

SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ

MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Lucija Abramović

MOLEKULARNA DIJAGNOSTIKA BAKTERIJE *Mycoplasma genitalium*

Završni rad

Split, 2022.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

Podružnica

SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ
MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Lucija Abramović

MOLEKULARNA DIJAGNOSTIKA BAKTERIJE

Mycoplasma genitalium

Molecular diagnosis of *Mycoplasma genitalium*

Završni rad / Bachelor's Thesis

Mentor:

**Doc. prim. dr. sc. Vanja Kaliterna, dr. med. specialist of clinical
microbiology**

Split, 2022.

Sveučilište u Splitu
Sveučilišni odjel zdravstvenih studija
Medicinsko laboratorijska dijagnostika

Znanstveno područje: Biomedicina i zdravstvo
Znanstveno polje: Kliničke medicinske znanosti

Mentor: doc. prim. dr. sc. Vanja Kaliterna, dr. med. spec. medicinske mikrobiologije

Molekularna dijagnostika bakterije *Mycoplasma genitalium*
Lucija Abramović, 311246

Sažetak:

Cilj rada: Svrha rada je detaljno opisati i objasniti molekularnu metodu za dijagnostiku bakterije *Mycoplasma genitalium* u Nastavnom zavodu za javno zdravstvo Splitsko-dalmatinske županije i metode uzimanja uzoraka za dijagnosticiranje infekcija uzrokovanih bakterijom *M. genitalium*.

Materijali i metode: Postupak molekularne dijagnostike *M. genitalium* zasniva se na detekciji i amplifikaciji nukleinske kiseline korištenjem PCR metode u stvarnom vremenu. U dijagnostičku svrhu određivanja *M. genitalium* u Nastavnom zavodu za javno zdravstvo Splitsko-dalmatinske županije koristi se Cobas z480 analizator i kitovi LightMix Kit *Mycoplasma Genitalium* koji mogu detektirati 10 ekvivalentnih kopija genoma bakterije. Uzorci su obrisak cerviksa i uretre te prvi mlaz urina. Prije amplifikacije, uzorci se stavljaju u uređaj za ekstrakciju kako bi se dobila pročišćena nukleinska kiselina za PCR metodu.

Rezultati: Pozitivan nalaz pretrage na *M. genitalium* označava prisutnost DNK bakterije u testiranom uzorku, dok negativan nalaz označava da DNK bakterije nije detektirana u uzorku.

Zaključak: *Mycoplasma genitalium* je spolno prenosiva bakterija koja najčešće uzrokuje asimptomatske infekcije. Simptomatske infekcije uključuju pojačani iscjedak iz spolovila, disuriju, bol u donjem dijelu trbuha, međumenstrualno krvarenje itd. Sve veći problem predstavlja razvoj rezistencije bakterije na antimikrobne lijekove. U slučaju infekcije, potrebno je istodobno liječiti i partnere zaraženih osoba. Neliječene infekcije mogu dovesti do razvoja komplikacija (neplodnost, zdjelična upalna bolest, ektopična trudnoća, prijevremeni porođaj...).

Ključne riječi: dijagnostika *M. genitalium*; amplifikacija nukleinske kiseline; spolno prenosiva infekcija, rezistencija na lijekove

Rad sadrži: 52 stranice, 36 slika, 3 tablice, 30 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

BASIC DOCUMENTATION CARD

BACHELOR THESIS

University of Split
University Department for Health Studies
Medical laboratory diagnostics

Scientific area: Biomedicine and health
Scientific field: Clinical medical sciences

Supervisor: doc. prim. dr. sc. Vanja Kaliterna, dr. med. specialist of clinical microbiology

Molecular diagnosis of *Mycoplasma genitalium* Lucija Abramović, 311246

Summary:

Objectives: The aim of the study is to describe explain in detail the molecular method for the diagnosis of the *Mycoplasma genitalium* in the Institute of Public Health of the Split-Dalmatia County and sampling methods for diagnosing infections caused by the *M. genitalium* bacteria.

Material and methods: The procedure of molecular diagnosis of *M. genitalium* is based on the detection and amplification of nucleic acid using the real-time PCR method. The Cobas z480 analyzer and the LightMix Kit *Mycoplasma Genitalium* are used for the diagnostic purpose of determining *M. genitalium* in the Teaching Institute of Public Health of Split-Dalmatia County. Kits can detect 10 equivalent copies of the bacterium's genome. Samples are cervical and urethral swabs and the first-void urine. Before amplification, samples are placed in an extraction device to obtain purified nucleic acid for the PCR method.

Results: A positive test result indicates the presence of bacterial DNA in the tested sample, while a negative result indicates that bacterial DNA was not detected in the sample.

Conclusion: *Mycoplasma genitalium* is a sexually transmitted bacterium that most often causes asymptomatic infections. Symptomatic infections include increased discharge from the genitals, dysuria, lower abdominal pain, intermenstrual bleeding, etc. A growing problem is the development of bacterial resistance to antimicrobial drugs. In case of infection, it is necessary to treat partners of infected persons at the same time. Untreated infections can lead to the development of complications (infertility, pelvic inflammatory disease, ectopic pregnancy, premature birth...).

Keywords: diagnosis of *Mycoplasma genitalium*, nucleic acid amplification, sexually transmitted infection, resistance to drug

Thesis contains: 52 pages, 36 figures, 3 tables, 30 references

Original in: Croatian

SADRŽAJ

| | |
|---|----|
| 1. UVOD | 1 |
| 1.1. Bakterije iz roda <i>Mycoplasma</i> | 2 |
| 1.2. <i>Mycoplasma genitalium</i> | 4 |
| 1.3. Morfologija <i>Mycoplasma genitalium</i> | 5 |
| 1.4. Epidemiologija infekcija uzrokovanih bakterijom <i>Mycoplasma genitalium</i> | 7 |
| 1.5. Patogeneza bakterije <i>Mycoplasma genitalium</i> | 9 |
| 1.6. Faktori rizika za infekciju bakterijom <i>Mycoplasma genitalium</i> | 11 |
| 1.7. Klinička slika infekcija uzrokovanih bakterijom <i>Mycoplasma genitalium</i> | 12 |
| 1.8. Dijagnostika infekcija uzrokovanih bakterijom <i>Mycoplasma genitalium</i> | 20 |
| 1.9. Liječenje infekcija uzrokovanih bakterijom <i>Mycoplasma genitalium</i> | 21 |
| 1.10. Prevencija infekcija uzrokovanih bakterijom <i>Mycoplasma genitalium</i> | 25 |
| 2. CILJ RADA | 26 |
| 3. MATERIJALI I METODE | 27 |
| 3.1. Vrste uzoraka za dijagnostiku bakterije <i>M. genitalium</i> | 27 |
| 3.2. Postupak uzorkovanja | 28 |
| 3.3. Metode dijagnostike bakterije <i>M. genitalium</i> | 31 |
| 3.3.1. Molekularna dijagnostika bakterije <i>M. genitalium</i> | 32 |
| 4. REZULTATI | 45 |
| 5. ZAKLJUČAK | 46 |
| 6. SAŽETAK | 47 |
| 7. ABSTRACT | 48 |
| 8. LITERATURA | 49 |
| 9. ŽIVOTOPIS | 52 |

1. UVOD

Porodica *Mycoplasmataceae* uključuje rodove *Mycoplasma* i *Ureaplasma* od kojih se četiri vrste smatraju genitalnim mikoplazmama: *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma urealyticum* te *Ureaplasma parvum*. Ove vrste koloniziraju urogenitalni sustav najčešće spolnim putem, odnosno kao posljedica nezaštićenog spolnog odnosa te mogu dovesti do različitih patoloških stanja. Mikoplazme se ne boje po Gramu jer nemaju staničnu stjenku. Vjeruje se da su evoluirale iz gram pozitivnih bakterija kroz proces degenerativne evolucije što je dovelo do gubitka mnogih gena i posljedično redukcije njihovog genoma. *Mycoplasma genitalium* je parazitska samoreplicirajuća bakterija s najmanjim poznatim genomom. Neke bakterije iz roda *Mycoplasma* su dio normalne flore, no najčešće su prisutni kao uzročnici infekcija urogenitalnog sustava, ali i infekcija dišnog sustava, zglobova, središnjeg živčanog sustava i rana (1, 2).

Uočljiva je genetska povezanost između bakterija iz roda *Mycoplasma*. Pokazuju brzu evoluciju, s velikom stopom divergencije te visoku učestalost antigenskih varijacija. Primarno, razlikuju se po kliničkoj slici infekcija koje izazivaju: *Mycoplasma genitalium* uzrokuje negonokokni uretritis, cervicitis, endometritis i sterilitet, dok *Mycoplasma hominis* uzrokuje bakterijsku vaginozu, pijelonefritis i pneumoniju, a nema povezanosti s uretritisom kod muškaraca i sterilitetom kod žena (1).

Bakterije iz roda *Ureaplasma* dio su fiziološke flore genitalnog trakta u 70 % slučajeva, prvenstveno *Ureaplasma parvum*. *Ureaplasma urealyticum* je često prisutna kao uzročnik infekcija i problema u trudnica. Najčešće je identificirana tijekom prerane rupture plodovih ovoja. Uzročnik je zdjelične upalne bolesti i ekstragenitalnih infekcija (postpartalna sepsa). Također, uzrokuje spontani pobačaj te je često detektirana u tkivima mrtvorođenih fetusa. Osim toga, može se naći i kao uzročnik meningitisa u prematurusa, kao i bakterija *M. hominis* (3).

1.1. Bakterije iz roda *Mycoplasma*

Rod *Mycoplasma*, odnosno razred *Mollicutes* čine bakterije koje nemaju staničnu stjenku. Od 200 vrsta, 16 je ljudskog podrijetla, a od toga pet vrsta ima primarni klinički značaj: *M. pneumoniae*, *M. hominis*, *M. genitalium*, *U. urealyticum* te *U. parvum*. (4) Većina čovjekovih mikoplazmi čini normalnu mikrobiotu, odnosno mogu se naći kao komenzali na orofaringealnoj sluznici te sluznici genitourinarnog trakta, osim *M. pneumoniae* koja je uvijek uzročnik inaparentne ili aparentne infekcije, te *M. genitalium* za koju još uvijek nije poznato može li biti dio normalne flore. Njihovo obitavalište su sluznice ljudi i životinja, a uzrokuju pretežno infekcije respiratornog podrijetla te infekcije urogenitalnog sustava (3).

Tablica 1. Klinički značaj najznačajnijih bakterija iz roda *Mycoplasma* (3, 4)

| Vrsta | Patogenost |
|-------------------------------|---|
| <i>Mycoplasma pneumoniae</i> | Pneumonija, traheobronhitis, infekcije zglobova |
| <i>Mycoplasma hominis</i> | Postpartalna sepsa, pijelonefritis, salpingitis, konjunktivitis |
| <i>Mycoplasma genitalium</i> | Uretralne infekcije (negonokokni uretritis, cervicitis...) |
| <i>Ureaplasma urealyticum</i> | Negonokokni uretritis, bolesti pluća u nedonoščadi |
| <i>Ureaplasma parvum</i> | Uretralne infekcije |

Bakterije iz roda *Mycoplasma* su najmanji samoreplicirajući, slobodnoživući organizmi u prirodi. Njihove karakteristike su:

- Ekstremno mala veličina te iznimna osjetljivost stanica.
- Pleomorfizam kao posljedica nedostatka stanične stjenke. Umjesto nje, omeđene su troslojnom membranom koja u svom sastavu sadrži sterol.
- Potpuna rezistencija na penicilin zbog nedostatka stanične stjenke koja je ciljno mjesto djelovanje penicilina.
- Rast i razmnožavanje na složenom mediju bez stanica kojeg čine sterol i lipoprotein.
- Potreba za kolesterolom.
- Ovisnost mikoplazmi o njihovom domaćinu za mnoge hranjive tvari.
- Veliki afinitet za staničnu stjenku sisavaca (4).

Za kultivaciju mikoplazmi potrebna je podloga s dodatkom seruma koji omogućava stvaranje sterola neophodnog za njihov rast, metabolički supstrati (npr. ureja ili glukoza) i faktori rasta (npr. ekstrakt kvasca) (4). Za dokazivanje mikoplazmi koriste se mediji s argininom kojeg

mikoplazme metaboliziraju, a oslobođeni produkti (amonijak) povisuju pH te mijenjaju boju medija (iz žute u ružičastu). Za dokazivanje ureaplazmi rabe se mediji s urejom, jer ureaplazme posjeduju ureazu koja hidrolizira ureju do CO₂ i amonijaka što također povisuje pH i mijenja boju medija. Nakon što se uzorak inokulira u medij, rade se serijska razrjeđenja jer se tako razrjeđuju inhibitori rasta u uzorku i smanjuje broj kontaminirajućih bakterija (1). Ovisno o uzročniku koji se traži, za kultivaciju se koriste bujoni ili krute podloge (npr. A8 agar). Kruti mediji se obično inkubiraju na 37 °C uz 5 – 10 % CO₂, odnosno u mikroaerofilnim uvjetima, dok se bujoni inkubiraju također na 37 °C, ali u atmosferskim, odnosno aerobnim uvjetima. Trajanje inkubacije varira ovisno o uzročniku: *M. hominis* i *U. urealyticum* se zbog svog brzog rasta lako inkubiraju 48 – 96 h, a *M. pneumoniae* zahtjeva puno dulju inkubaciju, oko 4 tjedna (4). Kolonije brzorastućih mikoplazmi pretežno su tipičnog izgleda na agaru: okrugle, površina je granulirana s tamnim središtem karakteristično ukopanim u agar. Na primjer, kolonije *M. hominis* imaju izgled „jaja na oko“, u odnosu na kolonije *M. pneumoniae* koje su dosta manje, okrugle, uzdignute i zrnaste nalik na plod murve, a katkad imaju zrnasti centar koji je urastao u podlogu i homogeni periferni dio. Kolonije *U. urealyticum* su vrlo sitne, jednoliko guste te zrnaste koje se razvijaju ukopane u agar (3-5).

Mikoplazme se, *in vivo* i u kulturama, razmnožavaju dominantno na površini stanica. Mnoge mikoplazme kao izvor energije koriste glukozu, a ureaplazme trebaju ureju. Također, neke od njih stvaraju perokside i hemoliziraju eritrocite (4).

Mycoplasma genitalium se ne može kultivirati. Dokazuje se isključivo molekularnim metodama.



Slika 1. Kolonije bakterije *Mycoplasma hominis* na A7 agaru

(<https://www.elitechgroup.com/product/a7-agar>)

1.2. *Mycoplasma genitalium*

Mycoplasma genitalium je spolno prenosiva bakterija s najmanjim genomom koja boravi na sluznicama epitela urogenitalnog i dišnog sustava u sisavaca. Prvi je put izolirana 1981. godine u obriscima uretre dvojice muškaraca s NGU (nagonokoknim uretritisom). Za rast su joj potrebni vitamini, aminokiseline, prekursori nukleinskih kiselina i posebno lipidi (2).

M. genitalium je fakultativni unutarstanični patogen sa sposobnošću preživljavanja i izvanstanično i unutarstanično, a unutarstanična lokalizacija mu omogućuje izbjegavanje staničnog imunskog odgovora te uvelike olakšava uspostavu kronične i perzistentne infekcije (1). Primarno uzrokuje različite infekcije urogenitalnog sustava i u žena i u muškaraca jer se prenosi spolnim putem. Vrlo se teško kultivira, a zbog teškoća u izolaciji još uvijek nije poznato može li biti dio normalne fiziološke flore (3).

Ukoliko se javi infekcija, potrebno je liječiti oba partnera kako bi se spriječile ponavljane infekcije, ali i razvoj komplikacija poput zdjelične upalne bolesti, epididimitisa i neplodnosti. Liječenje infekcije je ograničeno na vrlo malo terapijskih alternativa zbog sklonosti razvoju antimikrobne rezistencije. Iako prijenos bakterije s majke na dijete pri rođenju nije puno istraživano, *M. genitalium* je u nekim studijama otkrivena u respiratornom traktu novorođene djece čije su majke bile zaražene (2).



Slika 2. Prikaz bakterije *Mycoplasma genitalium* s transmisijskim elektronskim mikroskopom

(<https://pharmaceutical-journal.com/article/1d/antibiotic-treatment-of-mycoplasma-genitalium-infection>)

1.3. Morfologija *Mycoplasma genitalium*

Smatra se da su mikoplazme evoluirale iz gram pozitivnih bakterija procesom degenerativne evolucije što je dovelo do delecije gena i redukcije njihovog genoma. Smanjenje genoma je rezultat prilagodbe na njihov parazitski način života. Budući da brzo evoluiraju, imaju visoke stope mutacija. Filogenetski su najbližije klostridijama. Za razliku od drugih bakterija, nemaju staničnu stjenku, a od virusa se razlikuju po tome što sadrže i DNK i RNK te mogu živjeti u mediju bez stanica (1, 2).

Glavna značajka mikoplazmi je nepostojanje stanične stjenke, ali posjeduju trilaminarnu membranu debljine 8 – 10 nm koja okružuje citoplazmu. Trilaminarna membrana je bogata sterolima, odnosno kolesterolom i raznim lipidima neophodnima za sintezu i rast membrane (3, 5). Mikoplazme su vrlo sitne, pleomorfne stanice promjera 0,2 – 0,3 µm. Mogu prolaziti kroz bakteriološke filtre, stoga su se nekoć smatrali virusima. Nemaju jedinstven oblik zbog nepostojanja stanične stjenke, nego su prisutne pleomorfne strukture, bez fiksnog oblika i veličine. Najčešće se javljaju kokoidni, štapičasti, nepravilni i filamentozni oblici (3). Filamenti imaju tendenciju stvaranja miceloidnih struktura pa se stoga i nazivaju mikoplazmama. Razmnožavaju se binarnom fisijom. Posjeduju površinske antigene poput membranskih proteina, lipoproteina i glikolipida, a neki membranski proteini prolaze kroz spontanu antigensku varijaciju (2). Glavni antigeni bakterije *Mycoplasma genitalium* su glikolipidi te proteini stanične membrane, a glavni faktori virulencije su adhezijski proteini i terminalna organela. *Mycoplasma genitalium* na svojem kraju ima terminalnu organelu koju tvore proteinski adhezini, a ona omogućuje bakteriji kolonizaciju sluznica, odnosno adheriranje na epitelne stanice sluznica. Također, *M. genitalium* proizvodi različite enzime kao metionin – sulfoksid reduktazu koja djeluje kao antioksidans koji štiti njene enzime te nukleazu koja joj osigurava građevne elemente (3).

Mycoplasma genitalium ne podnosi vrlo niske i vrlo visoke temperature te ugiba u roku 5 – 10 minuta na 40 °C. Osim toga, izrazito je osjetljiva na isušivanje te na sve dezinficijense, osmotski stres i deterdžente. Specifična je za domaćina i tkivo, a u uvjetima izvan domaćina ne može preživjeti dulje vrijeme (2, 3).

Minimalni genom

Stanica bakterije *Mycoplasma genitalium* sadrži minimalni skup organela neophodnih za rast i replikaciju: plazma membranu, ribosome i genom koji se sastoji od dvolančane kružne DNK molekule (2). *Mycoplasma genitalium* ima najmanji genom s približno 580 kb i posljedično

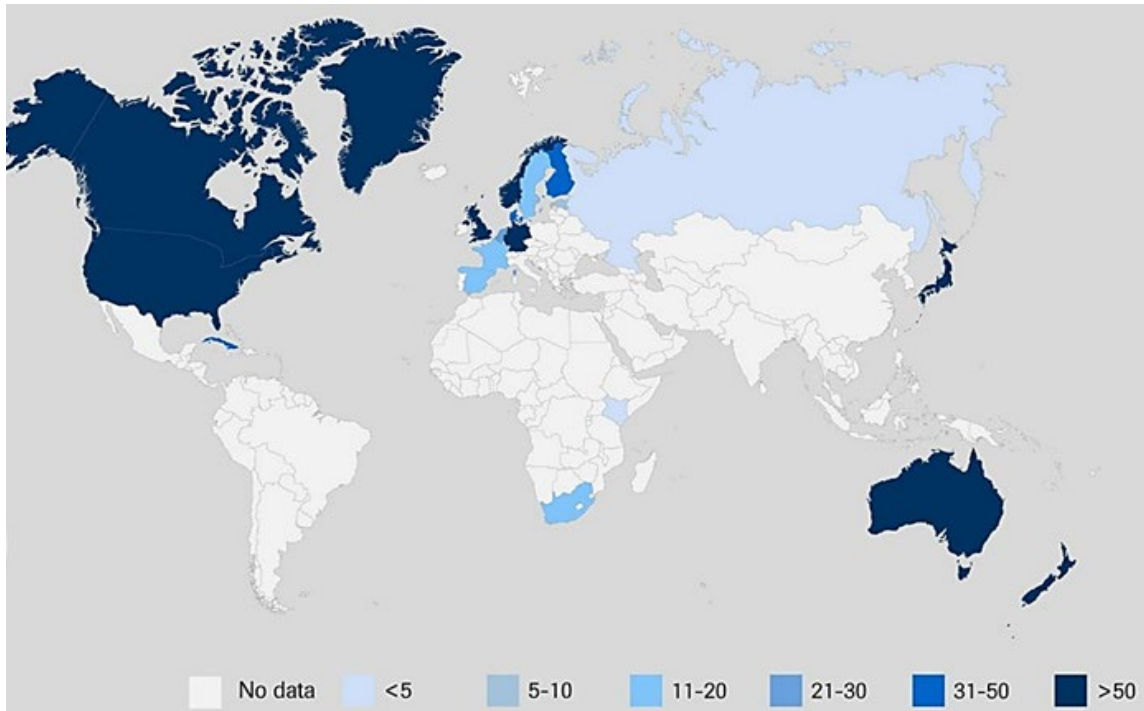
minimalnim metabolizmom te malo genomske redundancije, odnosno prisutnih višestrukih gena koji izvršavaju istu funkciju u genomu nekog organizma. Genom sadržava 528 gena, odnosno 482 gena koji kodiraju proteine, a oko 28 % otpada na hipotetske gene, odnosno gene koji kodiraju proteine nepoznate funkcije. Također, u genomu *M. genitalium* je nizak prosječan sadržaj gvanin – citozin, a iznosi oko 31 %.

Genomu ove bakterije nedostaju gotovo svi enzimi neophodni za *de novo* sintezu nukleinskih kiselina te biosintezu aminokiselina i masnih kiselina. Budući da je *M. genitalium* nutritivno vrlo zahtjevna, odnosno ima iznimno kompleksne potrebe za hranjivim tvarima, oslanja se na metaboličke faktore rasta dobivene od domaćina i primjer je visoko razvijene interakcije domaćin – patogen. Tako razvijena interakcija stanica olakšava perzistenciju patogena u urogenitalnim tkivima domaćina.

M. genitalium upotrebljava modificirani genetski kod u kojem UGA kodira triptofan, a ne označava uobičajeni stop kodon koji ne kodira aminokiseline, nego predstavlja kraj translacije, odnosno stvaranja polipeptidnog lanca. To je svojstvo do sada pronađeno samo u mikoplazmama i nebiljnim mitohondrijima. Svaki otvoreni okvir za čitanje otkriven u *M. genitalium* kodiran je i u genomu respiratornog patogena *M. pneumoniae* (2, 6).

1.4. Epidemiologija infekcija uzrokovanih bakterijom *Mycoplasma genitalium*

Mycoplasma genitalium je jedna od najčešćih spolno prenosivih bakterija, nakon klamidije i gonoreje. Također, ubraja se među glavne javnozdravstvene probleme jer još uvijek nisu u potpunosti utvrđeni niti jasni mehanizmi njenog djelovanja, a ograničeno je i liječenje infekcija na sve manji raspon učinkovitih antibiotika zbog visoke stope otpornosti, tj. rezistencije bakterije na antimikrobne lijekove. Procjenjuje se da je prevalencija *M. genitalium* rezistentnog na makrolide približno 50 %, a u nekim zemljama i premašuje taj broj. Osim toga, često se radi o asimptomatskim slučajevima infekcije, a kao rezultat neprepoznate i neliječene infekcije može doći do razvoja ozbiljnih komplikacija kao što je zdjelična upalna bolest i neplodnost. Više od pola pacijenata zaraženih mikoplazmom su spolno aktivni ljudi između 18 i 25 godina starosti, prostitutke i homoseksualci. Prevalencija infekcije uzrokovane bakterijom *M. genitalium* uvelike varira u različitim zemljama. Njena prevalencija u općoj populaciji razvijenih zemalja se procjenjuje na 1 %, a u zemljama u razvoju na 4 % (7). Razlog tomu je uglavnom nedostatak adekvatnih dijagnostičkih postupaka, terapija, ali i znanja i svijesti o uporabi zaštite i ozbiljnosti posljedica visokorizičnog seksualnog ponašanja. U posljednje vrijeme, infekcije mikoplazmom smatraju se gotovo jednako čestim kao infekcije klamidijom, što potvrđuje prevalencija *M. genitalium* među odraslom populacijom u Ujedinjenom Kraljevstvu i SAD-u koja iznosi 1 – 2 % (1,7 %), gotovo kao klamidija (8). Također, stopa infekcije je veća kod žena, nego muškaraca i uvelike veća među neplodnim ženama i muškarcima. Vrlo česte su koinfekcije s drugim spolno prenosivim patogenima, najčešće s *C. trachomatis*. U Hrvatskoj je niska prevalencija bakterije *M. genitalium* među niskorizičnom ženskom populacijom. Najčešće (gotovo 100 %) je detektirana kod žena koje su istodobne bile pozitivne na bakteriju *C. trachomatis* (4,8 %), *Ureaplasma* spp. (3,3 %) ili *M. hominis* (11 %) (9).



Slika 3. Prevalencija rezistencije na azitromicin (%)

(<https://diagnostics.roche.com/global/en/article-listing/health-topics/infectious-diseases/mycoplasma-genitalium.html>)

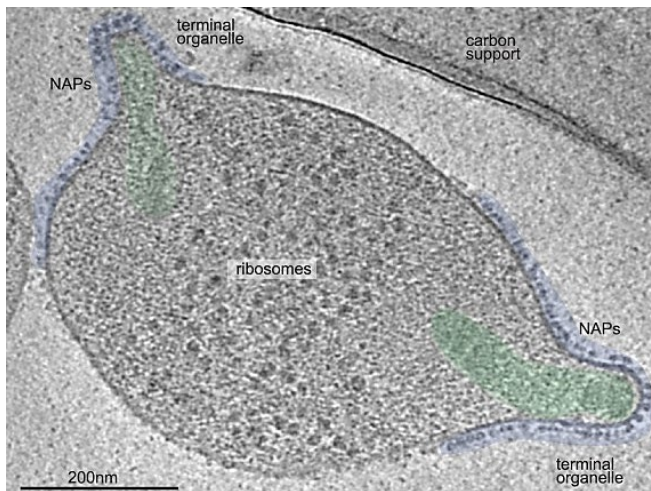
1.5. Patogeneza bakterije *Mycoplasma genitalium*

Mycoplasma genitalium je prvenstveno patogena za ljude te kao takva primarno uzrokuje infekcije urogenitalnog sustava. Najvećim dijelom je specifična za domaćina i tkivo. Uzrokuje infekcije najčešće kroničnog tijeka čemu pridonosi njihova osobina fakultativnog unutarstaničnog patogena. Posjeduju sposobnost preživljavanja i unutarstanično te kao unutarstanični paraziti mogu obitavati unutar epitelnih stanica i izvanstanično kao površinski paraziti na sluznicama koji se mogu vezati uz mucin (1, 4).

Najvažnije svojstvo patogenosti bakterije *Mycoplasma genitalium* je sposobnost adhezije. Adhezija je posredovana adhezинима jer mikoplazme nemaju staničnu stjenku ni pripadajuće strukture kao što su pili ili fimbrije (1). Ona uzrokuje upalu u urogenitalnom traktu tako što adherira na epitelne stanice domaćina i posljedično dovodi do aktivacije kemokina i drugih proupalnih signala što rezultira regrutacijom leukocita na mjesto infekcije (10). Svojim toksinima i raznim štetnim produktima metabolizma uzrokuje oštećenje tkiva domaćina, odnosno izravnu citotoksičnost stvaranjem štetnih metabolita kao što su superoksidni radikali i vodikov peroksid. Adhezija prije same infekcije dovodi i do kolonizacije (1). Adhezini su membranske bjelančevine koje omogućavaju prijanjanje na ciljne epitelne stanice domaćina te su neophodni za svojstvo infektivnosti. Glavni adhezijski protein bakterije *Mycoplasma genitalium* i najvažniji protein vanjske membrane je MgPa koji ima ključnu ulogu u adheziji i invaziji bakterije na stanice domaćina. Osobe inficirane bakterijom *M. genitalium* razvijaju specifična antitijela protiv membranskih proteina, prvenstveno MgpB i MgpC (6). Iako patogeneza bakterije *Mycoplasma genitalium*, odnosno patogeni mehanizmi u infekciji kao i mehanizmi preživljavanja bakterije u domaćinu nisu u potpunosti jasni, dokazano je da se za posredovanje adhezije koriste stanični receptori kao što su H2B i ciklofilin A (CyPA). H2B je otkriven u ljudskim urotelnim stanicama, SV-HUC-1, a CyPA je također smješten na staničnim membranama SV-HUC-1. CypA u interakciji s MgPa posreduje u adheziji i invaziji bakterije u stanice domaćina potičući ekspresiju proteina, transkripciju s translacijom i posljedično proliferaciju stanica. Također, bakterija na površini plazma membrane sadrži adhezijski kompleks, NAP, kojeg sačinjavaju proteini P110 i P140. Osim za adheziju, kompleks je neophodan i za pokretljivost organizma (11).

Još jedna značajka bakterije *Mycoplasma genitalium* potrebna za adheziju, ali i za pokretljivost, patogenost bakterije i staničnu diobu je terminalna organela. Ona je zajednička svim bakterijama iz roda *Mycoplasma*, a razlikuju se po svojim morfološkim obilježjima. Sastavljena je od složenog niza proteina koji sadrži sedam bjelančevina te bazalne strukture. Površinski

adhezijski proteini, MgpB i MgpC, omogućavaju vezanje za eukariotske stanice te pokretljivost, dok bazalna struktura osigurava energiju potrebnu za pokretljivost (12).



Slika 4. Tomogram stanice bakterije *M. genitalium*: dvije terminalne organele i NAP kompleksi (<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/mmi.13743>)

Osim navedenih svojstava, njihovoj patogenosti pridonosi i svojstvo klizajućeg motiliteta koji potiče njihovu kolonizaciju sluznica, ali i prolazak kroz cervikalnu sluz. Također, *Mycoplasma genitalium* može izbjeći imunski sustav domaćina te migrirati u stanicu i dugo perzistirati na sluznici inficiranog domaćina. Izvanredna sposobnost izbjegavanja imunskog odgovora domaćina je uzrok kroničnih urogenitalnih infekcija, unatoč proizvodnji upalnih medijatora, indukciji protutijela i infiltraciji neutrofila. Tome pridonosi i svojstvo antigene varijabilnosti, odnosno učestale promjene genotipa i antigenske izmjene u sastavu površinskih bjelančevina koja osigurava njihovu fenotipsku promjenjivost i raznovrsnost (1, 3). Dvije su vrste varijacije gena u *M. genitalium*: antigenska varijacija koja rezultira ekspresijom MgpB i MgpC varijanti s različitim sekvencama aminokiselina i fazna varijacija tijekom koje stanice gube sposobnost vezanja na crvena krvna zrnca (hemadsorpcija). (6) Tim mehanizmima dovode do apoptoze i citolize, a u stanicama mogu potaknuti fuziju i djelovati onkogeno. (1) *Mycoplasma genitalium* igra veliku ulogu u aktivaciji imunskog sustava potičući aktivnost i snažne proupalne odgovore mononukleara, prvenstveno makrofaga, produkciju citokina te kemotaksiju. U trajno inficiranih žena, neutrofilni su istaknuta komponenta proupalnog odgovora (4, 6).

Životni ciklus bakterije *M. genitalium* unutar reproduktivnog sustava je nepoznat, kao i mehanizmi njene invazije (6).

1.6. Faktori rizika za infekciju bakterijom *Mycoplasma genitalium*

Glavni faktori rizika za prijenos i zarazu bakterijom *Mycoplasma genitalium* su:

- Visokorizično spolno ponašanje koje uključuje više seksualnih partnera, odnosno njihovo često mijenjanje, nekorištenje zaštite (prezervativa) tijekom spolnog odnosa i rano stupanje u seksualne odnose
- Prethodna povijest spolno prenosivih bolesti
- Koinfekcija s drugim patogenim mikroorganizmima (*Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* i *Trichomonas vaginalis*)
- Bakterijska vaginoza
- Nizak socio – ekonomski status (siromaštvo, manje obrazovanje...)
- Muškarci i žene mlađi od 30 godina
 - Prvenstveno žene i adolescenti
- Crna rasa
- Homoseksualci
- Prostitucija
- HIV pacijenti

1.7. Klinička slika infekcija uzrokovanih bakterijom *Mycoplasma genitalium*

Bakterija *Mycoplasma genitalium* je spolno prenosivi patogen koji uzrokuje spolno prenosivu infekciju čije su kliničke manifestacije slične onima kod gonoreje i klamidije. Infekcije su često asimptomatske te se mogu pojaviti izolirano ili istodobno s drugim spolno prenosivim patogenima (3). Infekcije mikoplazmama su česte, a bakterija se prenosi izravnim kontaktom sluznice. Simptomatske infekcije kod muškaraca najčešće uključuju uretralni iscjedak i disuriju, dok kod žena prevladava izmijenjen ili pojačan vaginalni iscjedak i simptomi zdjelične upalne bolesti kao što su dispareunija i bol u donjem dijelu trbuha, a povremeno se javlja međumenstrualno krvarenje ili menoragija. Rektalne infekcije koje uključuju proktitis, odnosno upalu rektalne sluznice obično su asimptomatske (13).

Općenito, **nekomplikirana infekcija** mikoplazmom očituje se:

- Uretritisom
- Proktitisom
- Cervicitisom

Ukoliko se infekcija pravovremeno ne otkrije i ne liječi, razvija se **komplikirana infekcija** koja dovodi do puno ozbiljnijih tegoba i manifestira se kompleksnim stanjima kao što su:

- Zdjelična upalna bolest (endometritis, salpingitis)
- Prijevremeni porod
- Spontani pobačaj
- Neplodnost
- Ektopična trudnoća
- Spolno stečeni reaktivni artritis (SARA)
- Epididimitis (13)

Tablica 2. Najčešća patološka stanja povezana s *Mycoplasma genitalium* u muškaraca i žena

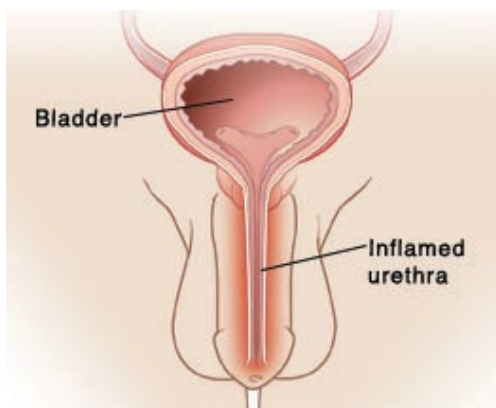
| Muškarci | Žene |
|--------------|---|
| Uretritis | Cervicitis |
| Proktitis | Zdjelična upalna bolest ili PID |
| Epididimitis | Prijevremeni porođaj ili spontani pobačaj |
| Neplodnost | Sterilitet |

Urethritis

Mycoplasma genitalium smatra se glavnim uzročnikom negonokoknog uretritisa (NGU) na svijetu (nakon klamidije) te je prvi put detektirana u muškarca s NGU (2, 12).

Urethritis je upala mokraćne cijevi, odnosno uretre uzrokovana bakterijama, virusima ili gljivama. Javlja se češće kod žena zbog kraće uretre koja kao takva olakšava prodor bakterija. Spolno prenosivi patogeni, poput mikoplazme, tijekom spolnog odnosa sa zaraženom osobom dopiju u penis ili rodnicu od kuda se šire i u uretru. Simptomi uretritisa obuhvaćaju gnojni ili sluzavi iscjedak iz spolovila, disuriju, odnosno bolno i nekontrolirano mokrenje sa stalno prisutnim nagonom za mokrenjem i nelagodom u uretri. Infekcija kod muškaraca najčešće je asimptomatska, a nepoznato je koliko dugo takva infekcija traje ako se ne liječi ni kakve su posljedice, odnosno koliki je rizik od razvoja bolesti ukoliko se pravovremeno ne tretira. Razdoblje inkubacije za negonokokni urethritis uzrokovan mikoplazmom je nepoznato, no dulje nego za klamidijски urethritis, s obzirom da je replikacija *M. genitalium* relativno spora u usporedbi s klamidijom. Produljeno vrijeme inkubacije se procjenjuje na ≥ 60 dana. *Mycoplasma genitalium* je povezana s perzistentnim i rekurentnim uretritisom. U prosjeku je ovom bakterijom uzrokovano 10 – 30% negonokoknog uretritisa, 20 – 25% neklamidijskog NGU i 40% perzistentnog ili rekurentnog uretritisa (14, 15).

Dijagnoza uretritisa potvrđuje se mikroskopski. U razmazu uretralnog sekreta obojenog po Gramu utvrđuje se broj polimorfonuklearnih leukocita (PMNL). Više od 5 PMNL u vidnom polju ukazuje na upalu. Veliki uspjeh ostvaren je uvođenjem molekularne dijagnostike kojom je moguće detektirati najčešće uzročnike uretritisa: *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis* i *M. genitalium*, pomoću PCR – a iz prvog mlaza urina ili obriska uretre (3, 15).



Slika 5. Urethritis

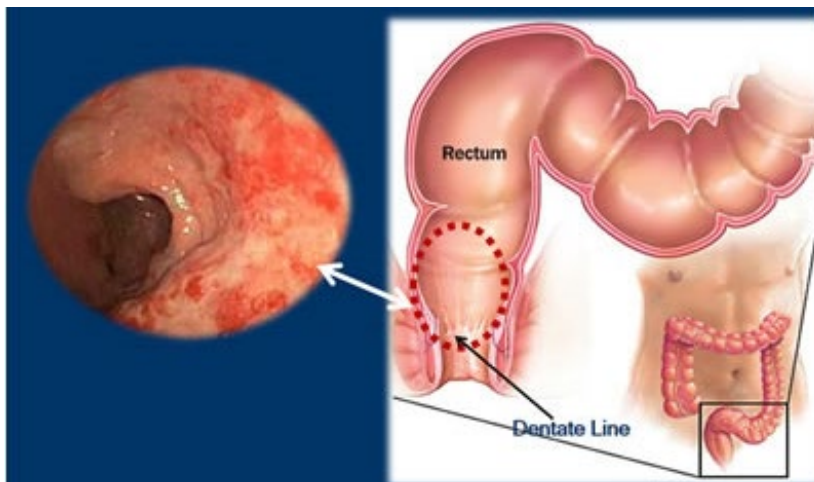
(<https://demo.staywellhealthlibrary.com/Content/healthsheets-v1/urethritis-in-men/>)

Proktitis

Proktitis je upala rektalne sluznice koja se javlja kao posljedica infekcije, mehaničkog oštećenja, upalne crijevne bolesti ili spolno prenosivih bolesti.

Simptomi proktitisa su sluzavo–krvavi proljevi te rektalna nelagoda i bol. *Mycoplasma genitalium* je uzročnik spolno stečenog infektivnog proktitisa.

Najčešće se javlja kod homoseksualaca i znatno je češće otkrivena kod HIV pozitivnih muškaraca. Uz to, pokazalo se da rektalne infekcije uzrokovane spolno prenosivim patogenima povećavaju rizik za prijenos HIV-a zbog privlačenja stanica osjetljivih na HIV na sluznicu rektuma (16). Također, *M. genitalium* je češće otkrivena kod homoseksualaca sa simptomatskim proktitisom jer je tada veće bakterijsko opterećenje, za razliku od onih s asimptomatskom infekcijom. Učestalost rektalne infekcije uzrokovane bakterijom *M. genitalium* je 1% – 26% među homoseksualcima, dok je kod žena zastupljenost oko 3% (15, 17).



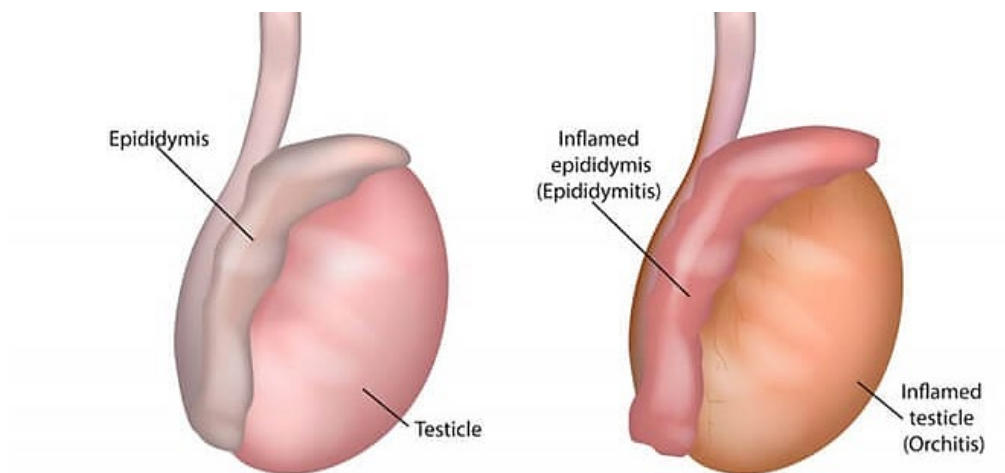
Slika 6. Proktitis

(<https://www.educationaldimensions.com/eLearn/gaveandrp/proctitis.php>)

Epididimitis

Epididimitis je upala pasjemenika, odnosno epididimisa čija je funkcija pohrana zrelih spermija proizvedenih u testisima. Za vrijeme ejakulacije, spermiji se kroz cijev pasjemenika transportiraju u sjemenovod.

Epididimitis se najčešće razvija kao komplikacija neliječene spolno prenosive infekcije ili neliječenog uretritisa i može dovesti do neplodnosti ukoliko dođe do razvoja ožiljnog tkiva. Javlja se otekline, crvenilo, a epididimis postaje tvrd, uvećan i izrazito bolan na dodir.



Slika 7. Epididimitis

<https://krenizdravo.dnevnik.hr/zdravlje/musko-zdravlje/bolesti-testisa-koje-su-najcesce/attachment/epididimitis-2>

Cervicitis

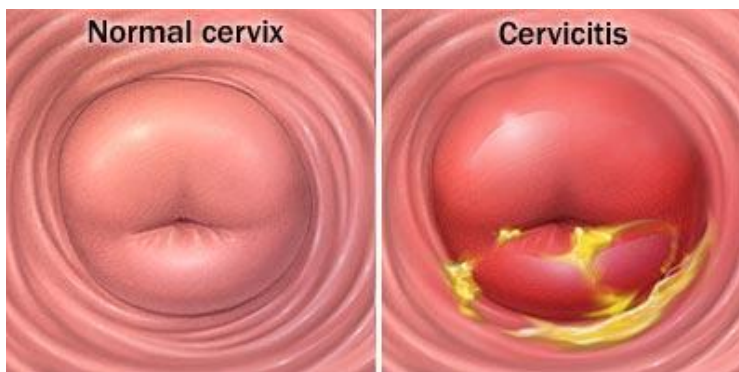
Cervicitis je upala cerviksa ili vrata maternice. Najčešći simptomi cervicitisa su abnormalni sluzavo – gnojni vaginalni iscjedak, krhkost cerviksa koji dovodi do krvarenja između menstruacija ili nakon endocervikalnog uzorkovanja te bol i krvarenje tijekom spolnog odnosa. Iako takva upala može biti uzrokovana iritacijom od tuširanja ili tampona, najčešći uzrok cervicitisa su spolno prenosive infekcije i visokorizično seksualno ponašanje. Važna barijera za mnoge bakterije je cervikalna sluz budući da posjeduje mnoštvo protuupalnih stanica i protutijela, a luče je žlijezde cerviksa. Ukoliko se ona poremeti, olakšava se prodor raznih bakterija i virusa (1, 18).

Mycoplasma genitalium je čest uzročnik asimptomatskog i mukopurulentnog cervicitisa. Žene s infekcijom imaju čak tri puta više vaginalnih i cervikalnih leukocita nego žene bez infekcije. Za razliku od infekcija drugim spolno prenosivim bakterijama, kod *M. genitalium* je prisutan najveći omjer leukocita i epitelnih stanica (18).

M. genitalium može se detektirati kod 10 – 30 % žena s mukopurulentnim cervicitisom. Mukopurulentni cervicitis je akutna, gnojna upala cerviksa uz kojeg se često javlja endometritis. Ukoliko se ne liječi, može dovesti do nastanka zdjelične upalne bolesti (15).

Dijagnostički kriteriji za mukopurulentni cervicitis su:

- Fizički pregled pri kojem se uočava mukopurulentni iscjedak u endocervikalnom kanalu, edematozni i eritematozni cerviks, prolaskom pamučnog štapića kroz cervikalnu os lako se izaziva endocervikalno krvarenje
- Pozitivni *swab – test*: prisutan gnojni eksudat na uzetom endocervikalnom brisu
- > 10 PMNL po vidnom polju u endocervikalnom obrisku obojenom po Gramu



Slika 8. Cervicitis

(<https://www.drveber.com/ginekologija/patologija-grlica-materice/cervicitis-upala-grlica-materice/>)

Također, i nisko opterećenje organizma bakterijom *Mycoplasma genitalium* može izazvati kroničnu upalu donjeg genitalnog trakta, točnije dugotrajnu infekciju u epitelnim stanicama endocerviksa što dovodi do povećanog izlučivanja proupalnih citokina (19).

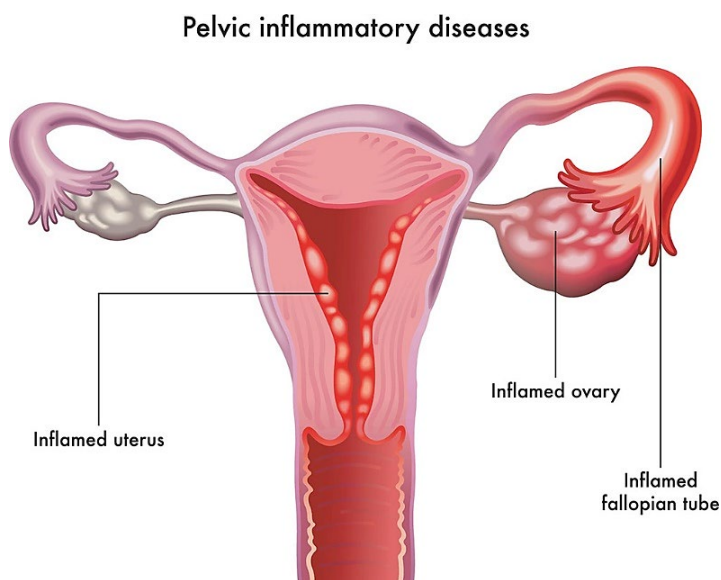
Zdjelična upalna bolest (PID, engl. *Pelvic Inflammatory Disease*)

Zdjelična upalna bolest je upala gornjeg dijela ženskog reproduktivnog sustava koja zbog svojih ozbiljnih posljedica predstavlja bitan javnozdravstveni problem. Osim kronične zdjelične boli, smatra se najčešćim uzrokom ektopične, odnosno izvanmaternične trudnoće i neplodnosti. Upalna bolest zdjelice može zahvatiti jajnike, jajovode, peritoneum male zdjelice i endometrij te se manifestira različitim patološkim stanjima kao što su endometritis, salpingitis, mukopurulentni cervicitis, parametritis, pelveoperitonitis te tuboovarijski apsces. Nastaje ascenzijom, odnosno ascendentnim širenjem infekcije iz donjeg dijela mokraćno – spolnog sustava, rodnice i cerviksa, u gornji reproduktivni sustav, maternicu i jajovode. PID se smatra najozbiljnijom komplikacijom spolno prenosivih infekcija, a najčešći uzročnici su *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* i *M. genitalium*. Najčešće se radi o polimikrobnom procesu, odnosno u patogenezi sudjeluje više različitih mikroorganizama. Uloga genitalnih mikoplazmi kao primarnih patogena nije sa sigurnošću utvrđena. *M. genitalium* se općenito češće detektira u cerviksu ili endometriju žena s PID-om, nego u žena bez PID-a. Prevalencija *M. genitalium* među ženama s PID-om kreće se od 4% do 22%, a značajno je povezana s cervicitisom kojeg se smatra čestim prethodnikom PID-a te postabortalnim PID-om (15, 20).

Nadalje, dokazano je da *M. genitalium* prijanja na ljudske spermatozoide i stoga se potencijalno može prenositi pokretnim spermijima do gornjeg genitalnog trakta žene (19). Dijagnozu PID-a nije lako postaviti, a glavni simptomi su vaginalni sekret i krvarenje, bol u donjem dijelu trbuha, bolna osjetljivost uterusa i cerviksa, povišeni CRP i sedimentacija eritrocita, povišena tjelesna temperatura > 38 °C, leukocitoza, pozitivan nalaz na CT ili NG, apsces zdjelice... (20).

Tablica 3. Metode za dijagnostiku PID-a (20)

| Metoda | Pozitivan nalaz PID-a |
|---|---|
| Mikroskopski pregled vaginalnog sekreta | > 3 PMNL na velikom povećanju |
| Cervikalni obrisci na spolno prenosive mikroorganizme | Dokazana prisutnost spolno prenosivih patogena |
| Transvaginalni ultrazvuk | Dilatirana, zadebljana tuba Tuboovarijski apsces |
| Laparoskopija | Edem, eritem, mukopurulentni eksudat tube |
| Biopsija endometrija | Histopatološka dijagnoza endometritisa |



Slika 9. Zdjelična upalna bolest (PID)

(<https://www.healthdirect.gov.au/pelvic-inflammatory-disease>)

Neploidnost

Razne spolno prenosive infekcije mogu rezultira neplodnošću kod muškaraca i žena, a ponekad mogu izazvati poremećaj implantacije embrija u uterusu što može dovesti do pobačaja. Smatra se da je *Mycoplasma genitalium* jedna od glavnih uzročnika neplodnosti, a njena prevalencija u neplodnih parova procjenjuje se od 39 % do 85 %. To dokazuje i činjenica da je detektirana njena prisutnost među svakim petim neplodnim parom, a učestalost neplodnosti je 1,5 puta veća kod crnaca, nego kod bijelaca (3, 15). Infekcija mikoplazmom utječe na oblik, broj, sazrijevanje i pokretljivost spermija. Inficirane stanice mogu izazvati blokadu sperme u muškom spolnom sustavu što može rezultirati kod izvantjelesne oplodnje prestankom prijenosa sperme ili smanjenom pokretljivošću spermija. Također, prisutnost bakterije *M. genitalium* u ejakulatu povezana je s abnormalnom morfologijom i niskom koncentracijom spermija jer se bakterije i njihovi toksini vežu na spermu u svim područjima mokraćno – spolnog sustava i uzrokuju oštećenje spermatozoida. Osim toga, spermiji prisutni u inficiranom ejakulatu mogu kontaminirati jajašca ili embrij (21). Pacijenti s tubarnim faktorom neplodnosti često imaju povišena protutijela na *M. genitalium*, u oko 25 % slučajeva, što dokazuje da je visok postotak neplodnih žena zaražen upravo ovom bakterijom. *M. genitalium* oštećuje cilijarne stanice jajovoda što rezultira trajnim upalnim promjenama te zatvaranjem jajovoda (1).

Trudnoća

Mycoplasma genitalium se često povezuje s nepovoljnim ishodima trudnoće, iako je ta povezanost još uvijek nedovoljno istražena. Dokazana je povezanost infekcije s prijevremenim porodom i spontanom pobačajem, a u nekim istraživanjima infekcija mikoplazmom u trudnoći može rezultirati prijevremenim pucanjem vodenjaka, niskom porođajnom težinom novorođenčeta, čak i perinatalnom smrću (22).

1.8. Dijagnostika infekcija uzrokovanih bakterijom *Mycoplasma genitalium*

Dijagnozu infekcije uzrokovane bakterijom *Mycoplasma genitalium* nije uvijek jednostavno postaviti s obzirom da se često radi o asimptomatskim slučajevima. Potrebna je temeljita anamneza i klinički pregled za postavljanje sigurne dijagnoze (simptomi poput uretritisa, cervicitisa, PID-a, itd.). Općenito, simptomatske infekcije lakše je dijagnosticirati jer u pravilu takvi pacijenti imaju veći broj bakterija, za razliku od asimptomatskih infekcija. Za mikrobiološku dijagnostiku važno je uzeti dostatnu količinu uzorka s adekvatnog anatomskog mjesta, odnosno mjesta koje predstavlja područje akutne infekcije. Bakteriološke uzorke potrebno je uzeti što ranije nakon početka infekcije, a svakako prije primjene antimikrobne terapije. O kvaliteti uzoraka ovisi i pouzdanost rezultata mikrobioloških pretraga. Uzorke je potrebno dostaviti u laboratorij unutar 2 sata (na sobnoj temperaturi) ili se pohranjuju ne dulje od 24 sata u transportnoj podlozi. Takvi se uzorci dobiveni iz spolnog sustava za dijagnostiku spolnih patogena ne stavljaju u hladnjak (23).

Veliki problem u dijagnostici *M. genitalium* predstavlja nedostatak komercijalno dostupnih dijagnostičkih testova pa to ograničava rutinsko testiranje (4).

Nadalje, s obzirom da mikoplazme nemaju staničnu stjenku, ne boje se po Gramu pa ih se ne može mikroskopirati. Kulturom ju je gotovo nemoguće dokazati. *Mycoplasma genitalium* se detektira isključivo molekularnim metodama kojima se dokazuje nukleinska kiselina bakterije u uzorku. Za njenu detekciju primjenjuju se NAAT testovi (engl. *Nucleic Acid Amplification Tests*) koji se zasnivaju na umnažanju, odnosno amplifikaciji nukleinskih kiselina (1). NAAT testovi su visoke osjetljivosti i specifičnosti, brzi su i potpuno automatizirani što uvelike smanjuje mogućnost kontaminacije.

Još jedan problem u dijagnostici mikoplazme predstavlja česta antimikrobna rezistencija te je u većini slučajeva potrebno molekularnom metodom testirati i DNK bakterije i prisutnost rezistencije, odnosno otpornosti na makrolide, točnije azitromicin (24).

1.9. Liječenje infekcija uzrokovanih bakterijom *Mycoplasma genitalium*

Mycoplasma genitalium je bakterija koja prvenstveno zbog svoje strukturne karakteristike tj. nepostojanja stanične stijenke predstavlja problem u liječenju. Osim toga, visoka je stopa razvoja antimikrobne rezistencije, odnosno otpornosti bakterije na antimikrobne lijekove, stoga je liječenje infekcija uzrokovanih bakterijom *Mycoplasma genitalium* ograničeno na sve manji broj terapijskih alternativa (12).

Mycoplasma genitalium je otporna na antibiotike koji djeluju kao inhibitori sinteze stanične stijenke bakterija (β – laktamski antibiotici i cefalosporini) jer ove bakterije nemaju staničnu stijenku. Manja je rezistencija na tetracikline i makrolide te se oni najčešće koriste za liječenje infekcija uzrokovanih mikoplazmama.

Kao prvi izbor liječenja nekomplikiranih infekcija uzrokovanih bakterijom *Mycoplasma genitalium* koriste se makrolidi, najčešće azitromicin. Tetraciklini se koriste kao alternativa u liječenju infekcija ženskog i muškog spolnog sustava, prvenstveno doksiciklin. Razlog tome je slabija učinkovitost doksiciklina u odnosu na azitromicin. Široka upotreba makrolida za liječenje raznih spolno prenosivih infekcija (uključujući gonoreju i klamidiju) povećala je širenje antimikrobne rezistencije na ovu skupinu antibiotika (1). Doksiciklin je bakteriostatski antibiotik koji inhibira sintezu proteina vežući se za ribosomalnu podjedinicu 30S.

Za liječenje spolnih infekcija dozira se 100 mg doksiciklina dva puta dnevno u trajanju od 2 tjedna. Kod liječenja infekcija uzrokovanih mikoplazmom doksiciklin je pokazao slabiju učinkovitost i nisku stopu izlječenja od 30 % do 40 % u odnosu na azitromicin čijim djelovanjem stopa izlječenja raste na približno 85 % (24, 25).

U liječenju nekomplikirane infekcije uzrokovane *M. genitalium* dozira se jednokratno 1 g azitromicina peroralnim putem ili produžena doza gdje se prvog dana dozira 500 mg azitromicina, a potom 250 mg kroz sljedeća 4 dana što je i primarni terapijski izbor u liječenju ove infekcije (1, 24). Azitromicin je moguće primjenjivati tijekom trudnoće, za razliku od drugih antimikrobnih lijekova koji su kontraindicirani u trudnoći (24, 25).

Za liječenje se sve više preporučuje dvostupanjski terapijski pristup u kojem se kao inicijalna empirijska terapija daje doksiciklin, a zatim visoke doze azitromicina. S obzirom da doksiciklin smanjuje bakterijsko opterećenje organizma te olakšava njegovo čišćenje, može pospješiti liječenje infekcije ukoliko ga slijedi azitromicin kojeg je potrebno primijeniti odmah nakon zadnje doze doksiciklina (24).

U mnogim zemljama, rezistencija na makrolide premašuje 50 %, a razlog te otpornosti su mutacije jednog nukleotida u 23S rRNK. Dokazano je da veliku rezistenciju na makrolide razvijaju homoseksualci. Stopa rezistencije na makrolide je značajno veća među zemljama zapadnog Pacifika i Amerike, nego u Europi. Na primjer, u Skandinaviji je dokazana rezistencija na makrolide u 41,1 % urogenitalnih uzoraka, u Španjolskoj u 20 % uzoraka, dok je u Ujedinjenom Kraljevstvu ta brojka prešla 82 % (12).

U slučaju pojave rezistencije na makrolide ili neuspješnog liječenja tom vrstom antibiotika, koristi se moksifloksacin. Uporabi moksifloksacina prethodi 7 – dnevna terapija doksiciklinom te se na taj način optimizira antimikrobna učinkovitost, odnosno kontrolira širenje rezistencije na antibiotike, prvenstveno makrolide i fluorokinolone (24). Moksifloksacin pripada skupini fluorokinolona četvrte generacije koji se smatraju antibioticima širokog spektra te se kao takvi koriste u liječenju raznih infekcija, prvenstveno onih uzrokovanih gram pozitivnim bakterijama. Glavni mehanizam djelovanja fluorokinolona je inhibicija DNK giraze sastavljene od GyrA i GyrB podjedinica te topoizomeraze IV sastavljene od ParC i ParE podjedinica. Rezistenciju na fluorokinolone određuju mutacije u genima GyrA i ParC (12). Moksifloksacin od 400 mg dozira se oralno jednom dnevno tijekom 7 – 14 dana za liječenje kompliciranih infekcija uzrokovanih mikoplazmama koje obuhvaćaju epididimitis i zdjeličnu upalnu bolest (24, 25).

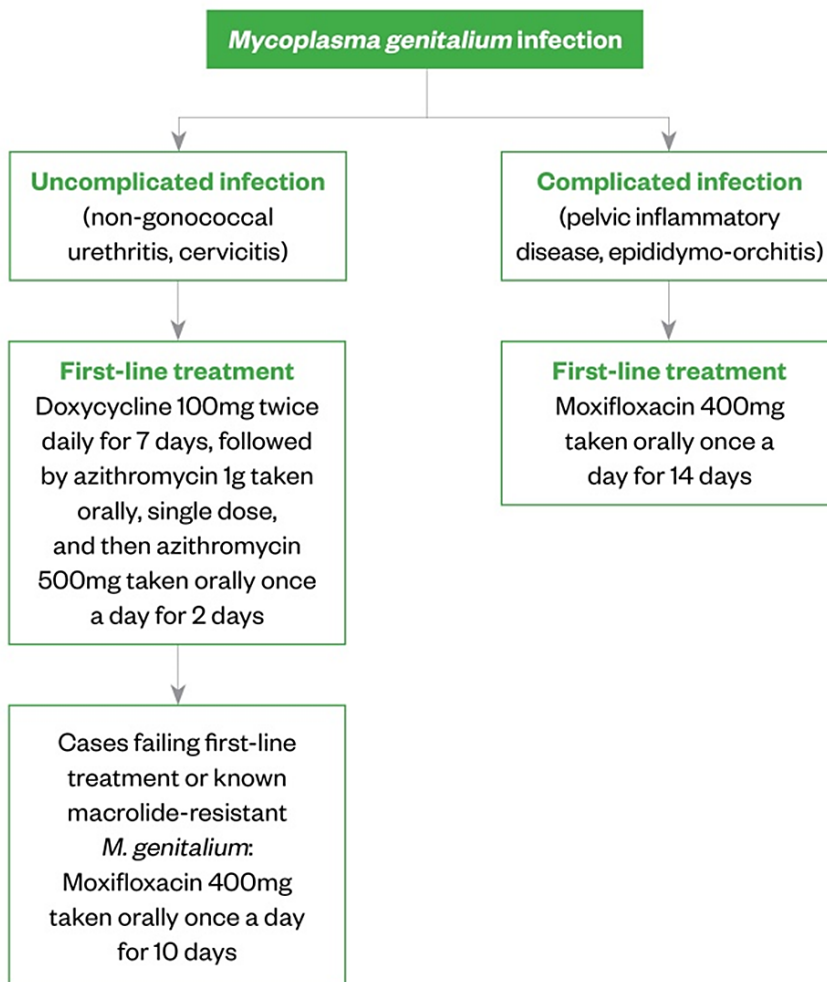
Veliki problem u infekciji bakterijom *Mycoplasma genitalium* predstavlja česta pojava istodobne rezistencije na više lijekova. Tome svjedoči činjenica da je rezistencija na kinolone, iako rijetka, povezana s rezistencijom na makrolide ostavljajući tako sve manje dostupnih mogućnosti liječenja (12, 24, 25).

Ukoliko infekcija perzistira i nakon korištenja navedenih antimikrobnih lijekova prve i druge linije, preporuča se pristinamicin koji ima uspjeh izlječenja od 90 %. Dozira se oralno četiri puta na dan tijekom 14 dana samo u maksimalnoj dozi od 1 g (24).

Zbog visoke učestalosti antimikrobne rezistencije, u svih bolesnika potrebno je napraviti test izlječenja ili TOC (engl. *test of cure*). Po nekim smjernicama TOC se ne preporuča provoditi kod asimptomatskih osoba, no mnogi pacijenti nakon antimikrobne terapije, iako bez simptoma, predstavljaju rizik od prijenosa infekcije i širenja rezistencije. U većine pacijenata koji reagiraju na terapiju, bakterija *Mycoplasma genitalium* bit će nedetektabilna već unutar jednog tjedna, no problem predstavlja i mogućnost pojave lažno negativnih rezultata u

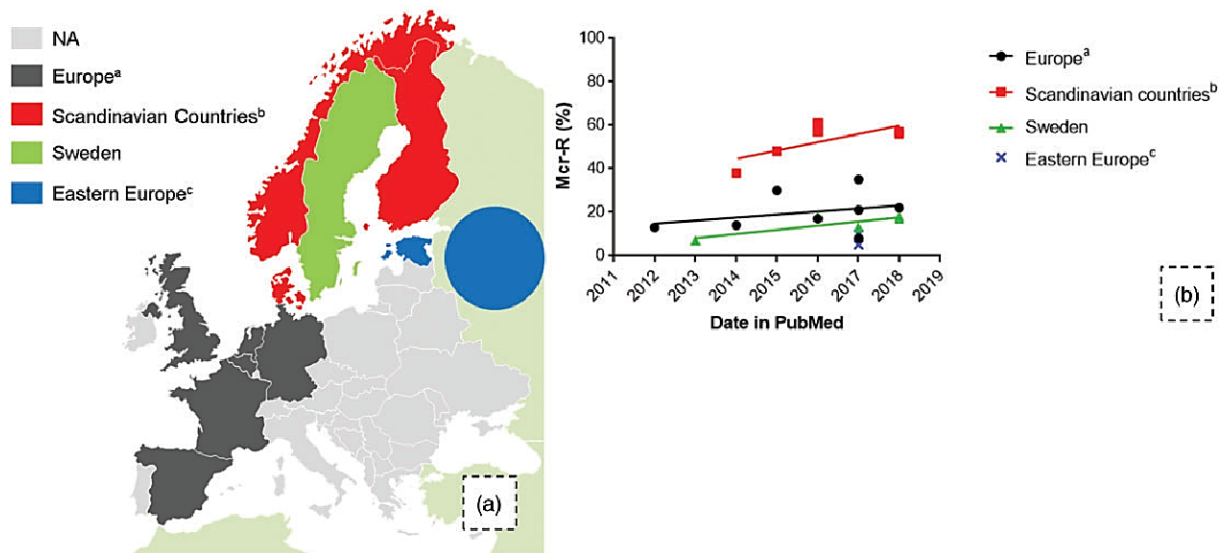
neizliječenih bolesnika. Uzorci za test izlječenja se uzimaju preporučeno tri tjedna nakon završetka terapije (24).

Kao kod svih spolno prenosivih bolesti, bitno je istodobno liječiti i partnere zaraženih osoba bez obzira imaju li simptome infekcije ili ne jer mikoplazme brzo mutiraju i ne stvara se trajna imunost nakon preboljenja. U tom slučaju, ne treba ih testirati prije davanja antibiotika, nego odmah primijeniti istu terapiju kojoj je podvrgnuta zaražena osoba. Osim upotrebe antibiotika, bitnu ulogu u liječenju infekcije uzrokovane bakterijom *Mycoplasma genitalium* ima i imunološki sustav čija je uloga obrana stanica i regeneracija inficiranog epitela. Tijekom liječenja, preporučuje se apstiniranje od spolnih odnosa ili korištenje prezervativa kako bi se spriječile reinfekcije.



Slika 10. Smjernice za liječenje infekcija uzrokovanih bakterijom *Mycoplasma genitalium*

(<https://pharmaceutical-journal.com/article/ld/antibiotic-treatment-of-mycoplasma-genitalium-infection>)



Slika 11. Porast antimikrobne rezistencije na makrolide u svijetu

(<https://www.semanticscholar.org/paper/Mycoplasma-genitalium-and-antimicrobial-resistanceFern%C3%A1ndezHuertaBarber%C3%A1/5e6cfe33f56ded549746f695fcb040653ac5c377>)

1.10. Prevencija infekcija uzrokovanih bakterijom *Mycoplasma genitalium*

Mycoplasma genitalium je bakterija koja se prenosi spolnim putem te rizično spolno ponašanje povećava mogućnost za zarazu. Vrlo bitno je educirati ljude, posebice mlade osobe o seksualnom ponašanju s obzirom da se povećan rizik od spolno prenosivih infekcija javlja kod osoba koje često mijenjaju spolne partnere i rano stupaju u spolne odnose. Kao za sve spolno prenosive bolesti, glavni način suzbijanja širenja infekcije uzrokovane mikoplazmom je upotreba prezervativa tijekom spolnog odnosa. Osim sprječavanja kolonizacije mikoplazmama, vrlo bitno je održavati vaginalni ekosustav u ravnoteži te pH vagine i nastojati izbjeći sve što ga narušava i dovodi do infekcije.

2. CILJ RADA

Rad je pripremljen u Nastavnom zavodu za javno zdravstvo Splitsko – dalmatinske županije u Laboratoriju za molekularnu dijagnostiku i dijagnostiku infekcija spolnoga sustava.

Ciljevi rada su bili:

- teoretski prikazati karakteristike bakterije *Mycoplasma genitalium*, njezinu morfologiju i patogenezu
- objasniti kliničku sliku i epidemiologiju infekcija uzrokovanih bakterijom *M. genitalium* te mikrobiološke testove za njenu dijagnostiku
- razjasniti ograničeno liječenje nekompliciranih i kompliciranih infekcija uzrokovanih *M. genitalium* te ukazati na moguću prevenciju od zaraze ovom bakterijom kako bi se spriječile moguće komplikacije koje ona može uzrokovati
- opisati metode uzimanja uzoraka za molekularnu dijagnostiku bakterije *Mycoplasma genitalium*
- detaljno opisati molekularnu metodu za dijagnostiku bakterije *M. genitalium*
- objasniti interpretaciju i značenje nalaza bakterije *M. genitalium*

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Vrste uzoraka za dijagnostiku bakterije *M. genitalium*

Sumnja na bakteriju *M. genitalium* indicirana je kod žena s visokorizičnim spolnim ponašanjem i prisutnim simptomima mukopurulentnog cervicitisa, vaginalnog iscjetka, intramenstrualnog krvarenja i krvarenja nakon spolnog odnosa te prisutne zdjelične upalne bolesti. Kod muškaraca je testiranje preporučeno kod prisutnih simptoma uretritisa i disurije, odnosno bolnog i otežanog mokrenja (24). Najvažnije je testirati simptomatske osobe na bakteriju *M. genitalium* kod kojih nisu identificirani drugi spolno prenosivi uzročnici, poput *C. trachomatis* i *N. gonorrhoeae*.

Za dijagnostiku bakterije *M. genitalium* koriste se sljedeći uzorci:

- Kod žena **obrisak cerviksa** koji uzorkuje ginekolog prema uputama za uzorkovanje, u ginekološkim ordinacijama.
- Kod muškaraca **obrisak uretre** koji se uzorkuje u ambulanti Nastavnog zavoda za javno zdravstvo.
- **Prvi mlaz urina** u oba spola. (26)

3.2. Postupak uzimanja uzorka

Za dijagnostiku uzročnika koji se nalaze epitelularno, važna je kvaliteta uzorka jer je cilj sakupiti dovoljnu količinu potrebnih epitelnih stanica. Shodno tomu, optimalniji uzorak za dijagnostiku je obrisak uretre i cerviksa, nego prvi mlaz urina. Uzorak je nužno adekvatno transportirati, pod određenom temperaturom i u što kraćem vremenskom intervalu kako bi se postigla ciljana visoka kvaliteta uzorka. Osjetljivost povećava i kombinacija više uzoraka. Za uzorkovanje te transport uzorka koristi se odgovarajući transportni medij, **PCR Female Swab Kit (Roche)** ili **PreservCyt Solution (ThinPrep Solution)** (26).

Set za uzorkovanje obriska cerviksa ili uretre sadrži 2 brisa:

- Bris za odstranjivanje sluznog čepa iz cerviksa ili uretre
- Sterilni bris za uzorkovanje obriska cerviksa ili uretre



Slika 12. PCR Female Swab Kit

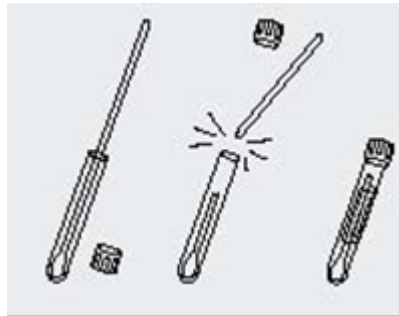
(<https://www.dufortlavigne.com/en/pharmacy/produit/BOE05170516190>)

Uzorkovanje obriska cerviksa

Prije uzorkovanja obriska cerviksa korištenjem spekuluma, nužno je odstraniti sluz iz cerviksa brisom kojeg treba baciti. Potom se sterilni bris uvuče 1 – 1,5 cm u endocervikalni kanal. Bris je kod ovakvih uzročnika potrebno rotirati 15 – 30 sekundi nastojeći tako sakupiti dovoljno epitelnih stanica jer se *M. genitalium* nalazi intracelularno, odnosno epicelularno. Nakon što se bris izvuče bez doticanja vaginalnog zida, potrebno ga je uroniti u dno transportne epruvete za genitalne mikoplazme, odlomiti štap brisa ostavljajući tako bris u epruveti koja se potom zatvori, pravilno identificira i transportira u mikrobiološki laboratorij. Na temperaturi 2 – 30 °C uzorak je moguće čuvati do 6 mjeseci, a ukoliko se ne koristi transportna podloga za genitalne mikoplazme, uzorak je potrebno odmah dostaviti u laboratorij (26).



Slika 13. Uzimanje obriska cerviksa



Slika 14. Pohrana brisa u transportnoj epruveti

(Upute NZJZ za uzimanje uzoraka za otkrivanje *Mycoplasma genitalium*)

Uzorkovanje obriska uretre

Prije uzorkovanja obriska uretre ne smije se mokriti najmanje 1 – 2 sata kako bi se prikupilo dovoljno potrebnih stanica za dijagnostiku. Ukoliko je prisutan iscjedak nužno ga je odstraniti. Savitljivi bris je potrebno uvući 2 do 4 cm u uretru te ga rotirati 2 – 3 sekunde da bi se sakupilo što više potrebnih epitelnih stanica. Potom se bris stavlja u odgovarajući transportni medij i transportira u mikrobiološki laboratorij. Takvi uzorci se mogu čuvati i transportirati na 2 – 30 °C do 6 mjeseci. Optimalno je inokuliranu podlogu transportirati u laboratorij za 5 h od uzimanja obriska ili 48 h ukoliko se pohranjuje na 2 – 8 °C (26).



Slika 15. Uzorkovanje obriska uretre

(Upute NZJZ za uzimanje uzoraka za otkrivanje *Mycoplasma genitalium*)

Uzimanje uzorka urina

Pacijent ne smije mokriti najmanje 1 – 2 h prije uzorkovanja. Za dijagnostiku spolno prenosivih bakterija, poput *M. genitalium*, potrebno je sakupiti oko 20 ml prvog mlaza urina. Urin se sakuplja u sterilnu plastičnu posudu bez konzervansa te ga je potrebno što prije transportirati u laboratorij na sobnoj temperaturi (26).



Slika 16. Uzorak urina

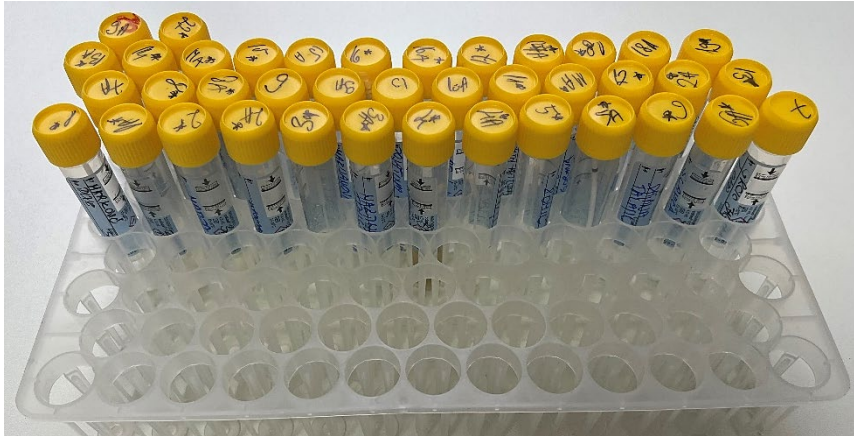
(Upute NZJZ za uzimanje uzoraka)

3.3. Metode dijagnostike bakterije *M. genitalium*

Mycoplasma genitalium je spororastuća bakterija koju je iznimno teško kultivirati iz uzorka pacijenta, stoga dijagnoza ove bakterije zahtijeva metode visoke osjetljivosti i specifičnosti. Budući da je uzgoj, odnosno kultivacija *M. genitalium* dugotrajan i spor postupak te može potrajati i do 6 mjeseci prije nego li se dobije izolat, stanična kultura se ne koristi kao rutinska dijagnostička metoda kao ni serološki testovi poput imunofluorescencije, imunoblot-a i enzimskih imunotestova jer do danas nijedan od navedenih seroloških testova za identifikaciju *M. genitalium* nije standardiziran ili komercijaliziran. Za detekciju bakterijskog opterećenja *M. genitalium* u uzorcima pacijenata kao jedina pogodna dijagnostička metoda koristi se metoda amplifikacije nukleinskih kiselina kao što je kvantitativni PCR u stvarnom vremenu (*real time* PCR). NAAT testovi za detekciju *M. genitalium* prvi put su korišteni 1991. godine i do danas su ostali zlatni standard dijagnostike infekcija uzrokovanih ovim patogenom. Osim što je kultivacija dugotrajan proces, NAAT testovi su puno osjetljiviji i specifičniji od staničnih kultura, a priprema uzoraka, kao i sam postupak, je brža i jednostavnija. Osim toga, PCR ima minimalan rizik od kontaminacije i povećava vjerodostojnost dobivenih rezultata. Uvođenje molekularnih metoda, točnije PCR-a za dijagnostiku *M. genitalium* predstavlja značajan uspjeh u dijagnostici jer pravovremenim prepoznavanjem i liječenjem infekcije uzrokovane ovom bakterijom sprječavaju se komplikacije koje mogu ostaviti trajne i dugoročne posljedice na zdravlje reproduktivnog sustava (15).

3.3.1. Molekularna dijagnostika bakterije *Mycoplasma genitalium*

Svi uzorci potrebni za dijagnostiku bakterije *M. genitalium* dolaze u posebnom transportnom mediju za genitalne mikoplazme – *PCR Female Swab Kit (Roche)*. Taj se medij koristi i za pohranu uzoraka namijenjenih za dijagnostiku bakterije *C. trachomatis*.




Slika 17. Zaprimljeni uzorci za dijagnostiku *M. genitalium*

(Nastavni zavod za javno zdravstvo, Split)

Na početku svake dijagnostike, najvažnija je pravilna identifikacija pacijenata i zaprimljenih uzoraka. Nepravilna ili nepotpuna identifikacija je jedna od najčešćih predanalitičkih pogrešaka. Prilikom zaprimanja uzoraka na šalteru svaki pacijent dobije svoj identifikacijski broj te se ispisuju radne liste (Slika 18.). Najčešći zaprimljeni uzorci su obrisci cerviksa i uretre, a rjeđe prvi mlaz urina zbog manje osjetljivosti metode.

str. 1/1 OBR
ORIGINAL

M 30.07.1958
Uzimanje uzorka: **24.06.2022 08:54** Prijem: 24.06.2022 08:56
90001442 Ordinacija DZ Splitsko-Dalmatinske županije na lokaciji DZ Split -opće
medicine
7769881 ANA VUČKOVIĆ VUKUŠIĆ
Dg: N49 Upalni poremećaji muških genitalnih organa, nesvrstani drugamo
Bris uretre na Chlamydia, Ureaplasma, Mycoplasma
MG 2202378
bris uretre - PCR na *Mycoplasma genitalium*
Prijem: MARTA URLIĆ


M. genitalium

Slika 18. Primjer radne liste za pretragu na bakteriju *M. genitalium*

(Nastavni zavod za javno zdravstvo, Split)

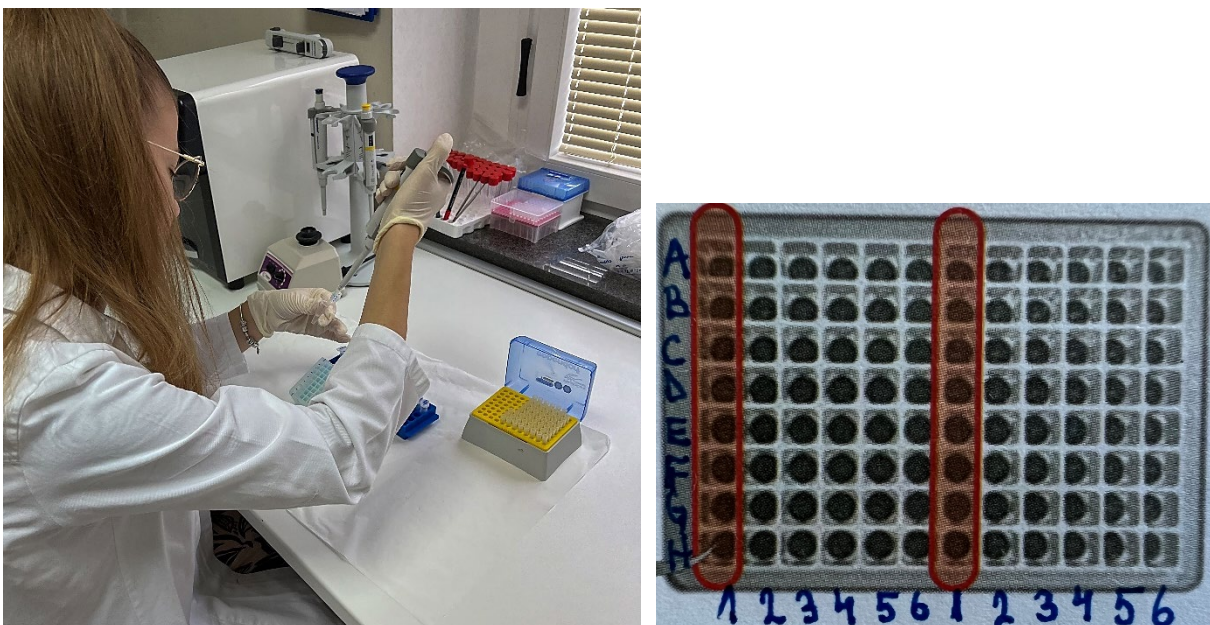
Za dijagnostiku *M. genitalium* radi se *pool* 4 uzorka. To znači da se 4 uzorka od različitih pacijenata kombiniraju u jedan skupni uzorak. Rezultat toga je značajna ušteda troškova bez značajnog smanjenja osjetljivosti. Ukoliko je *pool* pozitivan, ne mora značiti da su svi uzorci u *pool* – u pozitivni, stoga je potom potrebno svaki od njih zasebno testirati.



Slika 19. *Pool* 4 uzorka

(Nastavni zavod za javno zdravstvo, Split)

U prvu i sedmu poziciju na pločici se dodaje 200 μ L uzorka iz *pool*-a (Slika 20). Nakon toga, uzorke je potrebno ekstrahirati pomoću automatskog ekstraktora kako bi se u zadnjim jažicama (u šestoj i dvanaestoj poziciji na pločici) dobila čista, izolirana DNK potrebna za PCR reakciju. S obzirom da se uzorci pooliraju i odvajaju u dvije pozicije na pločici (ukupno 16), potrebno je sakupiti 64 uzorka za dijagnostiku *M. genitalium* molekularnom metodom.



Slika 20. Dodavanje 200 μ L uzorka iz *pool*-a u jažice pločice

(Nastavni zavod za javno zdravstvo, Split)

Ekstrakcija

Dijagnostika bakterije *M. genitalium* započinje postupkom ekstrakcije nukleinske kiseline. Ekstrakcija je proces pročišćavanja, odnosno izolacije DNK ili RNA. Ekstrahirana nukleinska kiselina visoke je čistoće i stabilnosti te se može koristiti dalje u PCR reakciji. Dok automatizacija nije zaživjela, izolacija se radila ručno što je puno dugotrajniji proces. Za ekstrakciju nukleinske kiseline bakterije *M. genitalium* koristi se automatski ekstraktor (GeneRotex 96) koji omogućuje ekstrakciju NK iz ljudskih uzoraka pomoću magnetskih kuglica. (27)



Slika 21. Automatski ekstraktor nukleinske kiseline (GeneRotex 96)

(Nastavni zavod za javno zdravstvo, Split)

Prije umetanja pločice s uzorcima u ekstraktor, potrebno je umetnuti nastavke u jažice koji omogućavaju pomicanje magnetskih kuglica adsorbiranih s nukleinskim kiselinama u ostale jažice sve dok se ne dobije eluat. (Slika 22.)

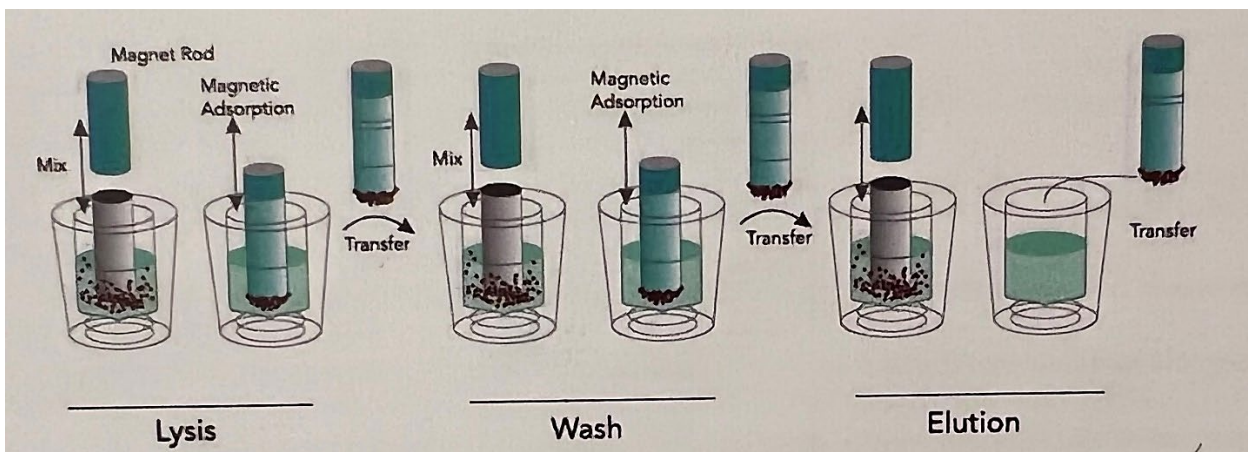


Slika 22. Nastavci za pomicanje magnetskih kuglica adsorbiranih s NK

(Nastavni zavod za javno zdravstvo, Split)

Prije dobivanja ekstrahirane NK uzorci prolaze kroz nekoliko procesa:

- Stanična liza
- Adsorpcija NK
- Ispiranje
- Eluiranje



Slika 23. Shema rada automatiziranog ekstraktora nukleinskih kiselina

(Protokol za ekstrakciju DNK ili RNK, Tianlong)

Osim navedenog, prednosti automatskog ekstraktora su:

- Visoka automatizacija
- Jednostavnost rada
- Brzina ekstrakcije
- Stabilni i pouzdani rezultati (varijacije su svedene na minimum)

Automatski ekstraktor nukleinskih kiselina može simultano obraditi čak 96 uzoraka. Također, ima sposobnost ekstrahiranja > 100 kopija/mL nukleinske kiseline. Vrijeme potrebno za dobivanje pročišćene nukleinske kiseline pomoću automatskog ekstraktora je 15 minuta. Nakon svakog korištenja, nužno je unutrašnjost ekstraktora prebrisati sa 75%-tnim etanolom te dezinficirati UV svjetlom 15 minuta. (27)

Metoda amplifikacije nukleinskih kiselina

Komplet s reagensima potrebnima za amplifikaciju DNK bakterije *M. genitalium* korištenjem Cobas z480 analizatora je **LightMix Kit Mycoplasma Genitalium**.

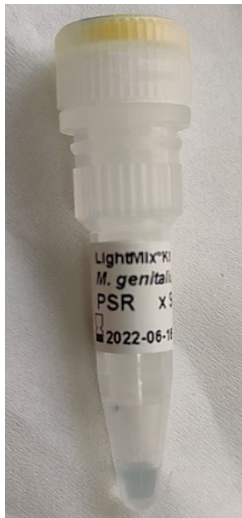


Slika 24. LightMix Kit *Mycoplasma Genitalium*

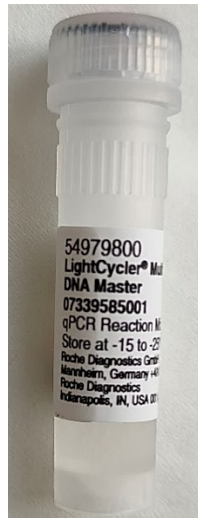
(Nastavni zavod za javno zdravstvo, Split)

Sastoji se od sljedećih reagenasa:

- PSR (engl. Parameter – Specific Reagents) tj. liofilizirana mješavina svih početnica i proba za pokretanje 96 reakcija
- LightCycler Multiplex DNA Master
- PCR-grade water (za pripremu otopina koje se koriste)
- Pozitivna kontrola (liofilizirana)
- Negativna kontrola



Slika 25. PSR



Slika 26. DNA Master



Slika 27. Pozitivna kontrola

(Nastavni zavod za javno zdravstvo, Split)

Ovi reagensi detektiraju 10 ekvivalentnih kopija genoma (DNK) bakterije *M. genitalium*. Preferirana mjesta za detekciju *M. genitalium* su 16S RNA, adhezin MgPa ili *gap* geni. Najčešće se 73 bp ili 224 bp dugi fragment gena *gap* (fragment gena za gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenazu) amplificira sa specifičnim početnicama i detektira s fluorescentno obilježenom probom. Komplet (engl. *kit*) se čuva 1 godinu nakon proizvodnje, zaštićen od svjetla na sobnoj temperaturi. Liofilizirani reagensi se ne zamrzavaju, a otopljeni reagensi su stabilni 2 tjedna ako su pohranjeni na tamnom i u hladnjaku (2 – 8 °C). (28)

Za izradu reakcijske smjese, odnosno master mix-a potrebna je voda (PCR-grade water), PSR i Roche DNA Master. Master mix je nužan sastojak za real – time PCR reakcije. Potom se dodaje 15 µL izmiješanog master mix-a i 5 µL uzoraka (čistih eluata) za konačni reakcijski volumen (20 µL). Taj je proces također automatiziran. Aparat Myra omogućuje automatsko dodavanje reakcijske smjese (Master Mix) izoliranoj DNK. Robotska ruka sama uzima

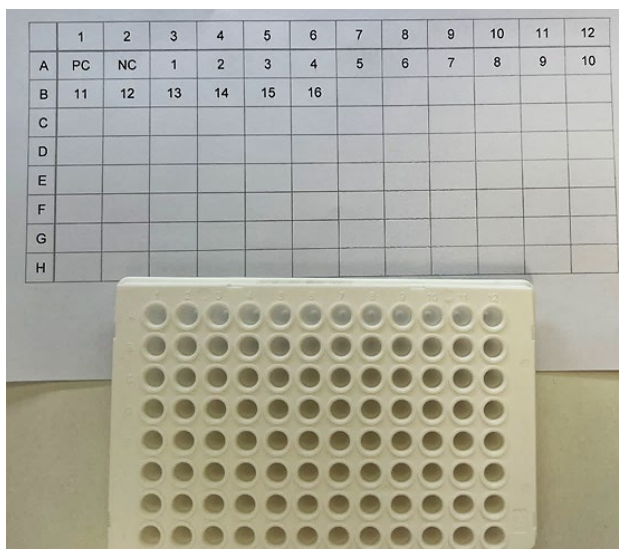
nastavke i raspoređuje uzorke. Isto tako, potrebno je pozitivnu kontrolu, negativnu kontrolu i master mix staviti na točno određene pozicije u aparat.



Slika 28. Myra uređaj za automatsko pipetiranje

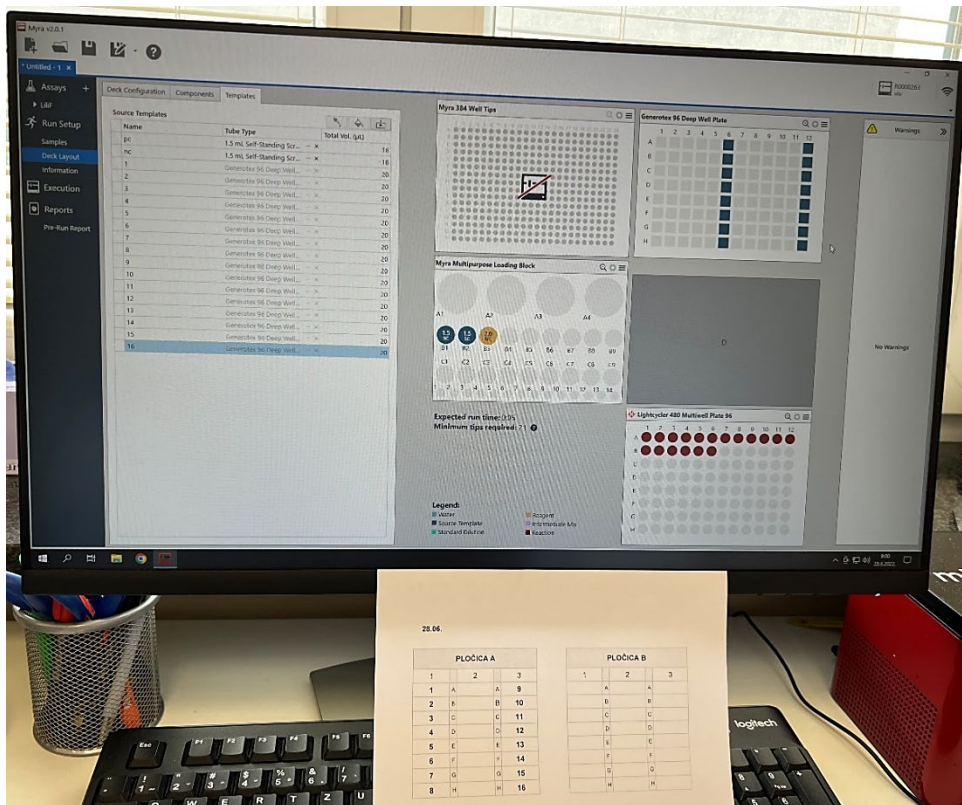
(Nastavni zavod za javno zdravstvo, Split)

Ključno je na računalu programirati taj proces kako aparat ne bi krivi uzorak nakapao u krivu jažicu.



Slika 29. Shema za programiranje procesa automatskog pipetiranja

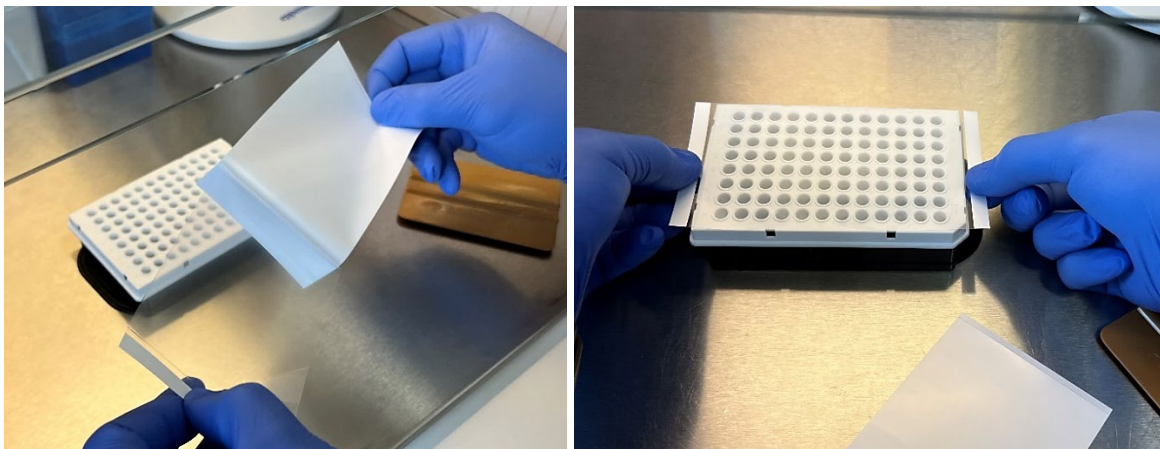
(Nastavni zavod za javno zdravstvo, Split)



Slika 30. Programiranje uređaja Myra za automatsko pipetiranje

(Nastavni zavod za javno zdravstvo, Split)

Nakon pipetiranja svih potrebnih reagensa i uzoraka u mikrotitarsku pločicu, potrebno ju je prije umetanja u Cobas z480 analizator zatvoriti samoljepljivom folijom. Na taj se način sprječava isparavanje uzoraka pri visokim temperaturama.



Slika 31. Zatvaranje mikrotitarske pločice samoljepljivom folijom

(Nastavni zavod za javno zdravstvo, Split)

Nakon zatvaranja mikrotitarske pločice, može se staviti u analizator i započeti proces amplifikacije.



Slika 32. Umetanje mikrotitarske pločice u Cobas z480 analizator

(Nastavni zavod za javno zdravstvo, Split)

Sustav **Cobas 4800** omogućuje najpouzdanije i najbrže kvalitativno *in vitro* NAAT testiranje za detekciju CT/NG i HPV u kliničkim uzorcima te HPV genotipizaciju. Također, omogućuje potpuno automatiziran proces izolacije nukleinske kiseline iz epruveta s uzorcima, postavljanje PCR reakcije i *real – time* PCR. *Real – time* PCR mjeri količinu nukleinske kiseline (DNA/RNA) u uzorcima u stvarnom vremenu. (29)

Glavne karakteristike Cobas 4800 sustava su:

- Potpuno integrirana priprema uzoraka
- Amplifikacija i detekcija korištenjem *real – time* PCR metode
- Više vrsta uzoraka
- Više testova u jednom kompletu

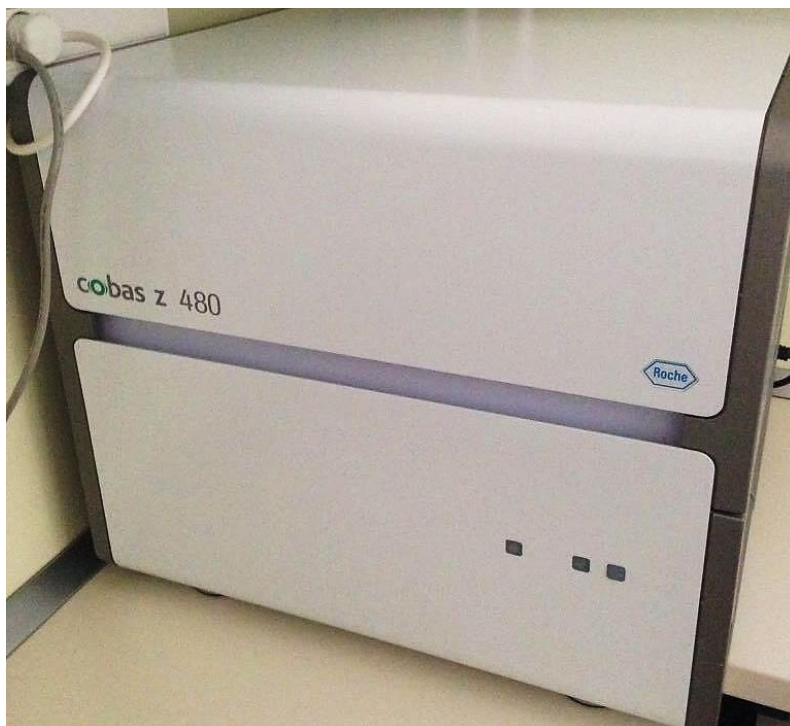
Tri su komponente Cobas 4800 (Roche) sustava:

- Računalo
- Cobas x480 uređaj
- Cobas z480 analizator

Softver omogućuje korisniku uvid u čitav proces od pripreme uzoraka i detekcije do interpretacije rezultata.

Cobas x480 uređaj priprema uzorke. Postupak pripreme uzoraka pomoću ovog uređaja obuhvaća generičko vezanje, ispiranje, eluiranje, pripremu master mix-a, podešavanje PCR-a.

Za amplifikaciju i detekciju DNK bakterije *Mycoplasma genitalium* koristi se Cobas z480 analizator, odnosno PCR termoblok. Može postojati kao komponenta Cobas 4800 sustava ili kao samostalni uređaj. Namijenjen je za *in vitro* dijagnostiku i služi kao sustav za probir. Omogućava izvođenje visoko osjetljive i specifične *real – time* PCR amplifikacije i detekcije raznih patogena iz ljudskih uzoraka. Naime, PCR reakcija obuhvaća tri koraka kroz koja Cobas z480 analizator umnožava ciljnu sekvencu DNK izvođenjem točnih i preciznih promjena temperature. Brz i precizan termalni ciklus osiguran je automatiziranom *real – time* PCR tehnologijom koja optimizira prijenos topline osiguravajući tako maksimalnu ujednačenost te ponovljivost. Također, analizator korištenjem fluorescentnog signala detektira umnožene nukleinske kiseline. Prihvaća pločice s 96 jažica i ima 6 optičkih kanala za detekciju. Napredna *real – time* PCR tehnologija osigurava visokokvalitetne, pouzdane rezultate, a moguće varijacije i artefakti su svedeni na minimum. Osim toga, točne i precizne rezultate omogućava mehanizam automatske provjere istih uz potvrdu dosljednosti PCR krivulje. Cijeli proces amplifikacije i detekcije na Cobas z480 analizatoru je automatiziran. Manualno se izvodi samo stavljanje i vađenje mikrotitarskih pločica u uređaj. Proces traje 1h i 15 minuta. (29)



Slika 33. Cobas z480 analizator za PCR dijagnostiku

(Nastavni zavod za javno zdravstvo, Split)

Princip PCR reakcije:

PCR (engl. *Polymerase Chain Reaction*), odnosno lančana reakcija polimerazom je molekularna metoda *in vitro* replikacije, tj. umnožavanja molekule DNK. PCR osigurava eksponencijalno umnažanje produkta. Tim se postupkom mala količina DNA predložka, odnosno kratki fragment DNK (obično do 1000 bp) replicira u velik broj identičnih kopija koje su dostatne za dijagnostičku detekciju. Jedna kopija nukleinske kiseline umnaža se 10^7 ili više kopija unutar relativno kratkog perioda. PCR metodu prvi je opisao Kary Mullis 1983. godine na primjeru *E. coli*, a do danas ima vodeću ulogu u dijagnostici. Umnažanje DNK molekule putem PCR reakcije bazira se na hibridizaciji oligonukleotidnih početnica (engl. *primer*) i *in vitro* sintezi velikog broj kopija željenog fragmenta DNK obilježenog početnicama. Početnice su jednolančani oligonukleotidni lanci koji služe kao početna točka za sintezu DNK. Duljine su oko 20 do 30 bp te su komplementarne krajevima DNK sekvence koju umnažamo. Dostupnost različitih podataka o brojnim sekvencama gena omogućuje dizajniranje početnica specifičnih za brojne patogene i njihove gene. Početnice pokreću serije reakcija pomoću DNK polimeraze. DNK polimeraza je enzim koji vrši sintezu novog, komplementarnog lanca. Potječe iz

termofilne bakterije *Thermus aquaticus*. Dužina sintetiziranog dijela, odnosno fragmenta DNK molekule odgovara veličini koju omeđuju oligonukleotidne početnice. (30)

Broj ciklusa može biti varijabilan (25 – 35 ciklusa), a ovisi o:

- Količini početnog predloška
- Količini željenog produkta

Ukoliko je početna količina predloška manja od 10 kopija, bit će potrebno i do 40 ciklusa za dostatnu količinu produkta.

Svaki se ciklus sastoji od tri faze PCR reakcije:

1) Denaturacija DNK (engl. *denaturation*)

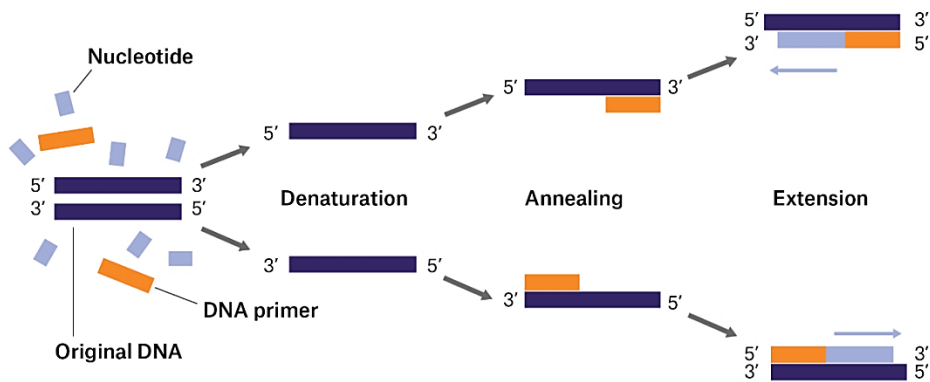
Razdvajanje dvolančane molekule DNK zagrijavanjem na 94 °C pri čemu nastaje jednolančana DNK. Svaki lanac služi kao kalup za amplifikaciju, odnosno sintezu novog komplementarnog lanca. Faza traje jednu minutu.

2) Vezanje početnica (engl. *Annealing*)

Sparivanje, odnosno hibridizacija početnica s komplementarnim fragmentima DNK pri temperaturi 50 – 56 °C. Kad se početnice pomiješaju s denaturiranom DNK, jedna se početnica spaja na specifično mjesto na jednom kraju ciljne sekvence jednog lanca, a druga se početnica spaja na specifično mjesto na suprotnom kraju drugog, komplementarnog lanca. (30) Dužim oligonukleotidnim početnicama potrebno je više vremena za vezanje na komplementarne lance DNK. Faza traje 45 sekundi.

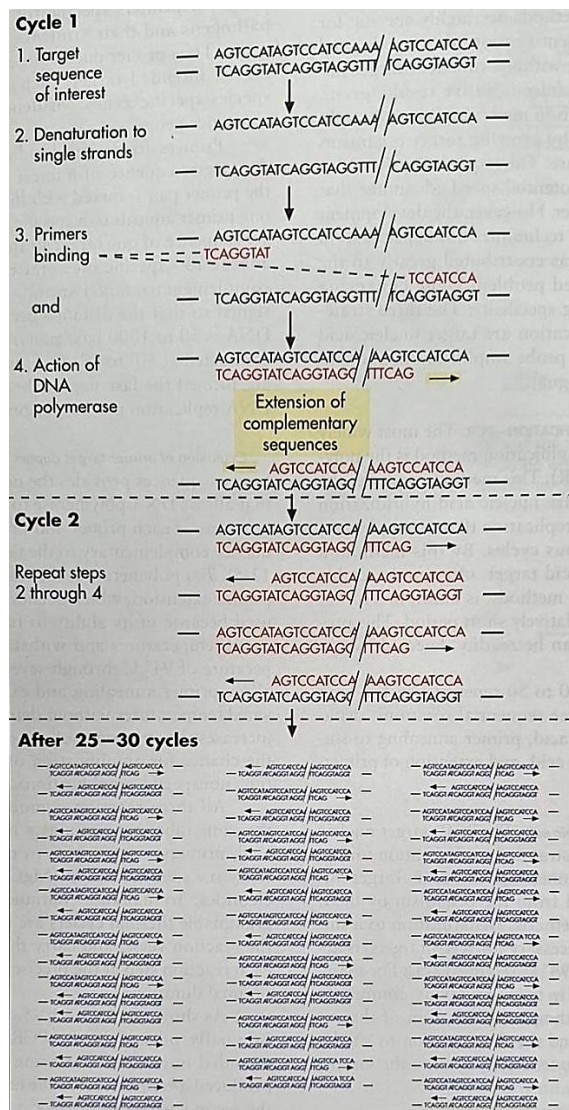
3) Produljenje lanca (engl. *extension*)

Sinteza novog lanca komplementarnog DNA regiji omeđenoj početnicama pomoću termostabilne DNA polimeraze na temperaturi od 72 °C. Taq polimeraza optimalno radi na 72 °C kada doseže maksimum aktivnosti, stoga na ovoj temperaturi započinje polimerizaciju. Trajanje ove faze je 2 minute.



Slika 34. Princip rada PCR-a

(<https://blog.labtag.com/a-brief-history-of-pcr-and-its-derivatives/>)



Slika 35. Prikaz eksponencijalnog umnažanja sekvence DNK molekule tijekom PCR reakcije

(Sarah J. Pitt, Clinical Microbiology for Diagnostic Laboratory Scientists)

5. ZAKLJUČAK

Mycoplasma genitalium je samoreplicirajuća bakterija s najmanjim poznatim genomom. Nema staničnu stjenku pa se ne boji po Gramu. Prenosi se spolnim putem pa primarno uzrokuje infekcije spolnog sustava kao fakultativni unutarstanični patogen. Smatra se glavnim uzročnikom negonokoknog uretritisa kod muškaraca te cervicitisa i steriliteta kod žena, najčešće mladih od 25 godina. Infekcije su često asimptomatske, a ukoliko se pravovremeno ne liječe, mogu rezultirati razvojem komplikacija (neplodnost, zdjelična upalna bolest, prijevremeni porođaj...) i ostaviti trajne posljedice na zdravlje urogenitalnog sustava. Ključno je pravodobno otkrivanje infekcije i pravovremeno liječenje, kao i provođenje mjera prevencije, odnosno edukacija adolescenata o posljedicama visokorizičnog seksualnog ponašanja. Veliki problem predstavlja česta antimikrobna rezistencija, odnosno otpornost bakterije *M. genitalium* na antimikrobne lijekove, kao i česta pojava istodobne rezistencije na više lijekova. Za mikrobiološku dijagnostiku bakterije *M. genitalium* najvažnije je pravilno uzeti uzroke, s adekvatnog mjesta i u dostatnoj količini, odnosno s dovoljnom količinom epitelnih stanica. Obrisak uretre i cerviksa su optimalniji i kvalitetniji uzorci zbog veće osjetljivosti, nego prvi mlaz urina. *M. genitalium* se ne može kultivirati, nego se dokazuje isključivo molekularnom PCR metodom. Cobas z480 analizator omogućuje umnažanje i detekciju DNK bakterije *M. genitalium* korištenjem *real – time* PCR metode te na taj način može otkriti vrlo malu količinu *M. genitalium* u uzorku. Time je omogućeno rano otkrivanje bakterije u samom početku infekcije, pravovremeno liječenje i sprječavanje razvoja komplikacija.

6. SAŽETAK

Mycoplasma genitalium je fakultativni unutarstanični patogen koji pomoću membranskih adhezina prijanja na sluznicu, odnosno ciljne epitelne stanice urogenitalnog sustava domaćina. Uzrokuje infekcije mokraćno-spolnog sustava (uretritis, cervicitis), a ukoliko se ne liječe, mogu rezultirati razvojem komplikacija (neplodnost, zdjelična upalna bolest, ektopična trudnoća, prijevremeni porođaj...). U najvećem broju slučajeva, infekcije su asimptomatske. Liječenje infekcija uzrokovanih *M. genitalium* je ograničeno na sve manji broj terapijskih alternativa zbog visoke stope razvoja rezistencije bakterije na antimikrobne lijekove te istodobne rezistencije na više lijekova. Prema smjernicama CDC-a, infekcija se liječi produženom dozom azitromicina gdje se prvog dana dozira 500 mg, a potom 250 mg kroz sljedeća 4 dana. Sve više se preporučuje i dvostupanjski terapijski pristup u kojem se kao inicijalna empirijska terapija daje doksiciklin, a zatim visoke doze azitromicina. Potrebno je istodobno liječiti i partnere zaraženih osoba istom terapijom, a u svih bolesnika potrebno je napraviti i test izlječenja zbog visoke stope razvoja antimikrobne rezistencije.

Infekcije uzrokovane *M. genitalium* smatraju se najčešćim spolno prenosivim bolestima (nakon klamidije i gonoreje). Vrlo česte su koinfekcije s drugim spolno prenosivim patogenima te je najčešće detektirana kod žena koje su istodobne pozitivne i na bakteriju *C. trachomatis*, *Ureaplasma* spp. ili *M. hominis*. *M. genitalium* se ne kultivira. Jedina pogodna dijagnostička metoda su molekularni testovi amplifikacije nukleinskih kiselina. Za dijagnostiku je bitno sakupiti dovoljno epitelnih stanica jer se *M. genitalium* nalazi epitelularno. Uzorci koji se koriste su obrisak cerviksa i uretre te prvi mlaz urina. Amplifikaciju i detekciju DNK bakterije omogućuje Cobas z480 analizator korištenjem visoko osjetljive i specifične PCR metode u stvarnom vremenu. Kompleti s reagensima za amplifikaciju DNK bakterije mogu detektirati 10 ekvivalentnih kopija genoma bakterije te omogućuju rano otkrivanje bakterije i sprječavaju razvoj kompliciranih infekcija. Zbog visoke učestalosti antimikrobne rezistencije, u većini slučajeva je potrebno molekularnom metodom testirati i DNK bakterije i prisutnost rezistencije. Prije amplifikacije, uzorci se stavljaju u uređaj za ekstrakciju kako bi se dobila pročišćena nukleinska kiselina za PCR metodu. Pozitivan nalaz pretrage na *M. genitalium* označava prisutnost DNK bakterije u testiranom uzorku, dok negativan nalaz označava da DNK bakterije nije detektirana u uzorku.

7. SUMMARY

Mycoplasma genitalium is a facultative intracellular pathogen that adheres to the mucous membrane, i.e. the target epithelial cells of the urogenital system of the host, using membrane adhesins. It causes infections of the urinary-genital system (urethritis, cervicitis), and if not treated, can result in the development of complications (infertility, pelvic inflammatory disease, ectopic pregnancy, premature birth...). In most cases, infections are asymptomatic. Treatment of infections caused by *M. genitalium* is limited to a decreasing number of therapeutic alternatives due to the high rate of development of bacterial resistance to antimicrobial drugs and simultaneous resistance to multiple drugs. According to CDC guidelines, the infection is treated with an extended dose of azithromycin where 500 mg is dosed on the first day and then 250 mg for the next 4 days. A two-stage therapeutic approach is increasingly recommended, in which doxycycline is given as initial empiric therapy, followed by high doses of azithromycin. It is necessary to simultaneously treat the partners of infected persons with the same therapy, and in all patients it is necessary to perform a cure test due to the high rate of development of antimicrobial resistance.

Infections caused by *M. genitalium* are considered the most common sexually transmitted diseases (after chlamydia and gonorrhea). Co-infections with other sexually transmitted pathogens are very common and are most often detected in women who are simultaneously positive for the bacteria *C. trachomatis*, *Ureaplasma* spp. or *M. hominis*. *M. genitalium* is not cultivated. The only suitable diagnostic method is molecular nucleic acid amplification tests. For diagnosis, it is important to collect enough epithelial cells because *M. genitalium* is found epicellularly. The samples used are cervical and urethral swabs and the first-void urine. Amplification and detection of bacterial DNA is enabled by the Cobas z480 analyzer using a highly sensitive and specific *real-time* PCR method. Kits with reagents for bacterial DNA amplification can detect 10 equivalent copies of the bacterial genome and enable early detection of bacteria and prevent the development of complicated infections. Due to the high frequency of antimicrobial resistance, in most cases it is necessary to test the DNA of the bacteria and the presence of resistance using a molecular method. Before amplification, samples are placed in an extraction device to obtain purified nucleic acid for the PCR method. A positive test result indicates the presence of bacterial DNA in the tested sample, while a negative result indicates that the bacterial DNA was not detected in the sample.

8. LITERATURA

1. Mimica M. Genitalne mikoplazme. U: Karelović D. i sur. Infekcije u ginekologiji i perinatologiji. Zagreb: Medicinska naklada; 2012, str. 413-17.
2. Razin S. Mycoplasmas. In: Baron S, editor. Medical Microbiology. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996. Chapter 37. *Mycoplasmas*
3. Smilja Kalenić i sur. Medicinska mikrobiologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2019, str. 310-14.
4. Jawetz, Melnick & Adelberg, Tonkić M., Dobec M., Abram M. Medicinska mikrobiologija. Placebo d.o.o., Split, 2015.
5. Clinical Laboratory Science: *Mycoplasma*. Dostupno na: <https://clinicalsci.info/mycoplasma/>
6. McGowin CL, Totten PA. The Unique Microbiology and Molecular Pathogenesis of *Mycoplasma genitalium*. J Infect Dis. 2017 Jul 15;216(suppl_2):S382-S388. doi: 10.1093/infdis/jix172. PMID: 28838077; PMCID: PMC5853509.
7. Baumann L, Cina M, Egli-Gany D, et al. Prevalence of *Mycoplasma genitalium* in different population groups: systematic review and meta-analysis. Sexually Transmitted Infections 2018;94:255-262.
8. Torrone EA, Kruszon-Moran D, Philips C, Morris MR, Bowden KE, Papp J, Bachmann LH, Weinstock H, Kersh EN. Prevalence of Urogenital *Mycoplasma genitalium* Infection, United States, 2017 to 2018. Sex Transm Dis. 2021 Nov 1;48(11):e160-e162. doi: 10.1097/OLQ.0000000000001394. PMID: 33560093.
9. Ljubin-Sternak S, Meštrović T, Kolarić B, Jarža-Davila N, Marijan T, Vraneš J. Assessing the Need for Routine Screening for *Mycoplasma genitalium* in the Low-risk Female Population: A Prevalence and Co-infection Study on Women from Croatia. Int J Prev Med. 2017 Jul 4;8:51. doi: 10.4103/ijpvm.IJPVM_309_16. PMID: 28757928; PMCID: PMC5516437.
10. Benedetti F, Curreli S, Zella D. Mycoplasmas-Host Interaction: Mechanisms of Inflammation and Association with Cellular Transformation. Microorganisms. 2020 Sep 4;8(9):1351. doi: 10.3390/microorganisms8091351. PMID: 32899663; PMCID: PMC7565387.
11. Liao Y, Deng X, Peng K, Dai P, Luo D, Liu P, Chen L, Li X, Ye Y, Zeng Y. Identification of histone H2B as a potential receptor for *Mycoplasma genitalium* protein

- of adhesion. *Pathog Dis.* 2021 Dec 1;79(7):ftab053. doi: 10.1093/femspd/ftab053. PMID: 34755841.
12. Gnanadurai R., Fifer H. *Mycoplasma genitalium*: A Review. 2019.
 13. Harish S. Sexually transmitted infection by *Mycoplasma genitalium*. A short review. *J Skin Seks Transm Dis* 2021;3(1):46-50.
 14. Horner PJ, Martin DH. *Mycoplasma genitalium* Infection in Men. *J Infect Dis.* 2017 Jul 15;216(suppl_2):S396-S405. doi: 10.1093/infdis/jix145. PMID: 28838074; PMCID: PMC5853510.
 15. Centar for Disease Control and Prevention, Sexually Transmitted Infections Treatment Guidelines, 2021: *Mycoplasma genitalium* (<https://www.cdc.gov/std/treatment-guidelines/mycoplasmagenitalium.htm>)
 16. Bissessor M, Tabrizi SN, Bradshaw CS, Fairley CK, Hocking JS, Garland SM, Twin J, Poljak M, Peel J, Chen MY. The contribution of *Mycoplasma genitalium* to the aetiology of sexually acquired infectious proctitis in men who have sex with men. *Clin Microbiol Infect.* 2016 Mar;22(3):260-5. doi: 10.1016/j.cmi.2015.11.016. Epub 2015 Dec 12. PMID: 26686807.
 17. Read TRH, Murray GL, Danielewski JA, Fairley CK, Doyle M, Worthington K, Su J, Mokany E, Tan LT, Lee D, Vodstrcil LA, Chow EPF, Garland SM, Chen MY, Bradshaw CS. Symptoms, Sites, and Significance of *Mycoplasma genitalium* in Men Who Have Sex with Men. *Emerg Infect Dis.* 2019 Apr;25(4):719-727. doi: 10.3201/eid2504.181258. PMID: 30882306; PMCID: PMC6433010.
 18. Dehon PM, McGowin CL. *Mycoplasma genitalium* infection is associated with microscopic signs of cervical inflammation in liquid cytology specimens. *J Clin Microbiol.* 2014 Jul;52(7):2398-405. doi: 10.1128/JCM.00159-14. Epub 2014 Apr 23. PMID: 24759719; PMCID: PMC4097708.
 19. McGowin CL, Annan RS, Quayle AJ, Greene SJ, Ma L, Mancuso MM, Adegboye D, Martin DH. Persistent *Mycoplasma genitalium* infection of human endocervical epithelial cells elicits chronic inflammatory cytokine secretion. *Infect Immun.* 2012 Nov;80(11):3842-9. doi: 10.1128/IAI.00819-12. Epub 2012 Aug 20. PMID: 22907815; PMCID: PMC3486055.
 20. Karelović D., Skerlev M. Zdjelična upalna bolest. U: Karelović D. i sur. Infekcije u ginekologiji i perinatologiji. Zagreb: Medicinska naklada; 2012, str. 234-40.
 21. Mohseni Moghadam N, Kheirkhah B, Mirshekari TR, Fasihi Harandi M, Tafsiri E. Isolation and molecular identification of *mycoplasma genitalium* from the secretion of

- genital tract in infertile male and female. Iran J Reprod Med. 2014 Sep;12(9):601-8. PMID: 25469132; PMCID: PMC4248144.
22. Frenzer C, Egli-Gany D, Vallely LM, Vallely AJ, Low N. Adverse pregnancy and perinatal outcomes associated with *Mycoplasma genitalium*: systematic review and meta-analysis. Sex Transm Infect. 2022 May;98(3):222-227. doi: 10.1136/sextrans-2021-055352. Epub 2022 Mar 29. PMID: 35351816; PMCID: PMC9016252.
 23. Tonkić M. Mikrobiološka dijagnostika infekcija u ginekologiji i perinatologiji. U: Karelović D. i sur. Infekcije u ginekologiji i perinatologiji. Zagreb: Medicinska naklada; 2012, str. 118-22
 24. Workowski KA, Bachmann LH, Chan PA, Johnston CM, Muzny CA, Park I, Reno H, Zenilman JM, Bolan GA. Sexually Transmitted Infections Treatment Guidelines, 2021. MMWR Recomm Rep. 2021 Jul 23;70(4):1-187. doi: 10.15585/mmwr.rr7004a1. PMID: 34292926; PMCID: PMC8344968.
 25. Fernández-Huerta, Miguel MS, et al. From Resistance-Guided to Risk-Guided Antimicrobial Therapy in *Mycoplasma genitalium*, Sexually Transmitted Diseases: June 2020 - Volume 47 - Issue 6 - p 409-411 doi: 10.1097/OLQ.0000000000001177
 26. NZJZ Split, Upute za uzimanje uzoraka za otkrivanje *Mycoplasma genitalium* metodom *RealTime PCR*
 27. Tianlong. Viral DNA and RNA Extraction Kit. 2021.
 28. Roche. LightMix Kit *Mycoplasma Genitalium*. Cat.-No. 53-0665-96
 29. Roche. Cobas® 4800 system Operator's Manual
 30. Pitt. J. S. Clinical Microbiology for Diagnostic Laboratory Scientists. Hoboken, New Jersey: Wiley-Blackwell; 2017, str. 169-88.

9. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODACI

IME I PREZIME: Lucija Abramović

DATUM ROĐENJA: 14.04.2001.

PREBIVALIŠTE: Krste Frankopana 22, 44430 Hrvatska Kostajnica

E-MAIL: abramoviclucija4@gmail.com

OBRAZOVANJE

2016. završila osnovnoškolsko obrazovanje

2019. završila srednjoškolsko obrazovanje Srednjoj školi Ivana Trnskoga, Hrvatska Kostajnica, smjer: opća gimnazija

2019. upisala studij u Splitu, na Sveučilišnom odjelu zdravstvenih studija – Medicinsko laboratorijska dijagnostika

STRANI JEZICI

ENGLESKI: pismo i govor

NJEMAČKI: osnovno