

Dijagnostika spolno prenosivih bolesti

Diagnostics of Sexually Transmitted Diseases

Lidija Žele-Starčević

Klinički zavod za kliničku i molekularnu mikrobiologiju

KBC Zagreb

10000 Zagreb, Šalata 2

Sažetak Prikazana je dijagnostika spolno prenosivih bolesti. Tradicionalni pristup dijagnostici *C. trachomatis* bazira se na staničnoj kulturi, što je tehnički vrlo zahtjevan postupak. Prednost testova baziranih na detekciji antigena i nukleinskih kiselina je u brzini (DFA, EIA, PACE 2) i u mogućnosti obrade velikog broja uzoraka (EIA, PACE 2). Metode bazirane na amplifikaciji nukleinskih kiselina (PCR, LCR) imaju iznimno visoku specifičnost i osjetljivost. *U. urealyticum* i *M. hominis* dobro rastu na posebno obogaćenim umjetnim hranjivim podlogama. Kultivacija *M. genitalium* traje 1-2 mjeseca te se za njezin dokaz rabe PCR-testovi. *T. vaginalis* se u sekretima iz genitalnog trakta dijagnosticira mikroskopirom nativnog preparata ili kulturom na različitim obogaćenim podlogama. Za dijagnostiku *N. gonorrhoeae* važan je mikroskopski pregled uzorka odmah nakon uzimanja. Uzorak se boji po Gramu ili metilenskim plavilom. Podloge za uzgoj *N. gonorrhoeae* sadržavaju bogatu hranjivu bazu s dodatkom krvi. Selektivne podloge sadržavaju i antibiotike koji omogućuju izolaciju gonokoka iz visokokontaminiranih uzoraka. Za dijagnostiku *N. gonorrhoeae* postoje komercijalni amplifikacijski testovi (PCR, LCR). Od molekularnih metoda DNA hibridizacijske metode (PACE 2, Digene Hybrid Capture II) osim odvojenih testova nude i paralelnu dijagnostiku *N. gonorrhoeae* i *C. trachomatis*. Za detekciju HPV-a najčešće se rabe molekularne metode bazirane na hibridizaciji nukleinskih kiselina (HCII) i lančane reakcije polimerazom (PCR). Testom je obuhvaćeno 13 genotipova visokog rizika i 5 genotipova niskog rizika.

Ključne riječi: *C. trachomatis*, dijagnostika, *T. vaginalis*, *N. gonorrhoeae*, HPV, urogenitalne mikoplazme,

Summary The article presents the diagnostics of sexually transmitted diseases. Traditional approach to the diagnostics of *C. trachomatis* is based on cell culture, what is technically a very demanding procedure. The advantage of tests founded on the antigen and nucleic acids detection is in their speed (DFA, EIA, PACE 2) and in the possibility of the analysis of large samples (EIA, PACE 2). Methods based on the nucleic acids amplification (PCR, LCR) have extremely high specificity and sensitivity. *U. urealyticum* and *M. hominis* grow well on separately artificial nutritive substrates. The cultivation of *M. genitalium* lasts 1-2 months, and is proved by PCR tests. *T. vaginalis* is diagnosed in genital tract secretions by microscopy of a native preparation or culture on various enriched substrates. For the diagnostics of *N. gonorrhoeae*, microscopy of the sample immediately after taking is of great importance. The sample is colored by Gram or with methylene blue. The substrates for the *N. gonorrhoeae* cultivation contain rich nutritive basis with addition of blood. Selective substrates also contain antibiotics enabling isolation of gonococcus from highly contaminated samples. For the diagnosis of *N. gonorrhoeae* commercial amplification tests (PCR, LCR) can be used. Out of molecular methods, DNA hybridization methods (PACE 2m Digene Hybrid Capture II), besides separated tests, offer parallel diagnostics of *N. gonorrhoeae* and *C. trachomatis* as well. For the detection of HPV, molecular methods are mostly used, based on the nucleic acid hybridization (HCII) and polymerase chain reactions (PCR). The test encompasses 13 high risk and 5 low risk genotypes.

Key words: *C. trachomatis*, diagnostics, *T. vaginalis*, *N. gonorrhoeae*, HPV, urogenital micoplasmas,

Spolno prenosive bolesti važan su problem u svijetu i u nas, kako zbog velike učestalosti tako i zbog mogućih trajnih posljedica za zdravlje kao što su neplodnost, zdjelična upalna bolest, izvanmaternična trudnoća, karcinom, kongenitalne infekcije, pa čak i smrt (1). Za razliku od drugih infekcija koje se prenose kontaktom, velik broj oboljelih nema jasnih simptoma, ili je potpuno bez simptoma infekcije, a miješane infekcije su česte (2, 3).

Za točnu etiološku dijagnozu uzročnika spolno prenosivih bolesti potrebni su specifični testovi. Uzročnik se ne može dijagnosticirati samo na temelju kliničke slike. Da bi se dala ciljana antimikrobna terapija, potrebni su osjetljivi, specifični, lako dostupni, jeftini i brzi dijagnostički testovi koji mogu dijagnosticirati uzročnika urogenitalnih infekcija u simptomatskih osoba, ali i u asimptomatskih partnera osoba koje imaju neke od ovih infekcija.

Chlamydia trachomatis

Uloga *C. trachomatis* kao uzročnika nekomplikiranih i kompliciranih genitalnih infekcija poznata je od ranih 70-ih godina prošlog stoljeća. Kasnih 70-ih i ranih 80-ih već su bile prepoznate različite kliničke manifestacije i komplikacije klamidijских infekcija (mehanička neplodnost, izvanmaternična trudnoća) (1).

Tradicionalni pristup laboratorijskoj dijagnostici *C. trachomatis* bazira se na staničnoj kulturi. Testovi bazirani na detekciji antigena i nukleinskih kiselina razvili su se tijekom 80-ih godina prošlog stoljeća i brzo su se počeli primjenjivati u velikom broju laboratorija zbog toga što su u odnosu na kulturu bili jeftiniji, nisu zahtijevali toliko educirano osoblje, stroge uvjete transporta, a za rezultate je bilo potrebno puno manje vremena. U prošlom desetljeću razvijene su metode bazirane na amplifikaciji nukleinskih kiselina koje su pokazale da je osjetljivost kulture puno manja nego što se do tada mislilo. Modern pristup dijagnostici *C. trachomatis* postao je kompleksan, često rabeći kombinaciju testova za probir (screening) i potvrdu. Uvođenjem novih testova nametnulo se nekoliko pitanja: osiguravanje prikladnog uzorka za pojedini test, važnost pozitivne prediktivne vrijednosti testa za populaciju s niskom prevalencijom *C. trachomatis*, potreba za promjenom "zlatnog standarda", kao i utvrđivanje vrijednosti probira za asimptomatsku populaciju.

Kultura

Kultura je uvedena 1965. godine i godinama je bila "zlatni standard" za dijagnostiku *C. trachomatis*. Za ovu metodu potreban je vijabilan mikroorganizam, što zahtijeva stroge uvjete transporta i pohrane uzorka (do 24 sata na +4°C; > 24 sata na -70°C). Postupak je tehnički vrlo zahtjevan i traje u idealnim uvjetima 48-72 sata. Uzorak se ukapava na 24-satni monosloj McCoyevih stanica, nakon toga se centrifugira. Prije inkubacije dodaje se medij koji sadržava cikloheksimid. Nakon 48-72 sata boji se jodom ili fluorescein-konjugiranim protutijelima. Svjetlosnim (ili fluorescentnim) mikroskopom gledaju se tipične inkluzije (4). Uvođenjem molekularnih metoda pokazalo se da je osjetljivost kulture 75-85% u referalnim laboratorijima (5, 6). Postupci stanične kulture nisu sasvim standardizirani i razlikuju se između pojedinih laboratorija, rezultirajući različitim osjetljivošću (ovisno o trajanju inkubacije, broju pasaža, metodama bojenja, iskustvu mikroskopičara) (7). I unutar pojedinog laboratorija osjetljivost može varirati ovisno o kvaliteti stanične kulture. Razmjerno česta je bakterijska ili gljivična kontaminacija kulture, koja onemogućava detekciju klamidije.

Međutim, zbog direktne vizualizacije inkluzija koje imaju karakterističnu morfologiju specifičnost kulture je gotovo 100%. Zbog toga je kultura još uvijek metoda izbora u nekim slučajevima kao što je dokazivanje zlostavljanja djece, dijagnosticiranje *C. trachomatis* u uzorcima izvan genitalnog trakta.

Dijagnostika *C. trachomatis* detekcijom antigena

Dijagnostika *C. trachomatis* detekcijom antigena bazira se na vizualizaciji elementarnih tjelešaca u testu direktne imunofluorescencije (DFA) ili imunohistokemijskom detekcijom antigena (EIA). Danas na tržištu postoji više od 20 različitih komercijalnih testova različitih proizvođača koji se baziraju na detekciji antigena. To su ujedno i najčešće rabljeni testovi za dijagnostiku *C. trachomatis*, a osjetljivost im se kreće od 50 do 80%, ovisno o mogućnosti testa da detektira mali broj elementarnih tjelešaca ili nisku razinu antigena (8).

Test direktne imunofluorescencije (direct fluorescence antibody test - DFA)

DFA-testom boje se elementarna tjelešca koja se nalaze u deskvamiranim epitelnim stanicama. Uzorak se nanese direktno na stakalce, fiksira i boji fluorescein-konjugiranim monoklonskim protutijelima na glavni protein stanične stijenke (major outer membrane protein - MOMP) *C. trachomatis* (9). Prednosti ove metode su brzina (pretraga traje manje od sat vremena) i mogućnost kontrole kvalitete uzorka (prisutnost ili odsutnost epitelnih stanica na stakalcu). S obzirom na to da se ovom metodom direktno vizualiziraju elementarna tjelešca, ona ima visoku specifičnost, pod uvjetom da pretragu izvodi iskusen mikroskopičar.

Osjetljivost je manja nego kulture pa nije pogodna za dijagnostiku asimptomatskih infekcija koje sadržavaju mali broj elementarnih tjelešaca te za populaciju s niskom prevalencijom *C. trachomatis* (8, 10). Osim toga, zbog relativno zahtjevnog izvođenja nije pogodna za velik broj uzoraka. Danas se često rabi kao potvrđni test za pozitivne rezultate dobivene drugim nekulturalnim metodama (10).

Enzyme immunoassay (EIA)

U EIA se za detekciju antigena rabe protutijela usmjerena na LPS stanične stijenke. To su protutijela specifična za rod, a mogu križno reagirati s LPS drugih vrsta bakterija i davati lažno pozitivni rezultat. Zbog toga je za pozitivne rezultate dobivene ovim testom potrebno ponoviti test uz uporabu monoklonskih protutijela specifičnih za klamidijски LPS. Ova reakcija blokira LPS-epitop, a reducirani signal potvrđuje pozitivni rezultat (10). U usporedbi s kulturom osjetljivost EIA je niža, međutim, prednost pred kulturom je u jednostavnosti izvođenja, brzini i nepostojanju strogih uvjeta pri transportu (8). Kod novih generacija testova čitav je proces automatiziran.

Metode detekcije nukleinskih kiselina

DNA hibridizacijske metode

Ove metode imaju sličnu osjetljivost kao kultura (11). **PACE 2** je najčešće upotrebljavani test u SAD-u zbog

jednostavnog načina izvođenja. Osnovni princip testa je hibridizacija kemiluminescentno obilježene DNA-probe sa specijes-specifičnom sekvencijom klamidijske 16S rRNA. Stvoreni DNA-rRNA hibrid veže se na magnetske kuglice, a kemiluminescencija se kvantitativno mjeri luminometrom.

Digene HC II CT-ID test je teoretski nešto osjetljiviji jer rabi amplifikaciju signala nakon hibridizacije (12). Oba testa nude mogućnost paralelnog dijagnosticiranja i *N. gonorrhoeae*.

Metode bazirane na amplifikaciji nukleinskih kiselina

Razvoj testova baziranih na amplifikaciji nukleinskih kiselina najvažniji je događaj na području klamidijske dijagnostike od pojave stanične kulture (13). Zbog iznimne osjetljivosti i visoke specifičnosti ovi testovi omogućuju uporabu neinvazivnih uzoraka za probir asimptomatskih osoba koje inače ne bi same došle tražiti pomoć. Ovo je najvažnija prednost zbog činjenice da je većina klamidijjskih infekcija i u muškaraca i u žena asimptomatska.

Najšire primjenjivan test baziran na amplifikacijskoj tehnologiji je PCR. Ovaj test rabi dva oligonukleotidna primera s redosljedom baza koje su komplementarne s regijama specifičnog DNA-segmenta koji je prisutan u ciljnom mikroorganizmu. Nakon što se primeri vežu s ciljnom DNA, oni se izdužuju u DNA-prodrukte čija je dužina određena udaljenošću između mjesta vezanja dvaju primera. Lažnonegativni rezultati mogu biti posljedica prisutnosti inhibitornih supstancija u uzorcima, kao i gubitka nukleinske kiseline tijekom obrade uzorka.

Danas je na tržištu prisutno više različitih komercijalnih testova baziranih na amplifikaciji nukleinskih kiselina - LCR, PCR, TMA. Svi testovi imaju podjednaku osjetljivost i specifičnost; minimalne razlike među pojedinim testovima uglavnom su posljedica različite osjetljivosti na inhibitorne supstancije u uzorcima (10).

Razvijena je i nova generacija testova za dijagnostiku *C. trachomatis* - APTIMA Combo 2 assay. Ispitivanjem na 415 uzoraka urina ovaj se test pokazao značajno osjetljivijim od LCR-a (14).

Serološke metode

Osim izolacije *C. trachomatis* ili dokaza njezinih antigena, odnosno gena, klamidijjske infekcije možemo dijagnosticirati serološkom metodom - određivanjem serumskih protutijela. Mikroimunofluorescentna metoda (Micro-IF), koju su razvili Wang i Grayston, visoko je osjetljiva i specifična metoda za detekciju klamidijjskih protutijela (15). Test je vrlo koristan za epidemiološka istraživanja, kao i neagresivna metoda u istraživanju uzroka neplodnosti, ali ne i za dijagnosticiranje većine

klamidijskih infekcija genitalnog trakta zbog visoke prevalencije ovih infekcija.

Ureaplasma urealyticum

Mycoplasma hominis

Mycoplasma genitalium

To su tri najčešće vrste izolirane iz genitalnog trakta. Iako se *Ureaplasma urealyticum* smatra najčešćim uzročnikom neklamidijskoga negonokoknog uretritisa, njezina je uloga sporna zbog visokog postotka *U. urealyticum* u zdravoj populaciji (16).

Mycoplasma genitalium je prvi put izolirana 1980. godine iz uretre dvojice muškaraca s uretritisom (17). Po biološkim i strukturnim svojstvima te sposobnosti da invadira u epitelne stanice slična je *M. pneumoniae*. U mnogim istraživanjima nađena je u znatno višem postotku u muškaraca s NGU nego u kontrolnoj skupini. Također je u istraživanjima na životinjama potvrđena njezina uloga kao genitalnog patogena.

Kultura

Za optimalnu izolaciju mikoplazma uzorci se odmah nakon uzimanja moraju staviti u transportni medij i držati na +4°C do 24 sata. Ako se u tom periodu ne nasade, trebaju se pohraniti na -70°C. Za kultivaciju se rabi, kao i za druge mikoplazme, *beefheart* bujon obogaćen svježim ekstraktom kvasca i konjskim serumom. Mediju se često dodaju antibiotici koji ne djeluju na mikoplazme (npr. penicilin) da bi se inhibirao rast drugih bakterija. Genitalne mikoplazme dobro rastu u tekućem bujonu pod atmosferskim uvjetima, ali na agaru rastu najbolje u atmosferi od 95% dušika i 5% CO₂. Za detekciju rasta u bujonu, iskorištava se njihova metabolička aktivnost. Uzorak se stavi u bočice s bujonom kojima je dodan indikator (phenol red) i urea, arginin ili glukoza. *Ureaplasma* najbolje raste kod pH 6,0 ili niže i ima ureazu koja razgrađuje ureu u amonijak; na taj način diže pH medija tako da se mijenja boja medija iz žute u crvenu. *M. hominis* metabolizira arginin u amonijak; zbog toga se slična promjena boje stvara u mediju čiji je početni pH 7 (18).

Mikoplazme koje fermentiraju glukoza smanjuju pH medija koji je inicijalno 7,5 do 7,8.

Alikvoti iz medija koji je promijenio boju supkultiraju se na agar. Ova metoda iz tekućeg na agar najosjetljivija je metoda za izolaciju ureaplazma i *M. hominis*. Kultivacija ureaplazmi traje 1 do 2 dana, *M. hominis* do 1 tjedan, dok je za kultivaciju *M. genitalium* potreban 1 do 2 mjeseca. Zbog toga je jasno zašto su pokušaji kultivacije ove mikoplazme često neuspješni i puno točnije mogu se dijagnosticirati molekularnim metodama (PCR).

Ureaplasma se ranije nazivala T-soj ili T-mikoplazma zbog sitnih kolonija koje stvara (15-60 μm u promjeru).

Kolonije *M. hominis* i *M. genitalium* su 200-300 µm u promjeru i imaju izgled "jaja na oko" (18).

Metode detekcije nukleinskih kiselina

Zbog teškoća u izolaciji *M. genitalium* u posljednjih desetak godina razvijeni su PCR-testovi koji rabe različite fragmente DNA *M. genitalium* (19). Međutim, za sada ne postoje komercijalni testovi.

Trichomonas vaginalis

Protozoon *T. vaginalis* uzrokuje infekcije urogenitalnog trakta. Iako je i u muškaraca i u žena trihomonijaza često asimptomatska, simptomi koji se javljaju u žena jesu vaginalni iscjedak, dispareunija, dizurija i učestalo mokrenje. U muškaraca se ponekad javljaju simptomi uretritisa ili prostatitisa. Omjer infekcija u muškaraca i žena teško je utvrditi; u muškaraca infekcija može biti kratkotrajna, a uzročnika je teško dijagnosticirati.

Dijagnoza trihomonijaze postavlja se dokazivanjem uzročnika u sekretima iz genitalnog trakta mikroskopski ili kulturom. Da bi se dokazao uzročnik, a posebno kod muškaraca, često je potrebno ponavljati pretragu koristeći se uzorcima uzetim s različitih mjesta urogenitalnog trakta.

Kod žena se najčešće rabi vaginalni eksudat koji se uzima iz stražnjeg forniksa. Kod muškaraca se uzima uretralni iscjedak, ako je prisutan. Ako ga nema, uzima se obrisak uretre prije prvoga jutarnjeg mokrenja. Također se rabi sediment prvog jutarnjeg urina. Međutim, najosjetljiviji uzorak je ejakulat (20).

Mikroskopski pregled

Nativni preparat

T. vaginalis prepoznaje se u nativnom preparatu po brzom pomicanju flagela, titravom gibanju undulirajuće membrane i isprekidanom gibanju cijelog organizma. Idealno je ako se preparat mikroskopira odmah nakon uzimanja uzorka; ako to nije moguće, najbolje je obrisak staviti u Amiesov transportni medij (21). Međutim, u usporedbi s kulturom, osjetljivost nativnog preparata vrlo je niska, kreće se od 38% do 82% (20). Ova varijabilnost vjerojatno je odraz uporabe različitih podloga za kultivaciju *T. vaginalis*, kao i količine uzročnika u uzorku.

Obojeni preparat

Postoji nekoliko metoda bojenja *T. vaginalis*, a uvedene su da bi se povećala osjetljivost.

Akridin oranž je fluorescentna boja koja se zbog potrebe za fluorescentnim mikroskopom relativno rijetko rabi. U preparatu obojenom akridin oranžom *T. vaginalis* ima oblik okrugle ili kruškolike narančasto-crvene strukture sa žuto-zelenom jezgrom. Osjetljivost ovog bojenja je veća nego osjetljivost nativnog preparata, ali u usporedbi s kulturom rezultati su kontroverzni. **Giensa** se bojenje u dijagnostici trihomonijaze rabi već mnogo godina. Parazit se boji svijetloplavo s malom, tamnom, periferno smještenom jezgrom; aksostil i flagele se također vide. Iako je osjetljivost visoka (gotovo kao kultura), u rutinskom radu laboratorija rijetko se upotrebljava jer je ova metoda bojenja dugotrajna, tehnički teška i zahtijeva iskusna mikroskopičara. U preparatima obojenim po **Papanicolaou** *T. vaginalis* je ovalna oblika, sivo-zelene citoplazme s plavom jezgrom. Po osjetljivosti je slična nativnom preparatu, međutim specifičnost je relativno niska.

Kultura

Za dijagnostiku *T. vaginalis* rabe se različite podloge, no sve sadržavaju hranjive tvari (pepton, triptikaza), serum, esencijalne soli, reducirajuće agense, ugljikohidrate, kao i antibiotike za inhibiciju bakterijskog rasta. Mnogi laboratoriji rabe tekuće podloge. S obzirom na to da *T. vaginalis* bolje raste pod djelomično ili potpuno anaerobnim uvjetima, tekući medij treba puniti gotovo do ruba epruvete. Polutekući mediji sadržavaju malu količinu agara koji reducira difuziju kisika u podlogu i na taj način omogućuje bolji rast. Od polutekućih podloga često se rabe CPLM (cistein-pepton-jetra-maltoza) i Diamond's TYM (triptikaza-ekstrakt kvasca-maltoza).

Osjetljivost kulture kreće se od 80% do 95%; znatno je osjetljivija od mikroskopije, pogotovo kada se u uzorku nalazi malen broj parazita (20). Ponekad u uzorku mogu biti prisutni nevidljivi mikroorganizmi; u tom slučaju mikroskopija je bolja od kulture.

Kultura nije raširena metoda jer je za nju nuždan brzi transport, a rezultati su gotovi tek za 5-7 dana. Međutim, komercijalni sistem za kultivaciju *T. vaginalis* - the InPouch TV-test omogućuje nasadivanje odmah nakon uzimanja uzorka (22).

Metode bazirane na detekciji nukleinskih kiselina

Do danas je objavljeno više radova koji su u PCR-u rabili različite DNA-fragmente *T. vaginalis* (23, 24). U usporedbi s kulturom i nativnim preparatom, PCR-metoda ima vrlo visoku osjetljivost (97%) i specifičnost (98%) (23, 24). Međutim, danas još ne postoji komercijalni PCR-test za dijagnostiku *T. vaginalis*.

Neisseria gonorrhoeae

Neisseria gonorrhoeae inficira sluznicu genitourinarnog trakta. U muškaraca u približno 90% slučajeva uzrokuje akutni purulentni uretritis, međutim, infekcija može zahvatiti epididimis i prostatu. U žena inficira uretru, vrat maternice i rijetko rektalnu sluznicu. Infekcija je u žena često asimptomatska. U približno 10% slučajeva infekcija se s vrata maternice širi na endometriju i jajovode; često dovodi do ožiljkastih promjena na jajovodima koje za posljedicu imaju infertilitet ili ektopičnu trudnoću. Do infekcije oka novorođenčadi dolazi prolaskom kroz porođajni kanal. Rijetke komplikacije gonokokne infekcije u novorođenčadi su sepsa, artritis i meningitis.

N. gonorrhoeae je vrlo zahtjevan mikroorganizam te je pri uzimanju uzorka, transportu i obradi potrebna vrlo pažljiva tehnika. Idealno je da se laboratorij nalazi u neposrednoj blizini ambulante za spolno prenosive bolesti ili da se uzorak uzima u laboratoriju.

Mikroskopski pregled

Preparat bojen po Gramu

Mikroskopski pregled je važan jer omogućuje postavljanje presumptivne dijagnoze odmah nakon uzimanja uzorka, tako da bolesnik isti dan može dobiti prikladnu terapiju. Na taj način sprečava se širenje infekcije, kao i progresija bolesti prema ozbiljnim posljedicama.

Nakon što se uzme obrisak uretre ili cerviksa, napravi se preparat tako da se obrisak rola po predmetnom stakalcu. Nakon što se preparat osuši i fiksira, oboji se po Gramu i gleda pod svjetlosnim mikroskopom na velikom povećanju (x 1000). Preparat iz brisa uretre je pozitivan ako se tipični gram-negativni diplokokci nalaze unutar polimorfonuklearnih leukocita; osjetljivost ove metode u simptomatskih muškaraca kreće se od 83 do 96%, a specifičnost od 95 do 99% (25). Međutim, osjetljivost preparata iz obriska cerviksa mnogo je niža i kreće se od 23 do 65%, a specifičnost od 88 do 100% (25).

Ostale metode bojenja

Osim bojenja po Gramu, za direktan mikroskopski preparat iz obriska uretre ili cerviksa rabi se **metilensko plavilo ili safranin**.

Imunofluorescentna metoda bojenja rabi monoklonska protutijela usmjerena na PI. S obzirom na to da je test tehnički zahtjevan i skup, a nije značajno osjetljiviji od metode bojenja po Gramu, rabi ga samo mali broj laboratorija.

Kultura

Da bi se povećala osjetljivost i specifičnost, brzu dijagnostiku treba nadopuniti i potvrditi kulturom. Kultura je obavezna za dijagnostiku rektalne, oralne i diseminirane gonoreje, kao i asimptomatske infekcije u oba spola; važna je za određivanje osjetljivosti na antibiotike i procjene uspjeha terapije. Također je obavezna za medicolegalnu svrhu.

Postoji mnogo različitih podloga za uzgoj *N. gonorrhoeae*. Sve sadržavaju bogatu hranjivu bazu obogaćenu djelomično (čokoladni agar) ili potpuno liziranom krvi. Jedna od najčešće upotrebljivanih podloga je Tayer-Martinova (TM) selektivna podloga. Ona omogućuje izolaciju gonokoka iz visokokontaminiranih uzoraka kao što su rektum ili ždrijelo. Antibiotici u podlozi (vankomicin, kolistin i nistatin) sprečavaju prerastanje ostale flore prisutne u uzorku. Od ostalih podloga najpoznatije su Martin-Lewisova podloga i modificirana New York City podloga. Neselektivne podloge (npr. čokoladni agar) mogu se rabiti samo za izolaciju gonokoka iz primarno sterilnih uzoraka.

Transport

Gonokok je vrlo osjetljiv na sušenje; uzorak se nikada ne smije uzeti suhim obriskom. Najbolji rezultati postižu se kada se uzorak odmah nakon uzimanja sadi na zagrijanu podlogu i inkubira na 37°C u vlažnoj atmosferi koja sadržava 5-10% CO₂. Ako to nije moguće, uzorak nakon uzimanja treba staviti u jednu od transportnih podloga. **Amiesova transportna podloga** je za preživljenje gonokoka efikasnija od Stuartove (26). Copan proizvodi komercijalni transportni sistem koji uključuje Amiesovu podlogu. Međutim, vrijeme transporta mora biti do 6 sati. Transport koji traje 24 ili 48 sati može smanjiti izolaciju za 40%, odnosno 63% (27).

Identifikacija

Nakon 24 sata inkubacije podloga se pregleda i ako se nađu sumnjive kolonije, napravi se test citokrom oksidaze. Ako je test pozitivan, napravi se preparat po Gramu. Pozitivan test citokrom oksidaze i nalaz gram-negativnih diplokokca dovoljni su za postavljanje presumptivne dijagnoze gonoreje.

Ako na ploči nema sumnjivih kolonija, mora se inkubirati još 24 sata prije nego se pretraga završi kao negativna.

Za definitivnu identifikaciju tradicionalno se rabi razgradnja ugljikohidrata koja se bazira na sposobnosti pojedinih vrsta unutar roda *Neisseria* da razgrađuju različite šećere. Danas postoje različiti komercijalni sistemi koji se baziraju na razlikama u biokemijskim karakteristikama pojedinih *Neisseria* i sličnih rodova: RapID NH System, Gonocheck, apiNH System. RapID NH System je brzi test koji za 4 sata može diferencirati *Neisseria spp.*, *Branhamella*, *Moraxella* i *Hemophilus spp.*

Postoje i imunološki testovi za identifikaciju *Neisseria gonorrhoeae*. Bazirani su na pulovima monoklonskih

protutijela te su stoga visoko osjetljivi i specifični. Jedan od najčešće upotrebljivanih testova je the Phadebact Monoclonal GC test.

Metode detekcije nukleinskih kiselina

DNA-hibridizacijske metode

Već je ranije spomenuto da PACE 2 i Digene Hybrid Capture II (vidi dijagnostiku *C. trachomatis*) osim odvojenih testova nude i paralelnu dijagnostiku *N. gonorrhoeae* i *C. trachomatis*.

Metode bazirane na amplifikaciji nukleinskih kiselina

Komercijalni testovi (PCR, LCR) postoje na tržištu, osim za dijagnostiku *C. trachomatis*, i za dijagnostiku *N. gonorrhoeae*.

Humani papilomavirusi (HPV)

Humani papilomavirusi (HPV) vrlo su različita grupa DNA-virusa s posebnim biološkim karakteristikama. Naime, oni pokazuju afinitet za pločasti epitel i imaju neobičan prirodni tijek infekcije, najčešće supklinički, s rijetkim, ali ozbiljnim posljedicama. Mnogobrojni tipovi ovih virusa i kompleksan prirodan tijek infekcije stvaraju probleme u razvoju zadovoljavajućih dijagnostičkih testova i njihovoj primjeni u kliničkoj praksi. Najvažnija posljedica infekcije HPV-om je karcinom vrata maternice te je najnoviji razvoj u dijagnostici ove infekcije usmjeren direktno na prevenciju ovog karcinoma. Procjenjuje se da se u svijetu godišnje javlja oko 500 000 novih slučajeva karcinoma cerviksa. Najveći broj otpada na zemlje u razvoju, iako ova bolest ostaje važan problem i za visokorazvijene zemlje.

Dijagnostika HPV-a

Klasične metode virusne dijagnostike kao elektronska mikroskopija, stanična kultura i određene imunološke metode nisu prikladne za detekciju HPV-a. HPV se razmnožavaju u terminalno diferenciranim epitelnim stanicama i zato se ne mogu uzgajati u staničnoj kulturi (28).

Za detekciju HPV-a rabe se molekularne metode bazirane na hibridizaciji nukleinskih kiselina (29). U literaturi su opisane brojne tehnički različite hibridizacijske metode. Princip svih metoda je sparivanje, odnosno hibridizacija između komplementarnih predjela malih označenih dijelova nukleinskih kiselina nazvanih **probe**

ili **primeri**, i ciljne DNA. Hibridizacija obuhvaća postupak denaturacije dvolančane DNA u jednolančanu i detekciju jednolančane DNA s obilježenim, komplementarnim probama DNA. Probe su obilježene različitim radioaktivnim i neradioaktivnim biljezima (biotin, digoksigenin). Čvrstoća vezanja između primera i ciljne DNA ovisna je o sukladnosti rasporeda oligonukleotida u oba lanca i o uvjetima u kojima se zbiva hibridizacija (29). Probe mogu biti značajne za određen genotip (genotip-specifične probe) ili za više genotipova HPV-a (grupno-specifične probe). S pomoću genotip-specifičnih proba moguće je odrediti genotip HPV-a (29).

Molekularne tehnike za detekciju HPV-a razlikuju se u osjetljivosti. Iskustvo laboratorija je kritičan uvjet za vjerodostojne rezultate. U rutinskom se radu od metoda baziranih na hibridizaciji najčešće rabe:

1. hybrid capture microplate assay (HCII)
2. polymerase chain reaction (PCR)

1. Digene Hybrid Capture Test temelji se na metodi tekućinske hibridizacije. Danas se rabi druga generacija ovog testa. To je trenutno jedini test za dijagnostiku infekcije HPV-om koji ima odobrenje američke FDA za uporabu u humanoj medicini. Tim testom obuhvaćeno je 13 genotipova visokog rizika (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68) i 5 genotipova niskog rizika (6, 11, 42, 43, 44). Identifikacija pojedinog genotipa nije moguća (30). Ovim testom detektira se čak 1 pg HPV DNA/ml; njegova osjetljivost i specifičnost gotovo se mogu uspoređivati s PCR-om. Prednost ovog testa je relativno jednostavna izvedba i dobra reproducibilnost rezultata, što ga čini najbolje standardiziranom metodom za detekciju HPV-a (30).

2. Lančana reakcija polimerazom (PCR) trenutno je najosjetljivija metoda za dokazivanje infekcije HPV-om i za genotipizaciju HPV-a (31). Osnovni princip PCR-a je da svaki mikroorganizam posjeduje jedinstvenu DNA ili RNA "potpisnu sekvenciju" koja se ponavljanim ciklusima sinteze oligonukleotidnog lanca umnožava do detekcijske razine. Genotipizacija HPV-a, koja se temelji na PCR-u, izvodi se u dva stupnja (32). U prvom stupnju *in vitro* se umnožava mali odsječak genoma HPV-a. Nakon toga slijedi analiza produkata PCR-a različitim molekularnim metodama, koji omogućavaju određivanje genotipa HPV-a. Izborom proba određujemo odsječak genoma koji će se umnožiti te je njihov pravilan odabir najvažniji korak u optimizaciji PCR-a. Za umnožavanje virusnoga genoma biramo između dvije različite vrste proba:

- a) proba koje umnožavaju sekvenciju specifičnu za pojedini genotip (genotip-specifični)
- b) proba koje umnožavaju sekvenciju zajedničku za više genotipova (grupno-specifični)

Genotip-specifični primeri (probe)

Produkt umnožavanja virusnoga genoma s genotip-specifičnim oligonukleotidima značajan je samo za određen genotip HPV-a i zato ga nije potrebno dodatno analizirati. Genotip-specifične probe moraju biti izabrane tako da su komplementarne samo s dijelom izabranoga područja virusnoga genoma čiji je raspored nukleotida značajan samo za određen genotip HPV-a. Međutim, spektar genotipova koje možemo odrediti na taj način je malen. Osim toga, da bi se odredio pojedini genotip, potrebno je izvesti velik broj PCR-a s različitim genotip-specifičnim primerima. Zbog toga, usprkos učinkovitosti i visokoj specifičnosti nekih genotip-specifičnih proba, ova metoda nije primjerena za određivanje genotipova velikog broja uzoraka (33).

Grupno-specifične probe

Većina metoda genotipizacije HPV-a, koja se temelji na PCR-u, izvodi se tako da se određeno područje HPV-genoma umnoži s onim probama koje su komplementarne s najbolje očuvanim dijelom izabranoga područja. To su grupno-specifične probe koje omogućuju umnožavanje širokoga spektra genotipova u jednoj reakciji (33). U literaturi su opisane brojne grupno-specifične probe koje umnožavaju manje ili veće odsječke gena (34, 35). Najčešće se rabe MY9/MY11 i GP5+/GP6+ koji umnožavaju dio gena L1 veličine 450, odnosno 150 bp (36). Umnoženi fragment mora sadržavati područja koja se kod različitih genotipova razlikuju, da bi se s dodatnim metodama mogao odrediti genotip. To mogu biti sljedeće metode:

a) hibridizacijske metode s genotip-specifičnim probama,

- b) metoda polimorfizma restrikcijskih fragmenata - RFLP (restriction fragment length polymorphism) i
- c) određivanje redoslijeda nukleotida.

RFLP

Najjednostavnija i najbrža metoda za genotipizaciju HPV-a je enzimaska razgradnja produkta PCR-reakcije (RFLP). Metoda se izvodi tako da dio genoma HPV-a umnožen PCR-om izložimo djelovanju restrikcijskih endonukleaza koje ga cijepaju na točno određenom mjestu ovisno o specifičnom nukleotidnom rasporedu. Nakon cijepanja produkti se elektroforetski razdvoje i DNA se oboji. Specifični raspored fragmenata odgovara određenim genotipovima. To je potvrđeno i uspoređeno sekvencioniranjem HPV-a. Opisano je više različitih RFLP-metoda koje se među sobom razlikuju u dijelu HPV-genoma koji cijepaju te u broju i vrsti upotrijebljenih endonukleaza (37, 38).

Određivanje redoslijeda nukleotida (sekvencioniranje)

Ovo je jedina metoda kojom definitivno možemo odrediti genotip HPV-a (39). U usporedbi s ostalim molekularnim metodama za genotipizaciju HPV-a, određivanje rasporeda nukleotida omogućuje preciznije tipiziranje već poznatih genotipova, otkrivanje mutacija i određivanje novih genotipova. Razvoj automatiziranih tehnika otvara mogućnost šire upotrebe ove visokospecifične metode u skoroj budućnosti.

Literatura

1. CATES W Jr, WASSERHEIT JN. Genital chlamydial infections: epidemiology and reproductive sequelae. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 164: 1771-81.
2. SCHACHTER J, STONER E, MONCADA J. Screening for chlamydial infections in women attending family planning clinics. *West J Med* 1983; 138: 375-9.
3. STAMM WE, COLE B. Asymptomatic *Chlamydia trachomatis* urethritis in men. *Sex Transm Dis* 1986; 13: 163-5.
4. SMITH TF, BROWN SD, WEED LA. Diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections by cell culture and serology. *Lab Med* 1982; 13: 92-100.
5. CHERNESKY MA, JANG D, LEE H et al. Diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections in men and women by testing first-void urine by ligase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 2682-5.
6. SCHACHTER J, STAMM WE. Chlamydia. In: Murray PR, Tenover FC, Tenover FC, Tenover RH, (eds.) *Manual of clinical microbiology*. 6th ed. Washington DC: American Society for Microbiology, 1995: 669-77.
7. BARNES RC. Laboratory diagnosis of human chlamydial infections. *Clin Microbiol Rev* 1989; 2: 119-36.
8. NEWHALL WJ, JOHNSON RE, deLISLE S et al. Head-to-head evaluation of five chlamydia tests relative to a quality-assured culture standard. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 681-5.
9. CHERNESKY MA, MAHONEY JB, CASTRICIANO S et al. Detection of *Chlamydia trachomatis* antigens by enzyme immunoassay and immunofluorescence in genital specimens from symptomatic and asymptomatic men and women. *J Infect Dis* 1986; 154: 141-8.

10. BLACK CM. Current methods of laboratory diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections. Clin Microbiol Rev 1997; 10: 160-84.
11. STARY A et al. Evaluation of the Gen-Probe PACE 2 and the Mikrotrak enzyme immunoassays for diagnosis of *Chlamydia trachomatis* in urogenital samples. Sex Transm Dis 1994; 21: 26-30.
12. GIRDNER JL, CULLEN AP, SALAMA TG et al. Evaluation of the Digene Hybrid Capture II CT-ID Test for detection of *Chlamydia trachomatis* in endocervical specimens. J Clin Microbiol 1999; 37: 1579-81.
13. CHERNESKY M, MORSE ST, SCHACHTER J. Newly available and future laboratory tests for sexually transmitted diseases (STDs) other than HIV. Sex Transm Dis 1999; 26 (Suppl 4): S8-S11.
14. CHONG S, JANG D, MAHONY J et al. Specimen processing and concentration of *Chlamydia trachomatis* added can influence false-negative rates in the LCx Assay but not in the APTIMA Combo 2 Assay when testing for inhibitors. J Clin Microbiol 2003; 41(2): 778-82.
15. WANG SP, GRAYSTON JT et al. Simplified immunofluorescence test with trachoma-lymphogranuloma venereum (*Chlamydia trachomatis*) antigens for use as a screening test for antibody. J Clin Microbiol 1975; 1: 250-5.
16. SCHWARTZ MA, HOOTON TM. Etiology of nongonococcal nonchlamydial urethritis. Dermatol Clin 1998; 16(4): 727-33.
17. TULLY JG, TAYLOR-ROBINSON D, COLE RM. A newly discovered mycoplasma in the human urogenital tract. Lancet 1981; 1(8233): 1288-91.
18. MCMILLAN A, BALLARD RC. Non-specific genital tract infection and chlamydial infection, including lymphogranuloma venereum. In: McMillan A, Young H (eds.) Clinical Practice in Sexually Transmissible Infections. Edinburgh: Saunders, 2002.
19. JENSEN JS, BORRE MB, DOHN B. Detection of *Mycoplasma genitalium* by PCR Amplification of the 16S rRNA Gene. J Clin Microbiol 2003; 41(1): 261-6.
20. MCMILLAN A. Vaginal infections and vulvodynia. In: McMillan A, Young H, (eds.) Clinical Practice in Sexually Transmissible Infections. Edinburgh: Saunders, 2002.
21. BEVERLY AL, VENGLARIK M, COTTON B et al. Viability of *Trichomonas vaginalis* in transport medium. J Clin Microbiol 1999; 37: 3749-50.
22. BORCHARDT KA, ZHANG MZ, SHING H et al. A comparison of the sensitivity of the InPouch TV, Diamond's, and Trichosel media for detection of *Trichomonas vaginalis*. Genitourin Med 1997; 73: 297-8.
23. WENDEL KA, ERBELDING EJ, GAYDOS CA, ROMPALO AM. *Trichomonas vaginalis* polymerase chain reaction compared with standard diagnostic and therapeutic protocols for detection and treatment of vaginal trichomoniasis. Clin Infect Dis 2002; 35: 576-80.
24. HEINE RP, WIESENFELD HC, SWEET RL et al. Polymerase chain reaction analysis of distal vaginal specimens: a less invasive strategy for detection of *Trichomonas vaginalis*. Clin Infect Dis 1997; 24: 985-7.
25. MCMILLAN A. Gonorrhoea. In: McMillan A, Young H (eds.) Clinical Practice in Sexually Transmissible Infections. Edinburgh: Saunders, 2002.
26. HUMAN RP, JONES GA. Survival of bacteria in swab transport packs. Med Lab Sci 1986; 43: 14-8.
27. EBRIGHT JR, SMITH KE, DREXLER L et al. Evaluation of modified Stuart's medium in culturettes for transport of *Neisseria gonorrhoeae*. Sex Transm Dis 1982; 9: 44-7.
28. BEUTNER KR, TYRING S. Human papillomavirus and human disease. Am J Med 1997; 102: 9-15.
29. MANOS MM, GRAVITT PE. Nucleic acid hybridization methods to detect microorganisms. Lab Anim Sci 1993; 43: 5-10.
30. CLAVEL C, MASURE M, LEVERT M et al. Human papillomavirus detection by Hybrid Capture II assay: a reliable test to select women with normal cervical smears at risk for developing cervical lesions. Diagn Mol Pathol 2000; 9: 145-50.
31. POLJAK M, AVŠIČ-ŽUPANC T, SEME K. Verižna reakcija s polimerazom - nova raziskovalna in diagnostična metoda v virologiji. Med Razgl 1994; 33: 379-400.
32. POLJAK M, SEME K, GALE N. Detection of human papillomavirus in tissue specimens. Adv Anatomic Pathol 1998; 5: 216-34.
33. TROFFATER KF. Diagnosis of human papillomavirus genital tract infection. Am J Med 1997; 102: 21-7.
34. WILLIAMSON AL, RYBICKI EP. Detection of genital human papillomavirus by polymerase chain reaction amplification with degenerate nested primers. J Med Biol 1991; 33: 165-71.
35. RESNICK RM, CORNELISSEN MT, WRIGHT DK et al. Detection and typing of human papillomavirus in archival cervical cancer specimens by DNA amplification with consensus primers. J Natl Cancer Inst 1990; 82: 1477-84.
36. MANOS MM, TING Y, WRIGHT DK et al. Use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomavirus. Cancer Cells 1989; 7: 209-14.
37. BERNARD HU, CHAN SY, MANOS MM et al. Identification and assessment of known and novel human papillomavirus by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence, and phylogenetic algorithms. J Infect Dis 1994; 170: 1077-85.
38. LUNGU O, WRIGHT TC Jr, SILVERSTEIN S. Typing of human papillomavirus by polymerase chain reaction amplification with L1 consensus primers and RFLP analysis. Mol Cell Probes 1992; 6: 145-52.
39. RADY PL, CHIN R, ARANY I et al. Direct sequencing of consensus primer generated PCR fragments of human papillomavirus. J Virol Methods 1993; 43: 335-50.