

Molekularna dijagnostika spolno prenosivih infekcija u žena

Radjenović, Lucija

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

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:176:764111>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-19**

Repository / Repozitorij:



Sveučilišni odjel zdravstvenih studija
SVEUČILIŠTE U SPLITU

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



UNIVERSITY OF SPLIT



SVEUČILIŠTE U SPLITU

Podružnica

SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA

SVEUČILIŠNI PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ

MEIDICNSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Lucija Radjenović

**MOLEKULARNA DIJAGNOSTIKA SPOLNO PRENOSIVIH
INFEKCIJA U ŽENA**

Završni rad

Split, 2024.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

Podružnica

SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA

SVEUČILIŠNI PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ

MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Lucija Radjenović

**MOLEKULARNA DIJAGNOSTIKA SPOLNO PRENOSIVIH
INFEKCIJA U ŽENA**

**MOLECULAR DIAGNOSTICS OF SEXUALLY TRANSMITTED
INFECTIONS IN WOMEN**

Završni rad / Bachelor's Thesis

Mentor:

Doc.dr.sc. Sendi Kuret

Split, 2024.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu

Sveučilišni odjel zdravstvenih studija

Preddiplomski studij Medicinsko-laboratorijska dijagnostika

Znanstveno područje: Biomedicina i zdravstvo

Znanstveno polje: Kliničke medicinske znanosti

Mentor: Doc.dr.sc. Sendi Kuret

MOLEKULARNA DIJAGNOSTIKA SPOLNO PRENOSIVIH INFEKCIJA U ŽENA

Lucija Radjenović, 0346012708

Sažetak

Cilj ovog rada je prikazati važnost molekularne dijagnostike bakterija i virusa kod spolno prenosivih infekcija radi odabira odgovarajuće terapije u njihovom liječenju. Materijali korišteni za analizu uključuju vaginalne briseve uzete od pacijentica sumnjivih na spolno prenosive infekcije. Opisan je postupak uzorkovanja, izolacije nukleinske kiseline te umnažanja i otkrivanja patogena uz pomoć komercijalno dostupnih kitova. Rezultati istraživanja pokazali su da je real-time PCR (RT-PCR) metoda visoko osjetljiva i specifična za detekciju najčešćih uzročnika spolno prenosivih infekcija kod žena. Sve analizirane uzorke uspješno su identificirani uzročnici kao što su HPV, Chlamydia trachomatis, Mycoplasma genitalium, Mycoplasma hominis, Ureaplasma urealyticum i Trichomonas vaginalis. Molekularne metode, posebno RT-PCR, predstavljaju zlatni standard u dijagnostici spolno prenosivih infekcija zbog svoje visoke osjetljivosti, specifičnosti i brzine. Njihova primjena omogućuje rano otkrivanje i ciljano liječenje infekcija, što značajno poboljšava ishode liječenja i smanjuje rizik od komplikacija.

Ključne riječi: spolne infekcije, bakterije; DNA

Rad sadrži: 36 stranica, 7 tablica, 9 slika i 31 referenca

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav povjerenstva za obranu:

1. Doc.dr.sc. Esmā Čečuk Jeličić
2. Prof.dr.sc. Davorka Sutlović
3. Doc.dr.sc. Sendi Kuret

Datum obrane: 17. srpnja 2024.

BASIC DOCUMENTATION CARD

BACHELOR THESIS

University of Split

University Department of Health Studies

Bachelor Study of Medical laboratory diagnostics

Scientific area: Biomedicine and health

Scientific field: Clinical medical sciences

Supervisor: Doc.dr.sc. Sendi Kuret

MOLECULAR DIAGNOSTICS OF SEXUALLY TRANSMITTED INFECTIONS IN WOMEN

Lucija Radjenović, 0346012708

Summary

The aim of this paper is to demonstrate the importance of molecular diagnostics of bacteria and viruses in sexually transmitted infections (STIs) for the selection of appropriate therapy in their treatment. The materials used for the analysis include vaginal swabs taken from patients suspected of having STIs. The procedures for sampling, nucleic acid isolation, and pathogen detection through commercially available kits are described. The research results showed that the real-time PCR (RT-PCR) method is highly sensitive and specific for detecting the most common causes of STIs in women. Pathogens such as HPV, Chlamydia trachomatis, Mycoplasma genitalium, Mycoplasma hominis, Ureaplasma urealyticum, and Trichomonas vaginalis were successfully identified in all analyzed samples. Molecular methods, particularly RT-PCR, represent the gold standard in the diagnosis of sexually transmitted infections due to their high sensitivity, specificity, and speed. Their application enables early detection and targeted treatment of infections, which significantly improves treatment outcomes and reduces the risk of complications.

Key words: sexually transmitted infections; bacteria; DNA

Thesis contains: 36 pages, 7 tables, 9 figures and 31 references

Original in: Croatian

Defense committee:

1. Doc.dr.sc. Esmā Čečuk Jeličić
2. Prof.dr.sc. Davorka Sutlović
3. Doc.dr.sc. Sendi Kuret

Defense date: July 17, 2024

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. HUMANI PAPILOMAVIRUS	2
1.1.1. Uvod	2
1.1.2. Patogeneza	3
1.1.3. Dijagnostika	5
1.2. CHLAMYDIA TRACHOMATIS	7
1.2.1. Uvod	7
1.2.2. Patogeneza	7
1.2.3. Dijagnostika	9
1.3. MYCOPLASMA GENITALIUM, MYCOPLASMA HOMINIS I UREAPLASMA UREALYTICUM	10
1.3.1. Uvod	10
1.3.2. Patogeneza	10
1.3.3. Dijagnostika	11
1.4. TRICHOMONAS VAGINALIS	12
1.4.1. Uvod	12
1.4.2. Patogeneza	13
1.4.3. Dijagnostika	13
1.5. MOLEKULARNA DIJAGNOSTIKA SPOLNO PRENOSIVIH INFEKCIJA	15
1.5.1. Metoda RT-PCR.....	15
2. CILJ RADA	17
3. MATERIJALI I METODE	18

3.1. MATERIJAL	18
3.1.1. Uzorkovanje vaginalnog brisa.....	18
3.2. METODE.....	19
3.2.1. Izolacija nukleinske kiseline	19
3.2.2. Umnažanje nukleinske kiseline i otkrivanje patogena.....	22
4. REZULTATI	26
5. RASPRAVA	30
6. ZAKLJUČCI	32
7. LITERATURA	33
8. ŽIVOTOPIS.....	36

1. UVOD

Spolno prenosive infekcije (SPI) spadaju u zarazne bolesti koje se šire putem spolnog kontakta, bilo oralnim, vaginalnim ili analnim, a mogu se prenijeti s majke na dijete putem posteljice. Faktori koji doprinose brzom širenju spolnih infekcija su nekorištenje prezervativa, često mijenjanje partnera, prostitucija i narkomanija, a prenose se lako bez obzira na dob, spol ili rasu.

Glavni je cilj javnozdravstvenih ustanova da unaprijede zdravlje svakog pojedinca, u okviru smanjenja smrtnosti majki i dojenčadi, povećane upotrebe kontracepcije kao i smanjenja broja neplaniranih i neželjenih trudnoća kojih je prema registriranim podacima sve manje. Važan javnozdravstveni problem su urogenitalne infekcije koje se prenose spolnim putem. Danas su među glavnim uzrocima smrtnosti, akutnih i kroničnih bolesti kao i ozbiljnih komplikacija koje ostavljaju negativne psihološke i medicinske učinke na milijune ljudi. Lakšem širenju ovih infekcija doprinosi i oskudnost simptoma ili njihov potpuni izostanak. Ovoj vrsti infekcija najizloženije su žene u reproduktivnoj dobi kao i milijuni dojenčadi koja se mogu zaraziti od majke i svoj život započeti s opterećenjem spolno prenosive infekcije koja može dovesti do teških zdravstvenih komplikacija. Dugi niz godina su spolne infekcije bile zanemarene u borbi protiv zaraznih bolesti što je dovelo do nesmetanog širenja među adolescentima i mladim odraslim osobama širom svijeta. Godišnje se procjenjuje da se više od 400 milijuna odraslih osoba zarazi spolno prenosivim bolestima, pri čemu se oko 60% tih infekcija pojavljuje kod osoba koje su mlađe od 25 godina. Ovakve infekcije mogu biti uzrokovane bakterijama, virusima, parazitima ili gljivicama. (1) Bakterijski su uzročnici *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Treponema pallidum*, *Ureaplasma urealyticum* i *Mycoplasma hominis*. Od virusa, HIV je najistaknutiji uzročnik spolno prenosivih infekcija, nadmašujući sve ostale po rasprostranjenosti i ozbiljnosti posljedica. Također, tu se ubrajaju i humani papilomavirus (HPV), virus hepatitisa B, herpes simpleks virus tip 2 i citomegalovirus. Od parazita najčešći su *Sarcoptes scabiei* i *Phthirus pubis*, a od protozoa *Trichomonas vaginalis*. (2) Spolno prenosive infekcije su široko

rasprostranjene, ali ono što zabrinjava je da mogu dovesti do dugoročnih poteškoća i komplikacija. Izvanmaternična trudnoća, smrt i bolest novorođenčeta, karcinom vrata maternice, infertilitet i povećana osjetljivost na HIV samo su neke od teških posljedica koje mogu proizaći iz spolno prenosivih infekcija. (1)

Kako bi se spolno prenosive bolesti prevenirale i kontrolirale na vrijeme, treba biti zadovoljeno pet temeljnih pravila. Prvo, educiranje mladih osoba prije započinjanja njihovog spolnog života kao i na samom početku. Drugo, bitno je otkriti asimptomatske nositelje koji šire infekciju. Treće, potreba je učinkovita dijagnostika i terapija simptomatskih osoba. Četvrto, iznimno je bitno pronaći spolne partnere zaražene osobe radi zaustavljanja širenja bolesti. Na kraju, imunizacija cijepljenjem igra ključnu ulogu u prevenciji širenja spolno prenosivih bolesti. (3)

U ovom radu prikazani su najčešći uzročnici spolno prenosivih infekcija koji se testiraju u ginekološkim ordinacijama, a to su humani papiloma virus (HPV), *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* i *Trichomonas vaginalis*.

1.1. HUMANI PAPILOMAVIRUS

1.1.1. Uvod

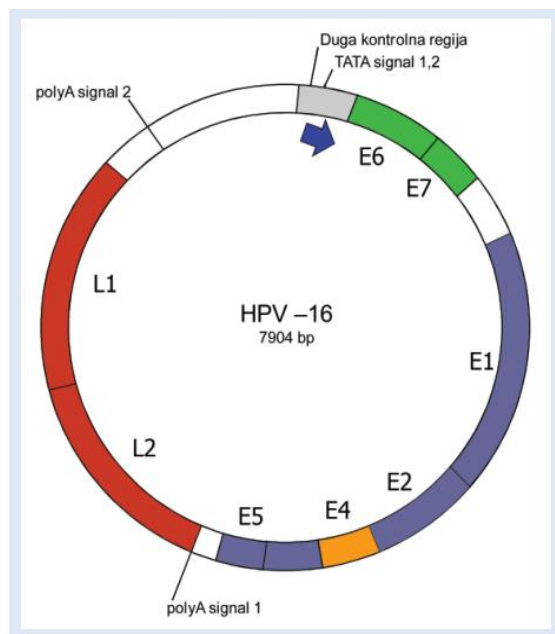
Humani papilomavirus (HPV) spada među najčešće uzročnike spolno prenosivih infekcija kod oba spola na globalnoj razini, a prevalencija je različita kod raznih populacija i geografskih područja. Iako je većina HPV infekcija privremena, istraživanja su pokazala da se većina spolno aktivnih ljudi u nekom trenutku života zarazi ovim virusom. Najizloženije su mlade žene koje često budu pogođene s više različitih sojeva virusa. HPV infekcija je najčešća kod mladih odraslih osoba upravo zbog njihova početka spolne aktivnosti, a prevalencija se kasnije smanjuje, pretpostavlja se zbog starije životne dobi kao i jačanja imunološkog odgovora na virus. (4)

1.1.2. Patogeneza

Humani papilomavirus ubraja se u najčešće patogene koji se prenose spolnim kontaktom. Postoji više od 40 genotipova koji napadaju reproduktivni sustav, a dijele se na niskorizične i visokorizične. U niskorizične tipove se ubrajaju 6, 11, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72 i CP6108, a pojavljuju se kao anogenitalne promjene u obliku kondiloma i intraepitelnih lezija materničnog vrata niskog stupnja. S druge strane, u visokorizične tipove se ubrajaju 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 i 82, koji su onkogeni te mogu uzrokovati genitalne i ekstragenitalne karcinome različitih organa, zbog toga se velika pažnja posvećuje preventivnim mjerama protiv ove infekcije. Visoka učestalost infekcije također proizlazi iz činjenice da se virus lako širi, s procijenjenim rizikom prijenosa nakon jednog seksualnog odnosa između 28% i 60%. (5)

Ovaj virus je specifičan za svakog domaćina i ima određenu sklonost da napada epitelne stanice sluznica i kože, uzrokujući proliferaciju epitela. Virus primarno inficira bazalne epitelne stanice i replicira svoj genom iskorištavajući stanice domaćina. Infekcija kod HPV uvijek kreće od bazalnih slojeva u pločastom epitelu. (6)

HPV je mali dvolančani i kružni DNA virus (episom), dužine približno oko 8.000 parova baza, promjera oko 50 nm, a ubraja se u porodicu *Papillomaviridae*. Virus kodira 8 do 9 gena i potpuno se oslanja na mehanizme replikacije stanice domaćina. Tri su glavne skupine gena koje izgrađuju genom virusa: geni kontrolne regije (engl. *Long Controlling Region*; LCR), strukturni geni kasnog tipa L1 i L2 (engl. *Late*; L) koji kodiraju proteinski omotač virusnog genoma i regulatorni geni ranog tipa (engl. *Early*; E) koji kodiraju proteine neophodne za kontrolu replikacije, ekspresiju gena i interakciju sa proteinima stanice domaćina (Slika 1). (7)



Slika 1. Organizacija genoma humanog papilomavirusa (HPV)

Izvor: [medicina_2-2010.indd \(srce.hr\)](#)

Životni ciklus HPV-a je, u potpunosti, prilagođen epitelnim stanicama, regulaciji diferencijacije i obnavljanja stanica. Do infekcije može doći zbog mikrotraume epitela ili putem receptora koji još nisu potpuno identificirani poput alfa-6 integrina kod HPV-a 16. HPV prisutan u bazalnim stanicama, prebacuje svoj genom u jezgru, iako mehanizmi prijenosa nisu još potpuno razjašnjeni. Genom HPV-a se, u jezgri, nalazi ekstrakromoskopski u obliku episoma. Broj kopija HPV genoma povećava se otprilike 50 do 100 kopija tijekom svakog staničnog ciklusa, pritom oslanjajući se na replikacijske mehanizme stanice domaćina. HPV, u bazalnom sloju, podržava minimalnu proizvodnju proteina. Posebno se ističu dva onkoproteina E6 i E7 koji prilagođavaju stanični okoliš kako bi potakli daljnju replikaciju virusa tijekom diferencijacije inficiranih stanica u keratinocite, kojom povećavaju broj zaraženih stanica. Ukoliko je infekcija uspostavljena, HPV je potaknut aktivnošću proteina E1 i E2 i dolazi do oslobađanja viriona u vanjsko okruženje na površini epitela. Protein E2 smanjuje aktivnost onkoproteina E6 i E7, dolazi do njihove

diferencijacije u keratinocite i prelazak u suprabazlane epitelne slojeve jer se zaustavlja proliferacija stanica domaćina. Vezaom proteina E1 za LCR regiju dolazi do replikacije HPV genoma. Nakon što inficirani keratinociti stignu do gornjih slojeva epitela, HPV aktivira proteine E4, L1 i L2, neophodne za stvaranje viriona. Virusi se reproduciraju u velikom broju i prenose se kontaktom epitela i sluznice na novog domaćina. (7)

HPV je povezan s približno 4% svih slučajeva karcinoma što ga čini važnim čimbenikom u zdravstvenoj problematici. Ključan je faktor u razvoju raka vrata maternice, kao i genitalnih bradavica. Neke infekcije spontano prođu, no kod manjeg postotka žena, između 10% i 20%, mogu ostati prisutne, što se može povezati s prekanceroznom promjenom u cerviksu i razvojem invazivnog raka vrata maternice. Ova promjena je poznata pod nazivom cervikalna intraepitelna neoplazma cerviksa (CIN) koja je genetski nestabilna i predstavlja značajan rizik od napredovanja pa sve do nastanka invazivnog karcinoma vrata maternice. Ukoliko se ne liječi, formira spektar citološke atipije, od niskog stupnja CIN1 koji predstavlja manje ozbiljnu promjenu pa sve do visokog stupnja CIN3, koji je gotovo uvijek uzrokovan visokorizičnim HPV-om 16 ili 18. Oko 60% slučajeva CIN-1 povući će se i vratiti u normalno stanje unutar jedne godine. Žene s CIN2 ili CIN3 imaju veću šansu od razvoja invazivnog karcinoma, iako obično prođe nekoliko godina prije nego što se to dogodi. Iz tog razloga, potrebno je liječiti žene s dijagnozom CIN-2/3. (8, 9)

1.1.3. Dijagnostika

PAPA-test se pokazao kao izvrstan odabir kod probira pacijentica za otkrivanja predstadija i ranog stadija karcinoma vrata maternice kod asimptomatskih pacijentica. Korištenje ovog testa rezultiralo je značajnim smanjenjem incidencije i smrtnosti od raka vrata maternice te je prepoznat kao najučinkovitiji alat za rano otkrivanje ove bolesti. Uzorak se pažljivo uzima pomoću spekuluma koji omogućuje da liječnik jasno vidi cerviks i precizno prikupi potrebne stanice za analizu. Prikupljeni uzorak koristi se za konvencionalnu ili tekućinsku citologiju. Konvencionalna citologija je metoda koja se najčešće primjenjuje u Hrvatskoj, dok neke razvijene zemlje poput Velike Britanije koriste tekućinsku citologiju

(engl. *Liquid-Based Cytology*; LBC) kao metodu u probiru raka grlića maternice. Uzorak se, za konvencionalnu citologiju, uzima drvenom ili plastičnom špatulom i poznat je pod imenom VCE uzorak. Zahvaća se prvo uzorak iz stražnjeg dijela vagine, zatim slijedi uzorak egzocerviksa i na kraju pomoću četkice (cytobrush) uzima se uzorak iz endocervikalnog kanala rotacijom četkice. Vlažno stakalce mora se fiksirati pomoću 96%-tnog etilnog alkohola ili sprej-fiksativa, a onda se takav šalje u laboratorij na analizu. U laboratoriju, uzorci se bojaju ručno ili u automatskom brojaču metodom po Papanicolaou. Nakon bojanja, posebno educirano laboratorijsko osoblje pregledava sva vidna polja uzorka svjetlosnim mikroskopom. Uzorci s potpuno urednim (negativnim) nalazima se evidentiraju i spremaju, dok se patološki uzorci prosljeđuju specijalistu kliničke citologije na daljnju obradu. S druge strane, suvremenija metoda je tekućinska citologija (LBC) u kojoj se uzorak uzima metlicom koja zahvaća cerviks i endocerviks, a nakon toga se direktno stavlja u bočicu koja sadrži otopinu fiksativa. Time se smanjuje broj grešaka jer nakon što se metlica odbaci, a u bočici ostaju tražene stanice. Prednost nad konvencionalnom metodom je u tome što LBC automatski nanosi stanice na stakalce u obliku kruga i uklanja nepotrebne ostatke sluzi i eritrocita koje bi mogle ometati analizu. Također, ukoliko su potrebna dodatna testiranja poput imunocitokemije, HPV tipizacije ili biomarkera, može se iskoristiti materijal iz bočice i pacijentice, u tom slučaju, ne trebaju ponovno odlaziti u ginekološku ordinaciju. LBC uređaj automatski priprema uzorke za analizu, stoga osigurava standardizaciju i povećanje broja stanica na razmazu, što ujedno i povećava osjetljivost detekcije promjena na cerviksu koji su uzrokovani HPV-om na 85-95%. Glavna je mana Papa testa što ima nisku osjetljivost 50-70%. Citološki testovi otkrivaju promjene koje su uzrokovane dugotrajnom infekcijom, ali ne i HPV. Zbog toga sve više prevladava mišljenje da uz citološku dijagnostiku, treba uključiti HPV DNA testiranja kako bi prevenirali i dijagnosticirali rak cerviksa. HPV DNA komercijalni testovi temelje se na dvije osnovne metode: polimerazna lančana reakcija (engl. Polymerase Chain Reaction; PCR) i hibridizaciji. (7, 10)

1.2. CHLAMYDIA TRACHOMATIS

1.2.1. Uvod

Zadnjih deset godina brojne su studije potvrdile da infekcija *Chlamydom trachomatis* (*C. trachomatis*) postaje važan uzročnik infekcija kod ljudi diljem svijeta. Poznato je 18 serotipova bakterije koje uzrokuju različite kliničke slike, a podjela je svrstana na temelju glavnog antigena (engl. *major outer membrane protein* – MOMP) koji se nalazi na vanjskoj ovojnici. Bakterija spada među vodeće uzročnike spolno prenosivih bolesti. (11) *Chlamydia trachomatis* spada u gram-negativne anaerobne bakterije čiji je glavni domaćin čovjek. Razlikuje se 18 serotipova, a svaki je povezan s kliničkim stanjem kojeg uzrokuje: (12)

Serotipovi A-C povezani su s bolesti očiju i mogu dovesti do sljepoće

Serotipovi D-K povezani su s genitalnim i neonatalnim infekcijama

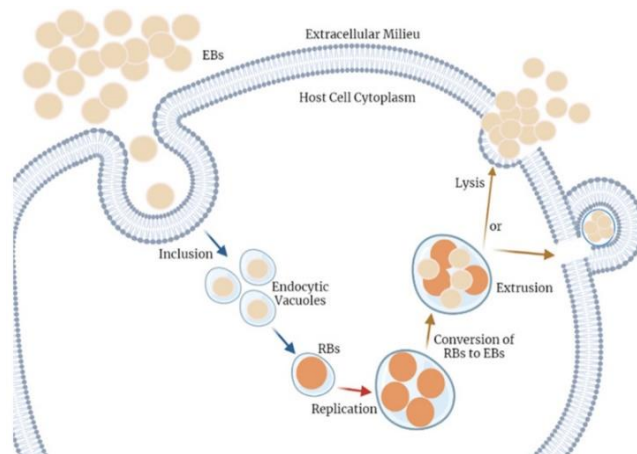
Serotipovi L1-L3 povezani su s limfogranuloma venereum (LGV)

1.2.2. Patogeneza

Način prijenosa *C. trachomatis* je spolnim kontaktom sa zaraženom osobom. Također moguće je da se infekcija prenese sa zaražene majke na dijete tijekom poroda, prolaskom kroz porođajni kanal ili vertikalno s majke na dijete. (13)

Chlamydia trachomatis ima specifičan dvofazni razvojni ciklus. U tom ciklusu patogen izmjenjuje dva oblika: infektivno elementarno tijelo (EB) i neinfektivno retikularno tijelo (RB) koje je metabolički aktivno. Glavna bjelančevina vanjskog omotača (MOMP) omogućuje EB da uđe u stanicu, a reorganizacijom aktina olakšava se ulazak. Koristeći hranjive tvari domaćina, dolazi do pretvaranja EB u RB koji se replicira. U nepovoljnim uvjetima, RB može ostati u nereplicirajućem stanju. Kada je replikacija završena, RB se vraća EB oblik, koji se oslobađa putem lize ili egzocitoze, a ciklus se ponavlja u susjednim stanicama. Kako bi patogen preživio unutar stanice, razvio je mehanizme kojima izbjegava imunološki sustav domaćina kao što su smanjenje ekspresije glavnog histokompatibilnosti I

i II, moduliranjem citokina poput interleukina 18, beta interferona i tipa I interferona te inhibicijom apoptoze. Ovakvi mehanizmi osiguravaju postojanu i kroničnu infekciju (Slika 2). (14)



Slika 2. Stanični ciklus bakterije *C. trachomatis*

Izvor: [Diagnostics | Free Full-Text | Chlamydia trachomatis as a Current Health Problem: Challenges and Opportunities \(mdpi.com\)](#)

Najčešći su serotipovi koji uzrokuju urogenitalne infekcije: D, D/a, E, F, G, Ga, H, I/Ia, J i K. Oni mogu uzrokovati uretritis, cervicitis, endometritis i salpingitis. *C. trachomatis* također je povezana i s konjuktivitosom i prokitisom kod oba spola i razvojem Reiterovog sindroma. (11)

Infekcije *Chlamydijom trachomatis* češće su kod žena, nego kod muškaraca. Bakterija se razmnožava u cilindričnim stanicama endocerviksa, a u 80% slučajeva žene nemaju nikakve simptome. Akutne infekcije nisu toliko česte, za razliku od asimptomatskih kroničnih gdje bakterija trajno inficira stanice i dolazi do nastanka kronične upale koja može dovesti do fibroze i ožiljnih promjena koje su tipične za klamidijske infekcije. Ukoliko se klamidijska infekcija ne liječi i ne prepozna na vrijeme može uzrokovati zdjeličnu upalnu bolest, oštećenja jajovoda, izvanmaternične trudnoće kao i neplodnosti koja je posljedica začepjenja jajovoda. (15)

1.2.3. Dijagnostika

Proces dijagnostike klamidijske infekcije započinje postavljanjem pitanja vezanih za socioekonomski status, preboljene spolne bolesti kao i seksualno ponašanje, također, pregledom se utvrđuju simptomi poput boli u području maternice, disurije ili promjene u vaginalnom sekretu. Osjetljivost ili bolnost u području maternice može ukazivati na razvoj zdjelične upalne bolesti (PID). Mukopurulentni cervicitis predstavlja najčešći oblik klamidijske infekcije, a može se otkriti pregledom pomoću spekuluma. Radi se, također, swab test pomoću vatenog štapića, koji je ukoliko je pozitivan sadrži žutozeleni sluzavi gnoj. Za precizniju dijagnostiku potrebni su specifični laboratorijski testovi budući da se dijagnoza, ne može postaviti samo na temelju pregleda. Za dijagnostiku najčešći su uzorci: obrisak vagine, endocerviksa ili uzorak urina. Ukoliko postoji sumnja na klamidijski proktitis, može se uzeti rektalni obrisak, kao i obrisak usne šupljine i konjunktive. Za dijagnozu PID-a, uzorak endometrija ili fimbrija jajovoda može se dobiti tijekom kiretaže ili histeroskopije. Kultura stanica je metoda koja se nekada prije najčešće koristila za dijagnostiku klamidijske infekcije. Danas je ostala samo korištena u sudskoj medicini, budući da je potrebna za dobivanje živih *C. trachomatis* i zbog 100%-tne specifičnosti. Zlatni standard današnjice su testovi amplifikacije deoksiribonukleinske kiseline (eng. *Nucleic Acid Amplification Techniques* – NAAT) u koje spada lančana reakcija ligazom – LCR (engl. ligase chain reaction) i lančana reakcija polimerazom – PCR (engl. polymerase chain reaction). LCR će u budućnosti imati prednosti nad drugim metodama jer će uzorak uzimati same pacijentice, bilo da je riječ o brisu vagine ili uzorku urina, a samim time će smanjiti opterećenost ginekologa. Serologija za IgM se koristi kod novorođenčadi do 3 mjeseca starosti za dijagnostike *C. trachomatis* pnemunonije, a kod odraslih se ne koristi. Negativan rezultat testa ne znači, nužno da ispitanica nije zaražena, već da je došlo do otpuštanja gama interferona domaćina, što sprječava proizvodnju stijenke i MOMP-a koji predstavlja glavnu bjelančevinu na kojem se temelje testovi i onda može doći do perzistentne infekcije. (16)

1.3. MYCOPLASMA GENITALIUM, MYCOPLASMA HOMINIS I UREAPLASMA UREALYTICUM

1.3.1. Uvod

Vrste mikoplazme i ureaplazme, koje parazitiraju na ljudima, najmanje su poznate među unutarstaničnim i izvanstaničnim bakterijama bez staničnih stijenki koje pripadaju klasi Mollicutes. Njihov izostanak stanične stijenke, izuzetno mali genom i ograničena biosintetička sposobnost zajedno objašnjavaju njihov parazitski ili saprofitski način života, osjetljivost na okolišne faktore, otpornost na beta-laktamske antibiotike i visoke zahtjeve za specifičnim uvjetima za preživljavanje. Mogu uzrokovati perzistentne infekcije kod čovjeka. Budući da su paraziti, esencijalne hranjive tvari poput masnih kiselina, aminokiselina, prekursora kolesterola i nukleinskih kiselina crpe iz domaćina. Ureaplazma ima jedinstvenu sposobnost da lizira ureu po čemu se i razlikuje od mikoplazmi. Patogeni koji su važni u ljudskom genitalnom traktu su: *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis* i *Ureaplasma urealyticum*. (17)

1.3.2. Patogeneza

Mikoplazme imaju sposobnost da se privežu na stanicu domaćina pomoću adhezivnih proteina na membrani ili lipoproteina, a to predstavlja i važni preduvjet koji pridonosi njihovoj patogenosti. Najpoznatiji adhezin je MgPa kod *M. genitalium*. Kod *M. genitalium* je također prepoznat jedinstven način pokretanja koji se zove klizanje (engl. gliding) i koji još nije poznat mehanizam pokretljivosti kod bakterija. Nekoliko je načina kojom mikoplazme mogu oštetiti stanice, a to može biti: izravnim putem stvaranjem citotoksičnih superoksidnih radikala ili vodikovog peroksida, citolizom koja nastaje kao rezultat kemotaksije mononukleara ili reakcije antigen-antitijelo i crpljenjem hranjivih tvari iz domaćina. Vrste *Ureaplasma* sadrže antigen MBA (engl. multiple-band antigen) koji ima važnu ulogu u upalnoj reakciji domaćina. Također imaju specifičan enzim A1-proteazu koja

razdvaja imunoglobuline na Fab i Fc fragmente. Smatra se da zbog sposobnosti razgradnje uree doprinosi nastanku bubrežnih kamenaca u mokraćnom sustavu. (18)

Kolonizacija urogenitalnog sustava bez izazivanja infekcije jedna je od osobnosti koju dijele mikoplazme i ureaplazme. Kod novorođenčadi, ukoliko se prenesu tijekom poroda s majke na dijete, ta kolonizacija trebala bi proći nakon druge godine života. Kod djevojčica se češće događa da mikoplazme i ureaplazme ostanu dio normalne fiziološke flore. Kod odraslih može doći do ponovne kolonizacije koja ovisi o spolnom ponašanju, kontracepciji kao i o dobi i rasi te socijeekonomskom statusu. *M. hominis* je prisutna kao dio normalne mikroflore kod 15% spolno aktivnih muškaraca i žena, dok ureaplasma može biti prisutna kod čak 75% spolno aktivnih osoba. U 75% žena koje imaju bakterijsku vaginozu dokazana je *M. hominis*, nije razjašnjeno je li sama prisutnost mikoplazme uzrok infekcije ili je povoljno okruženje stvoreno drugim bakterijama pogodno za njen razvoj. (18, 19). Kod žena, *M. hominis* može izazvati upalnu bolest zdjelice, kao i febrilna stanja nakon pobačaja ili poroda. U rijetkim slučajevima, infekcija se može proširiti na mozak i zglobove. Kod žena *Mycoplasma genitalium* može uzrokovati cervicitis, upalnu bolest zdjelice kao i neplodnost. Neka istraživanja su pokazala da trajna infekcija *Mycoplasma genitalium*, zbog njenog preživljavanja unutar epitelnih stanica sluznice, uzrokuje upalu koja povećava rizik od prijenosa i razvoja HIV-infekcije. (19) S druge strane, *Ureaplasma urealyticum*, najčešće uzrokuje infekcije u trudnoći, a često uzrokuje zdjeličnu upalnu bolest kao i ekstragenitalne infekcije poput postpartalne sepse. Uzrokuje i spontane pobačaje te se često nalazi u tkivima mrtvorodenih fetusa. Osim toga, može biti uzročnik meningitisa kod nedonoščadi, kao i bakterija *M. hominis*. (20)

1.3.3. Dijagnostika

Ove bakterije ubrajaju se u anaerobe koje se mogu kultivirati na hranjivoj i tekućoj podlozi. Za rast bakterija potreban je serum, sterol, kod mikoplazmi je potrebna glukoza, a kod ureaplazmi je potrebna urea. (20, 21)

Danas se koriste tekući medij u kojima se nalaze indikatori koji promjenom boje pokazuju prisutnost mikoplazmi ili ureaplazmi u uzorku koji se ispituje. U medij se stavlja arginin koji promjenom boje iz žute u ružičastu dokazuje prisutnost mikoplazme, a ureja pomoću hidrolize ureaze promjenom boje iz žute u ružičastu dokazuje prisutnost ureaplazme. Za precizniju dijagnostiku mikoplazme i ureaplazme koristi se linačana reakcija polimerazom (PCR) koja je osjetljivija i specifičnija za detekciju genetskog materijala.

1.4. TRICHOMONAS VAGINALIS

1.4.1. Uvod

Na globalnoj razini se procjenjuje da ima 156 milijuna novih slučajeva zaraze *Trichomonas vaginalis*om kojom se žene zaraze tijekom godine. Globalna učestalost *T. vaginalis*a je veća od kombinirane učestalosti *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* i sifilisa zajedno. (22) *Trichomonas vaginalis* spada u protozoe koje uzrokuju infekciju urogenitalnog trakta pozn

atu pod nazivom trihomonijaza, a najčešće inficira rođnicu, cerviks, uretru i mokraćni mjehur. Najvećim dijelom prenosi se izravnim spolnim kontaktom, ali može se prenijeti i neizravnim kontaktom preko vlažnih predmeta i vode. Partneri su često nositelji infekcije bez vidljivih simptoma. Prisutna je kod 20-25% žena koje idu na redovite ginekološke preglede. Infekcija se najčešće pojavljuje tijekom reproduktivne dobi i trudnoće. Najčešći nespolni način prijenosa je s majke na dijete za vrijeme poroda. Od ostalih infekcija uz trihomonijazu mogu biti prisutne i druge infekcije poput bakterijske vaginoze, HIV infekcije ili gonoreje. Ono što je česti indikator koji se povezuje s *Trichomonas vaginalis* je upravo pH vrijednost vagine. Normalan je pH manji ili jednak 4,5, a porast pH povezuje se s porastom broja uzročnika. (23, 24)

1.4.2. Patogeneza

Trichomonas je pokretni organizam koji se nalazi u lumenu urogenitalnog trakta, a veličina mu je usporediva sa bijelom krvnom stanicom. Mikroorganizam ima valovitu pokretljivost, zato što sadržava 4 biča. Izlučuje citotkosične proteine koji oštećuju sluznicu epitela, a zbog infekcije vaginalni pH obično raste. Inkubacijski period kod žena za Trichomonas vaginalis je između pet i dvadeset osam dana. (25) Patogeneza trihomonijaze još nije do kraja razjašnjena, ali dokazan je napredak u otkrivanju složenog odnosa između parazita i domaćina gdje su identificirani razni parazitski produkti i određene molekule koje uništavaju stanice i tkivo domaćina. Infekcija je uspostavljena kada se organizam adherira za epitelne stanice urogenitalnih sluznica za koje treba određeno vremensko razdoblje, temperatura i pH. Najvažniji su adhezijski proteini AP 65, AP 51, AP 33 i AP 23. Ioni željeza su važni u regulaciji ekspresije adhezina kod transkripcije. Vezuju se po principu receptor-ligand. Receptori su glavna mjesta gdje se parazit veže i ne zna se baš puno o njima, ali istraživanja su pokazala da su glavni receptori laminin i fibronektin. (26) Neki od simptoma žena koje imaju trihomonijazu su: neugodan miris žutog ili zelenog vaginalnog iscjetka, bol tijekom seksualnog odnosa, učestalo i bolno mokrenje te crvenilo i svrbež vulve. Cervicitis je poznat po petehijalnim krvarenjima na ektocerviksu (naziva se i "jagodičasti cerviks"), a nekada može razlikovati trihomonijazu od drugih uzoraka cervicitisa, ali se rijetko dijagnosticira. Naravno, budući da su simptomi Trichomonasa vaginalisa nespecifični, za preciznu dijagnozu potrebna je daljnja laboratorijska obrada. (27)

1.4.3. Dijagnostika

Mikroskopija mokrog preparata najčešća je metoda koja se koristi u dijagnostici trihomonijaze. Uzorak vaginalnog sekreta kod žena promatra se pod mikroskopom i uočavaju se aktivne trihomonade oblika kruške koje imaju izrazitu pokretljivost koja je specifična za Trichomonas vaginalis. Trihomonade se nekada slučajno detektiraju u PAPA testu iz brisa cervikalnog uzorka, ali ovakva konvencionalna metoda nije pouzdana za dijagnostiku Trichomonasa vaginalisa zbog niske osjetljivosti i specifičnosti, već se mora dokazati nekim

drugim osjetljivijim i specifičnijim testom, naročito za žene koje nemaju nikakve simptome. Moguće je kultivirati mikroorganizam u tekućem mediju i ovakva metoda ima bolju osjetljivost od mikroskopije mokrog preparata. Vaginalni brisevi moraju se nasijati u manje od 1 h nakon prikupljanja uzorka, a pozitivne su često u prva 3 dana nakon nasijavanja. Kod žena osjetljivost kulture varira između 44% do 75%. Ovakvi mediji tekuće kulture su jeftini, međutim nisu praktični zbog toga što su konačni rezultati gotovi za tjedan dana i zahtijevaju dobro educirano i iskusno osoblje koje bi dnevno pregledavalo uzorke. Postoje noviji praktičniji testovi koji otkrivaju antigene ili nukleinske kiseline *Trichomonasa vaginalisa*. OSOM *Trichomonas* Rapid Test je brzi test koji koristi imunokromatografske test trake za detekciju antigena, a rezultati su gotovi u roku 30 minuta i ne trebaju dodatnu obradu. Tv lateks aglutinacijski test koristi lateks prele koje su obložene antitijelima i tako identificira antigene *Trichomonasa*, a rezultati su gotovi za 10 minuta. Postoji još jedan test koji u osnovi ima test hibridizaciju nukleinskih kiselina bez amplifikacije, a zove se Affirm VPIII i služi za detekciju *Trichomonasa vaginalisa*, ali također i *Gardnerelle vaginalis* i *Candide albicans*. Rezultati su gotovi za nekih sat vremena, a uzorak se mora dodatno obraditi prije samog testiranja. Kao što je i slučaj s drugim spolno prenosivim bolestima, zbog iznimne visoke osjetljivosti i specifičnosti NAAT testiranje predstavlja efikasnu metodu za utvrđivanje infekcije *Trichomonasom vaginalisom*. Bazira se na PCR-u, transkripciji posredovanoj amplifikaciji (TMA) i drugim metodama koje repliciraju i pojačavaju DNA ili RNA u velikom broju kopija. Ovakve metode osjetljivije su i od mikroskopije kao i kulture i antigenskih testova, upravo zato što pronalaze specifične sekvence. Od uzoraka se koriste vaginalni, uretralni ili endocervikalni brisevi, a može također i urin, ali ipak kad se govori o *Trichomonasu* najbolji je uzorak vaginalni bris. (27)

1.5. MOLEKULARNA DIJAGNOSTIKA SPOLNO PRENOSIVIH INFEKCIJA

Molekularne metode predstavljaju zlatni standard u dijagnostici spolno prenosivih infekcija zbog svoje brzine, specifičnosti i osjetljivosti, omogućujući preciznu identifikaciju uzročnika koji se ne mogu kultivirati konvencionalnim metodama. Najčešće korištene metode su lančana reakcija polimerazom (PCR), PCR u realnom vremenu (real-time PCR), tekućinska hibridizacija (hybrid capture), amplifikacija potaknuta transkripcijom (transcription-mediated amplification) i tehnologija izmjene lanaca (strand displacement technology). (28)

1.5.1. Metoda RT-PCR

Kvantitativni PCR u stvarnom vremenu (qRT-PCR) prikazuje koliko je točno DNA ili gena prisutno u uzorku, dakle daje puno više informaciju od same detekcije DNA. qRT-PCR omogućuje detekciju i kvantifikaciju PCR proizvoda u stvarnom vremenu, dok se oni sintetiziraju. Dvije su uobičajene metode za detekciju i kvantifikaciju: fluorescentne boje koje nespecifično vežu dvolančanu DNA i DNA sonde koje se točno nalaze na određenim sekvencama i koje sadrže fluorescentne oznake. Sonde se vezuju sa komplementarnom ciljanom DNA. Metoda PCR u stvarnom vremenu može se spojiti s obrnutom transkripcijom kako bi se mRNA transformirala u cDNA. Nakon toga, kvantifikacija cDNA se provodi putem qPCR tehnike. Mala količina DNA je potrebna za PCR reakciju kako bi se stvorio dovoljan broj kopija koje ovu metodu čine iznimno osjetljivom i specifičnom.

Za PCR je potrebna reakcijska smjesa koju čini:

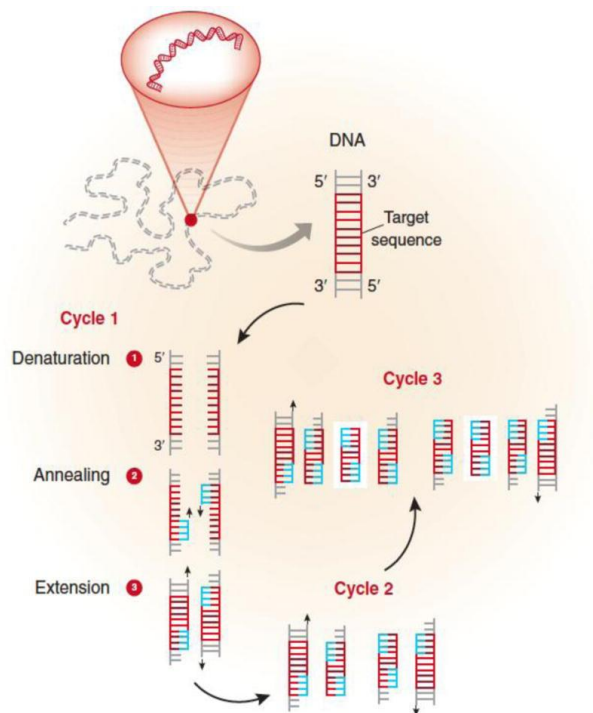
1. DNA predložak
2. Početnice (engl. primers)
3. Nukleotidi
4. DNA polimeraza – Taq polimeraza
5. Bivalentni ioni (najčešće se koristi Mg^{2+})

U građi molekule DNA nalaze se 4 nukleotida: adenin (A), timin (T), citozin (C) i gvanin (G). Taq polimeraza je zadužena za spajanje nukleotida u jednu konačnu cjelinu koja će biti potreba za PCR reakciju. Primeri predstavljaju kratke oligonukleotidne nizove koji su komplementarni DNA koju je potrebno identificirati i umnožiti.

DNA se umnaža u tri koraka:

1. Denaturacija DNA (engl. *Denaturation*) uzorka u kojoj se razdvajaju komplementarni lanci na temperaturi 94-96 °C
2. Hibridizacija početnica (engl. *Annealing*) pri čemu se početnice vežu za komplementarne sljedove DNA predloška na temperaturi 40-60 °C
3. Produljivanje lanca (engl. *Elongation*) na temperaturi 72 °C

Ovakav ciklus ponavlja se 20-40 puta, a broj kopija DNA se udvostručuje. (Slika 3) (29)



Slika 3. Shematski prikaz PCR metode

Izvor: [Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction \(PCR\) - PMC \(nih.gov\)](#)

2. CILJ RADA

Cilj ovog rada je prikazati važnost molekularne dijagnostike bakterija i virusa kod spolno prenosivih infekcija pomoću RT-PCR iz vaginalnog brisa kod pacijentica radi odabira odgovarajuće terapije u njihovom liječenju.

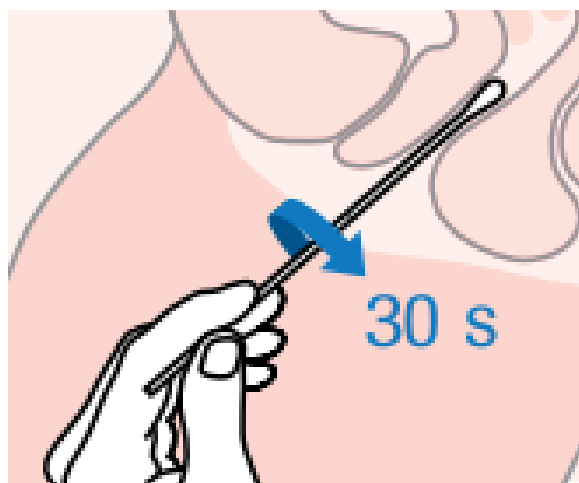
3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJAL

Uzorci za određivanje patogena koji uzrokuju spolno prenosive infekcije su: bris cerviksa, vagine, uretre ili urina. (28)

3.1.1. Uzorkovanje vaginalnog brisa

Sterilni brisni štapić s pamučnim ili plastični vrhom koristi se za uzimanje uzorka vaginalnog brisa. Bris se nježno uroni u vaginu i 20-30 sekundi kružno okreće po stijenjkama vagine kako bi se prikupile stanice i sve mogući prisutni mikroorganizmi (Slika 4). Nakon toga, bris se odmah stavi u epruvetu s odgovarajućim transportnim medijem i dostavlja se u laboratorij na analizu unutar 72 sata pri temperaturi od 2-30°C.



Slika 4. Uzorkovanje vaginalnog brisa

Izvor: [self-collection_vaginal-sample-2021.pdf \(roche.com\)](#)

3.2. METODE

3.2.1. Izolacija nukleinske kiseline

Za izolaciju nukleinske kiseline koristi se komplet za automatsku izolaciju *Kit Viral DNA and RNA Extraction Kit- TIALONG* (TIANLONG, Shaanxi, Kina) koji omogućuje istovremeno obradu velikog broja uzoraka. Osnovni koncept kompleta su magnetne kuglice koje se vežu na negativno nabijenu nukleinsku kiselinu, prenose se i oslobađaju putem specijaliziranih šipki za vrijeme procesa izolacije. (31)

Sadržaj kompleta

Komplet *Viral DNA and RNA Extraction Kit- TIALONG* se sastoji od izolacijskih pločica u kojim se nalaze svi potrebni reagensi za izolaciju nukleinske kiseline (Slika 5). (31)



Slika 5: Pločica za izolaciju nukleinske kiseline

Izvor: <https://www.medtl.net/products/viral-dna-and-rna-extraction-kit-for-environmental-detection-use.html>

Postupak

Postupak izolacije nukleinske kiseline odvija se u nekoliko koraka:

1. Okretati pločicu za izolaciju gore-dolje kako bi se magnetske kuglice na dnu pločice ravnomjerno razdvojile i promiješale.
2. Ukloniti aluminijske foliju koja prekriva pločicu.
3. U jažice prvog i sedmog stupca pločice dodati 200 µl uzorka prema shemi:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	sample1											
B	2											
C	3											
D	4											
E	5											
F	6											
G	7											
H	8											
									9			
									10			
									11			
									12			
									13			
									14			
									15			
									16			

4. Pločicu zatvoriti prozirnom folijom i postaviti u aparat za automatsku izolaciju GeneRotex96- TIALONG (TIANLONG, Shaanxi, Kina) (Slika 6),



Slika 6. Aparat TIALONG GeneRotex96

Izvor: <https://www.medtl.net/products/generotex-96-nucleic-acid-extractor.html>

a zatim pokrenuti program izolacije koji je unaprijed postavljen u aparatu. Program izolacije prikazan je u Tablici 1.

Tablica 1. Program izolacije nukleinske kiseline

Stupac	Ime	čekanje (sekunde)	Miješanje (sekunde)	Magnet (sekunde)	Brzina	Volumen (μ l)	Stanje grijanja	Temperatura ($^{\circ}$ C)
1	Liza stanice	0	240	180	3000	825	-	0
2	Pranje 1	0	60	60	2000	700	Ispiranje	100
3	Pranje 2	60	60	60	2000	800	Ispiranje	100
6	otapanje	0	300	120	2500	80	Ispiranje	100
2	Otpuštanje zrnaca	0	10	0	2500	700	-	0

5. Dobivene izolirane nukleinske kiseline nalaze se u šestom i dvanaestom stupcu pločice. Nakon izolacije prebace se u epruvete i pohrane na 4° C do 24 h, a za dužu pohranu na -20° C.

3.2.2. Umnazanje nukleinske kiseline i otkrivanje patogena

Za otkrivanje različitih patogena mogu se koristiti komercijalno dostupni kompleti koji sadrže sve potrebne reagense za analizu. Jedni od takvih dostupnih kompleta su PCR kvalitativni kompleti *RealLine* (BIORON, Römerberg, Njemačka) (Slika 7) kojima se određivanje patogena može izvesti s istim PCR protokolom.



Slika 7: RealLine komplet

Izvor: <https://www.bioron.de/product/rl-hpv-geno/#1601457328954-167e9962-5743>

Opis i sadržaj kompleta

- *RealLine HPV HCR genotip*

Komplet *RealLine HPV HCR Genotype* namijenjen je za otkrivanje 12 uobičajenih visokorizičnih genotipova (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 i 59) humanog papiloma virusa HPV.

- RealLine HPV 6 / 11

Komplet *RealLine HPV 6/11* namijenjen je za otkrivanje niskorizičnih genotipova 6 i 11 humanog papiloma virusa HPV.

- RealLine Chlamydia trachomatis / Neisseria gonorrhoeae

Komplet *RealLine Chlamydia trachomatis/Neisseria gonorrhoeae* namijenjen je za otkrivanje dva fragmenta DNA iz gena *gyrA* i kriptičnog plazmida, specifičnog za vrstu *C. trachomatis*. Isto tako može se otkriti dio gena *PivNG* (pilin gen inverting protein homolog) specifičan za *N. gonorrhoeae*.

- RealLine Mycoplasma hominis / Mycoplasma genitalium

Komplet *RealLine Mycoplasma hominis / Mycoplasma genitalium* namijenjen je za otkrivanje DNA *Mycoplasma hominis* i DNA *Mycoplasma genitalium*.

- RealLine Ureaplasma urealyticum / Ureaplasma parvum

Komplet *RealLine Ureaplasma urealyticum / Ureaplasma parvum* je namijenjen za otkrivanje DNA *Ureaplasma urealyticum* i *Ureaplasma parvum* u uzorcima (urogenitalni i cervikalni brisevi, sjemena tekućina, tekućina prostate, urin).

- RealLine Trichomonas vaginalis / Gardnerella vaginalis

Komplet je namijenjen za otkrivanje DNA *Trichomonas vaginalis* i *Gardnerella vaginalis*.

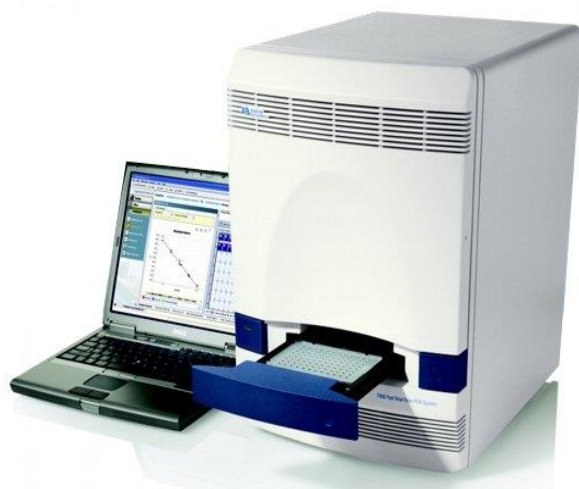
Svi kompleti su u obliku PCR pločice koja sadrži trakice s ukupno 96 jažica (0,2 ml) u kojima se nalaze liofilizirani reagensi potrebni za PCR reakciju.

Prilikom izvođenja svake analize koriste se pozitivna i negativna kontrola:

- Pozitivna kontrola (PC) uključena je u svakom kompletu i služi da bi se potvrdilo da je analiza uspješno izvedena,
- Negativna kontrola (NTC) koja je sterilna voda služi kao kontrola za praćenje kontaminacije PCR procesa.

Postupak

Pripremi se odgovarajući broj trakica (broj uzoraka plus pozitivna i negativna kontrola). Zatim se označe jažice u kojima se nalaze liofilizirani reagensi za svaki uzorak i kontrolu. 50 µl svakog uzorka i kontrola doda se u odgovaraju jažicu i čvrsto zatvori. Pripremljeni uzorci stave se u real-time PCR aparat ABI Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Waltman, MA, USA) (Slika 8) u kojem su prethodno uneseni parametri pri kojima se odvija reakcija Tablici 2.



Slika 8: Real-time PCR aparat

Izvor: [ABI Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System - Sonoran Surplus](#)

Svi testovi se odvijaju po istom PCR protokolu prikazanom u Tablici 2.

Tablica 2. Uvjeti PCR reakcije

Ciklus 1	50°C	2 min	
Ciklus 2	95°C	2 min	
Ciklus 3	94°C	10 sec	50 ciklusa
Ciklus 4	60°C*	20 sec	
* Mjerenje fluorescencije na 60°C			

4. REZULTATI

Real-time PCR metodom testirano je 52 pacijentice na prisustvo patogena koji uzrokuju spolno prenosive infekcije. Pacijentice su bile u dobi od 20-56 godina.

Od ukupno 52 pacijentice, njih 19 (36,5 %) bile su pozitivne na prisustvo HPV-a visokog rizika, a 5 (9,6%) ih je bilo pozitivno na prisustvo HPV-a niskog rizika. Kod 3 (5,8 %) pacijentice dokazano je prisustvo HPV-a i visokog i niskog rizika.

Kod testiranih pacijentica na *C. trachomatis* samo je 1 (1,9 %) bila pozitivna. Nijedna pacijentica testirana na *M. genitalium* nije bila pozitivna, a njih 8 (15,4 %) je bilo pozitivno na *M. hominis*. Kod testiranih pacijentica *U. urealyticum* njih 10 (19,2 %) je bilo pozitivno, a nijedna testirana nije bila pozitivna na *T. vaginalis* (Tablica 3).

Tablica 3. Raspodjela rezultata uzorka vaginalnog brisa testiranih na patogene koji uzrokuju spolno prenosive infekcije kod žena PCR metodom

Patogeni	Pozitivno	Negativno	Ukupno
HPV (visoki)	19 (36,5 %)	33 (63,5 %)	52 pacijentice
HPV (niski)	5 (9,6 %)	47 (90,4 %)	
<i>C. trachomatis</i>	1 (1,9 %)	51 (98,1 %)	
<i>M. genitalium</i>	0 (0 %)	52 (100%)	
<i>M. hominis</i>	8 (15,4 %)	44 (84,6 %)	
<i>U. urealyticum</i>	10 (19,2 %)	42 (80,8 %)	
<i>T. vaginalis</i>	0 (0 %)	52 (100%)	

Testiranjem pacijentica na HPV visokog rizika njih 19 je bilo pozitivno. Najviše ih je bilo pozitivno na genotip 45, 7 pacijentica (36,8 %) i na genotip 31,6 pacijentica(31,6 %). Najmanje pacijentica je bilo pozitivno na genotipove 18, 33 i 35, samo po 1 pacijentica (5,3

%). Na genotipove 16, 56 i 59 bile su pozitivne 3 pacijentice (15,8 %), a na genotipove 39, 51 i 52 bile su pozitivne 2 pacijentice (10,5 %). Navedeni rezultati prikazani su u Tablici 4.

Tablica 4. Raspodjela rezultata zastupljenosti HPV visokog rizika

HPV visokog rizika	Zastupljenost
HPV 16	3 (15,8 %)
HPV 18	1 (5,3 %)
HPV 31	6 (31,6 %)
HPV 33	1 (5,3 %)
HPV 35	1 (5,3 %)
HPV 39	2 (10,5 %)
HPV 45	7 (36,8 %)
HPV 51	2 (5,3 %)
HPV 52	2 (5,3 %)
HPV 56	3 (15,8 %)
HPV 59	3 (15,8 %)

Testiranjem pacijentica na HPV niskog rizika njih 5 je bilo pozitivno i sve su bile pozitivne na genotip 6 (100%) (Tablica 5).

Tablica 5. Raspodjela rezultata zastupljenosti HPV niskog rizika

HPV niskog rizika	Zastupljenost
HPV 6	5 (100%)
HPV 11	0 (0 %)

Od 36 pacijentica u dobi od 20 do 34 godine, testiranih na HPV visokog rizika, njih 15 (41,7 %) je bilo pozitivno, dok je 21 (58,3 %) bilo negativno. Kod istih pacijentica, testiranih na HPV niskog rizika, 4 (11,1 %) je bilo pozitivno, a 32 (88,9 %) je bilo negativno (Tablica 6).

Tablica 6. Raspodjela rezultata prema dobnoj skupini pacijentica od 20 do 34 godine

HPV	Rezultat	Broj pacijentica	Postotak (%)
Visoki rizik	Pozitivne	15	41,7 %
	Negativne	21	58,3 %
Niski rizik	Pozitivne	4	11,1 %
	Negativne	32	88,9 %

Od 16 pacijentica u dobi od 35 do 67 godina, testiranih na HPV visokog rizika, njih 4 (25 %) je bilo pozitivno, dok je 12 (75 %) bilo negativno. Kod istih pacijentica, testiranih na HPV niskog rizika 1 pacijentica (6 %) je bila pozitivna, a 15 (94 %) je bilo negativno (Tablica 7).

Tablica 7. Raspodjela rezultata prema dobnoj skupini pacijentica od 35 do 67 godina

HPV	Rezultat	Broj pacijentica	Postotak (%)
Visoki rizik	Pozitivne	4	25 %
	Negativne	12	75 %
Niski rizik	Pozitivne	1	6 %
	Negativne	15	94 %

Prezime i ime:
 Spol:
 Rođen/a:
 OIB / Broj putovnice:
 Adresa:
 Kontakt telefon:
 Napomena:

Nalaz mikrobiološke pretrage

Broj protokola
1024

Zaprimljeno: 15.03.2024. 10:15

Završeno: 15.03.2024. 15:33

Uzorak: Bris cerviksa
 Pretraga: Real-Time PCR

Pretraga	Rezultat	Metoda	Kit
PCR na visokorizične genotipove HPV (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59)	NEGATIVAN	RT-PCR	7500 Real-Time PCR System, Applied Biosystems/RealLine HPV High Risk Genotype, RealLine HPV6/11, Bioron (CE-IVD)
PCR na niskorizične genotipove HPV (6, 11)	NEGATIVAN	RT-PCR	7500 Real-Time PCR System, Applied Biosystems/RealLine HPV High Risk Genotype, RealLine HPV6/11, Bioron (CE-IVD)
PCR na Chlamydia trachomatis	NEGATIVAN	RT-PCR	7500 Real-Time PCR System, Applied Biosystems/RealLine Chlamydia trachomatis, Bioron (CE-IVD)
PCR na Mycoplasma genitalium	NEGATIVAN	RT-PCR	7500 Real-Time PCR System, Applied Biosystems/RealLine Mycoplasma hominis / Mycoplasma genitalium, Bioron (CE-IVD)
PCR na Mycoplasma hominis	NEGATIVAN	RT-PCR	7500 Real-Time PCR System, Applied Biosystems/RealLine Mycoplasma hominis / Mycoplasma genitalium, Bioron (CE-IVD)
PCR na Ureaplasma urealyticum	POZITIVAN	RT-PCR	7500 Real-Time PCR System, Applied Biosystems/RealLine Ureaplasma urealyticum, Bioron (CE-IVD)
PCR na Neisseria gonorrhoeae	NEGATIVAN	RT-PCR	7500 Real-Time PCR System, Applied Biosystems/RealLine Neisseria gonorrhoeae, Bioron (CE-IVD)
PCR na Trichomonas vaginalis	NEGATIVAN	RT-PCR	7500 Real-Time PCR System, Applied Biosystems/RealLine Trichomonas vaginalis, Bioron (CE-IVD)

Izradio:

Validirao:

Slika 9. Prikaz nalaza analize

5. RASPRAVA

U radu su detaljno opisane infekcije uzrokovane bakterijama kao što su *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* i *Trichomonas vaginalis* te virus humanog papilomavirusa (HPV). Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije (WHO), *Chlamydia trachomatis* uzrokuje oko 127 milijuna novih slučajeva godišnje, često prolazeći asimptomatski, što otežava dijagnostiku i liječenje. *Mycoplasma genitalium* privlači pažnju zbog otpornosti na uobičajene antibiotike. HPV je najčešća SPI virusnog podrijetla, s preko 290 milijuna zaraženih žena, dok su tipovi 16 i 18 odgovorni za oko 70% slučajeva raka cerviksa. (30)

Rezultati istraživanja su pokazali da je najveći dio žena zaražen sa visokorizičnim HPV-om što je u skladu sa globalnim podacima koji ukazuju na visoku prevalenciju HPV-a kao najčešće spolno prenosive infekcije. Niska prevalencija *Chlamydia trachomatis* (samo jedna pozitivna žena) i *Mycoplasma hominis* (8 pozitivnih žena) također odražava globalne trendove, gdje je *Chlamydia trachomatis* često prisutna, ali podložna uspješnoj terapiji i prevenciji. (3)

Molekularne metode, posebno PCR, pruža visoku osjetljivost i specifičnost u otkrivanju patogena. PCR može otkriti vrlo male količine genetskog materijala i pritom ciljano prepoznati specifične sekvence DNA ili RNA određenog patogena. Osim toga postupak je relativno brz i rezultati su gotovi unutar nekoliko sati, a koristi se za otkrivanje širokog spektra mikroorganizama, uključujući bakterije, viruse i parazite. S druge strane, zbog visoke osjetljivosti, PCR je podložan kontaminaciji koja može dovesti do lažno pozitivnih rezultata. Na lažno negativne rezultate mogu utjecati inhibirajuće tvari ili genetska varijabilnost patogena u uzorku, Troškovi PCR opreme i reagensa mogu biti visoki, što može predstavljati izazov za laboratorije s ograničenim financijskim resursima, a za izvođenje je potrebno posebno educirano osoblje. (29)

Preporuke za unapređenje dijagnostike spolno prenosivih infekcija temelje se na usvajanju novijih i preciznijih molekularnih dijagnostičkih metoda. One su važne u otkrivanju

asimptomatskih infekcija koje su neotkrivene zbog neadekvatnog testiranja. Poboljšanje dostupnosti dijagnostičkih tehnologija u zemljama s niskim i srednjim prihodima, od ključne je važnosti za učinkovito upravljanje spolno prenosivim infekcijama. (30)

6. ZAKLJUČCI

Molekularna dijagnostika spolno prenosivih infekcija (SPI) predstavlja ključnu komponentu u suvremenoj medicini, osobito zbog visoke osjetljivosti i specifičnosti metoda poput RT-qPCR-a. Kroz ovaj rad prikazano je kako molekularne metode mogu značajno poboljšati otkrivanje i liječenje SPI, što je od izuzetne važnosti za javno zdravstvo.

Jedna od glavnih prednosti molekularne dijagnostike je sposobnost otkrivanja vrlo malih količina genetskog materijala patogena, što omogućava rano otkrivanje infekcija i pravovremeno liječenje, a to je posebno važno za infekcije koje često prolaze bez ikakvih simptoma.

Preporuke za unapređenje dijagnostike SPI uključuju usvajanje novih i preciznijih molekularnih metoda, poboljšanje dostupnosti dijagnostičkih tehnologija u zemljama s niskim i srednjim prihodima te kontinuiranu edukaciju medicinskog osoblja. Samo kroz integrirani pristup koji uključuje preventivne mjere, učinkovitu dijagnostiku i pravovremeno liječenje moguće je smanjiti prevalenciju SPI i njihove negativne posljedice na zdravlje populacije.

7. LITERATURA

1. Kuzman M. Javnozdravstveno značenje spolno prenosivih i urogenitalnih infekcija. *Medicus*. 2006 Dec 29;15(2_UG infekcije):209–17.
2. Kuzman M. Epidemiologija spolno prenosivih infekcija. *Medicus*. 2009 Feb 19;18(1_Spolno prenosive b):5–15.
3. Topalović Z. Važnost prevencije spolno prenosivih bolesti. *Medicus*. 2003 Oct 7;12(2_Spolne bolesti):253–6.
4. Jv F, Ara&, uacute, Jmg J, Taam F. Biology and natural history of human papillomavirus infection. *Open Access Journal of Clinical Trials*. 2013 Jan 1;2013(default):1–12.
5. Medicinska naklada [Internet]. [cited 2024 Jun 11]. INFEKCIJE U GINEKOLOGIJI I PERINATOLOGIJI. Available from: <https://www.medicinskanaklada.hr/infekcije-u-ginekologiji-i-perinatologiji-2>
6. Ljubojević S, Lipozenčić J, Skerlev M. Genitalne infekcije humanim papilomavirusom. *Medicus*. 2007 Jan 25;16(1_Dermatologija):51–7.
7. Hadžisejdić I, Grce M, Grahovac B. Humani papiloma virus i karcinom cerviksa: mehanizmi karcinogeneze, epidemiologija, dijagnostika i profilaksa. *Medicina Fluminensis : Medicina Fluminensis*. 2010 Jun 7;46(2):112–23.
8. Stanley M. Pathology and epidemiology of HPV infection in females. *Gynecologic Oncology*. 2010 May 1;117(2):S5–10.
9. Mello V, Sundstrom RK. Cervical Intraepithelial Neoplasia. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 [cited 2024 Jun 11]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK544371/>
10. Štemberger-Papić S, Vrdoljak-Mozetič D, Verša Ostojić D, Rubeša-Mihaljević R, Dinter M. Cervical cytology (Pap test) – terminology and importance in screening for cervical cancer. *Med Flum*. 2016 Sep 1;324–36.
11. Tićac B, Kesovija P, Sučić N, Ladavac A, Rukavina T. Infekcije bakterijom *Chlamydia trachomatis* u Primorsko-goranskoj županiji. *Medicina Fluminensis : Medicina Fluminensis*. 2009 Dec 1;45(4):381–8.
12. Mohseni M, Sung S, Takov V. *Chlamydia*. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 [cited 2024 Jun 11]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537286/>

13. Jones BR, Collier LH, Smith CH. Isolation of virus from inclusion blennorrhoea. *Lancet*. 1959 May 2;1(7079):902–5.
14. Rodrigues R, Sousa C, Vale N. Chlamydia trachomatis as a Current Health Problem: Challenges and Opportunities. *Diagnostics (Basel)*. 2022 Jul 25;12(8):1795.
15. Punda-Polić V. Urogenitalne infekcije uzrokovane Chlamydijom trachomatis. *Medicus*. 2012 Jan 23;21(1_UGI):95–101.
16. Karelović D. Infekcija klamidijom trahomatis serotipa D do K u žena. *Medicus*. 2009 Feb 19;18(1_Spolno prenosive b):29–41.
17. Combaz-Söhnchen N, Kuhn A. A Systematic Review of Mycoplasma and Ureaplasma in Urogynaecology. *Geburtshilfe Frauenheilkd*. 2017 Dec;77(12):1299–303.
18. Mareković I. Kliničko značenje urogenitalnih mikoplazma. *Medicus*. 2012 Jan 23;21(1_UGI):103–8.
19. Al-Kobaisi MF. Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology. *Sultan Qaboos Univ Med J*. 2007 Dec;7(3):273–5.
20. Leli C, Mencacci A, Latino MA, Clerici P, Rassu M, Perito S, et al. Prevalence of cervical colonization by *Ureaplasma parvum*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis* and *Mycoplasma genitalium* in childbearing age women by a commercially available multiplex real-time PCR: An Italian observational multicentre study. *J Microbiol Immunol Infect*. 2018 Apr;51(2):220–5.
21. Mycoplasma: Morphology, Cell Shape and Reproduction [Internet]. *Biology Discussion*. 2016 [cited 2024 Jun 24]. Available from: <https://www.biologydiscussion.com/virology/mycoplasma-morphology-cell-shape-and-reproduction/64210>
22. Kissinger PJ, Gaydos CA, Seña AC, Scott McClelland R, Soper D, Secor WE, et al. Diagnosis and Management of *Trichomonas vaginalis*: Summary of Evidence Reviewed for the 2021 Centers for Disease Control and Prevention Sexually Transmitted Infections Treatment Guidelines. *Clin Infect Dis*. 2022 Apr 13;74(Suppl 2):S152–61.
23. Topalović Z. Infekcije donjeg dijela spolnog sustava žene. *Medicus*. 2006 Dec 29;15(2_UG infekcije):303–8.
24. Špoljar S, Skerlev M. *Trichomonas* i *Candida* u svjetlu spolno prenosivih bolesti. *Medicus*. 2009 Feb 19;18(1_Spolno prenosive b):101–5.
25. Schumann JA, Plasner S. Trichomoniasis. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 [cited 2024 Jun 24]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK534826/>

26. Arroyo R, Engbring J, Alderete JF. Molecular basis of host epithelial cell recognition by *Trichomonas vaginalis*. *Molecular Microbiology*. 1992;6(7):853–62.
27. Hobbs MM, Seña AC. Modern diagnosis of *Trichomonas vaginalis* infection. *Sex Transm Infect*. 2013 Sep;89(6):434–8.
28. Židovec Lepej S, Vince A. Molekularna dijagnostika spolno prenosivih infekcija. *Medicus*. 2006 Dec 29;15(2_UG infekcije):219–25.
29. Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR) - PMC [Internet]. [cited 2024 Jun 24]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4102308/>
30. World Health Organization (WHO) [Internet]. [cited 2024 Jul 5]. Available from: <https://www.who.int/>
31. Viral DNA/RNA Extraction Kit (TIANLONG)

8. ŽIVOTOPIS

OPĆI PODATCI:

Ime i prezime: Lucija Radjenović

Datum i mjesto rođenja: 8.3.2002., Split, Republika Hrvatska

E-mail adresa: lucija.radjenovic2002@gmail.com

OBRAZOVANJE:

2009. – 2017. Osnovna škola Stobreč

2017. – 2021. IV. Gimnazija Marko Marulić, Split

2021. – 2024. Sveučilišni odjel zdravstvenih studija u Splitu, Medicinsko laboratorijska dijagnostika

STRANI JEZICI:

Engleski jezik

Njemački jezik