

Mikrobiološka dijagnostika spolno prenosivih infekcija

Microbiological Diagnostics of Sexually Transmitted Infections

Lidija Žele-Starčević¹, Vanda Plečko¹, Mihael Skerlev²

¹Klinički zavod za kliničku i molekularnu mikrobiologiju Kliničkoga bolničkog centra Zagreb i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

10000 Zagreb, Kišpatićeva 12

²Klinika za kožne i spolne bolesti Kliničkoga bolničkog centra Zagreb i

Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

10000 Zagreb, Šalata 4

Sažetak Spolno prenosive infekcije važan su problem u svijetu i u nas, kako zbog velike učestalosti tako i zbog mogućih trajnih posljedica za zdravlje kao što su neplodnost, zdjelica upalna bolest, izvanmaternična trudnoća, karcinom, kongenitalne infekcije, pa čak i smrt. Za razliku od drugih infekcija koje se prenose kontaktom, velik broj oboljelih nema jasnih simptoma, ili su simptomi odsutni, a višestruke su ("miješane") infekcije također česte. Za točnu etiološku dijagnozu uzročnika spolno prenosivih infekcija potrebni su osjetljivi i specifični testovi. Osim klasičnih dijagnostičkih metoda danas se dijagnostika spolno prenosivih infekcija sve više temelji na metodama molekularne biologije koje u odnosu na klasične metode imaju značajno veću osjetljivost i specifičnost te postaju "zlatni standard" za većinu ovih infekcija. Na tržištu postoji velik broj komercijalnih testova koji se baziraju na hibridizaciji (hybrid capture) ili na jednoj od amplifikacijskih metoda (PCR, TMA, SDA). Zbog visoke osjetljivosti ovih testova uzročnici se mogu detektirati u neinvazivnim uzorcima (urin) ili omogućavaju bolesnicima/bolesnicima da same/i uzmu uzorak (obrisak vagine, vulve ili analne regije). Na taj način postiže se bolja suradljivost ciljane populacije.

Gljučne riječi: spolno prenosive infekcije, dijagnostika, klasične metode, molekularne metode

Summary Sexually transmitted infections (STIs) are an important global problem both due to their increasing rate and serious health consequences such as infertility, pelvic inflammatory disease, ectopic pregnancy, congenital infections, and even mortality. Many STIs are asymptomatic and therefore go undetected and untreated. This is of particular concern with the recognition that HIV transmission is increased with co-existent STIs. Therefore, accurate, cost-effective and reliable diagnostic assays are needed to obtain more precise data on the incidence of various STIs. Conventional diagnostic assays have a relatively low sensitivity. However, with the advent of molecular technologies, including target and signal amplification methods, diagnostics of STIs have been revolutionised and allow the use of non-invasive or minimally invasive sampling techniques, some of which are self-collected by the patient, e.g. first-void urine and low vaginal swabs. Most studies evaluating such self-sampling with molecular diagnostic techniques have demonstrated an equivalent or superior detection of STIs as compared to conventional sampling and detection methods.

Key words: sexually transmitted infections, diagnostic, conventional methods, molecular methods

Spolno prenosive infekcije uzrokovane su različitim grupama mikroorganizama, a zajedničko im je da je spolni put prijenosa najvažniji način širenja.

Prije Drugoga svjetskog rata bilo je poznato pet klasičnih spolnih bolesti: gonoreja, sifilis, šankroid, lymphogranuloma venereum i granuloma inguinale. Uvođenjem penicilina i drugih antibiotika godišnja incidencija gonoreje i sifilisa je pala, a ostale tri klasične spolne bolesti su gotovo nestale iz razvijenih zemalja.

Zbog društvenih promjena početkom šezdesetih godina prošlog stoljeća pa nadalje ponovo je došlo do značajnog

porasta incidencije spolno prenosivih bolesti i u razvijenim zemljama.

U posljednja dva desetljeća došlo je do razvoja molekularnih i seroloških dijagnostičkih metoda, što je znatno olakšalo identifikaciju uzročnika. Tako je postalo jasno da i mnogi drugi mikroorganizmi mogu biti preneseni spolnim kontaktom. U heteroseksualnih osoba, a pogotovo u homoseksualnih, oralno-genitalni i oralno-rektalni kontakti rezultirali su infekcijama virusima i različitim gastro-intestinalnim patogenima (1).

Infekcije humanim papilomavirusima (HPV) najčešće su

spolno prenosive infekcije u svijetu. Najčešće su prolazne, pogotovo u mladih žena, međutim dokazano je da su ove infekcije glavni uzročnik cervikalnog karcinoma (2).

Od bakterijskih infekcija najčešće su klamidijske i gonokokne infekcije. Također mogu dovesti do ozbiljnih posljedica kao što su zdjelična upalna bolest, neplodnost, izvanmaternična trudnoća, spontani pobačaj, kongenitalne infekcije i neonatalni mortalitet (3). Ove infekcije, pogotovo klamidijske, često imaju asimptomatski tijek, što je jedna od najvećih zapreka u kontroli spolno prenosivih infekcija, posebno u zemljama u kojima se rutinski ne registriraju partneri osoba kojima je dijagnosticirana jedna od ovih infekcija. Lako dostupni dijagnostički testovi koji omogućuju brzu i efikasnu terapiju asimptomatskih bolesnika mogu smanjiti prevalenciju, spriječiti komplikacije i reducirati incidenciju infekcija HIV-om, čiji prijenos ove infekcije olakšavaju. Dijagnostički testovi također imaju važnu ulogu u smanjivanju nepotrebne terapije u bolesnika sa sindromom spolno prenosivih bolesti, a koji nisu uzrokovani ovim bakterijama.

Način odabira dijagnostičkih testova trebao bi ovisiti o njihovoj osjetljivosti i specifičnosti. Općenito, ako je liječenje jeftino, a nuspojave rijetke, odabiru se testovi koji imaju visoku osjetljivost, dok specifičnost tih testova nije presudna. Također bi trebalo uzeti u obzir prevalenciju infekcija u ciljnoj populaciji. Ako je prevalencija niska, a test nije visoko specifičan, zbog značajnog postotka lažno pozitivnih rezultata česta je nepotrebna primjena antibiotske terapije. Razvijeni su matematički modeli koji mogu pomoći u predviđanju utjecaja i isplativosti brzih testova koji imaju različitu osjetljivost i specifičnost, te se na taj način može odrediti koji su testovi najbolji za pojedinu populaciju (4).

U daljnjem tekstu bit će prikazana dijagnostika najčešćih spolno prenosivih bolesti u užem smislu.

Chlamydia trachomatis

Klamidije su bakterije koje su obligatni intracelularni paraziti s jedinstvenim razvojnim ciklusom. Zbog toga ne mogu rasti na umjetnim hranjivim podlogama, nego se uzgajaju na staničnoj kulturi.

Uloga *Chlamydia (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 klamidijskih infekcija (mehanička neplodnost, izvanmaternična trudnoća) (3).

Za dijagnostiku klamidijskih infekcija kultura je godinama bila "zlatni standard". Naime, zbog direktne vizualizacije inkluzija koje imaju karakterističnu morfologiju, ima 100%-tnu osjetljivost. U odnosu na kulturu procjenjivani su ostali testovi: test direktne imunofluorescencije, enzimski imunoesej i različiti brzi lateksni aglutinacijski testovi (5).

Početak devedesetih godina pojavili su se na tržištu različiti molekularni testovi: najprije oni bazirani na hibridizaciji nukleinskih kiselina, a nešto kasnije i testovi bazirani na amplifikaciji nukleinskih kiselina (nucleic acid amplifica-

tion tests – NAATs) (5, 6). Osjetljivost i specifičnost amplifikacijskih testova je između 95-98%, što je značajno više u odnosu na kulturu, čija je osjetljivost oko 70% (5, 6). Osim toga, ovi testovi imaju i druge prednosti u odnosu na kulturu: ne zahtijevaju stroge uvjete transporta, mogu se rabiti neinvazivni uzorci, kao urin umjesto obriska uretre, postupci su standardizirani, postupak traje nekoliko sati i danas je u velikoj mjeri automatiziran, moguće je obraditi velik broj uzoraka u kratkom vremenu.

U početku su veliki nedostaci ovih testova bili mogućnost kontaminacije uzoraka i osjetljivost na inhibitore PCR-a koji se često nalaze u uzorcima (krv, sluz, vitamini, minerali). Automatizacijom procesa izolacije, ali i amplifikacije i detekcije, mogućnost kontaminacije je uklonjena, a nove generacije testova smanjeno su osjetljive na inhibitore u uzorcima (7, 8).

Većina ovih testova istodobno detektira oba gore spomenuta najčešća uzročnika spolno prenosivih infekcija – *Chlamydia trachomatis* i *Neisseria gonorrhoeae* (9, 10).

Od hibridizacijskih testova za dijagnostiku *Chlamydiae trachomatis* i/ili *Neisseriae gonorrhoeae* najčešće se rabi Hybrid Capture 2 (Digene, SAD). Test se bazira na tekućinskoj hibridizaciji i amplifikaciji signala (11).

Od testova baziranih na amplifikaciji nukleinskih kiselina (NAATs) najčešće se izvode različiti PCR-testovi. Najčešći komercijalni testovi bazirani na PCR-tehnologiji su COBAS AMPLICOR™ *Chlamydia trachomatis* test i COBAS AMPLICOR™ *Neisseria gonorrhoeae* test (Roche Diagnostics, SAD) (12-14).

Nova generacija testova bazirana na PCR-tehnologiji jesu PCR-testovi u realnom vremenu (real-time PCR). Osnovni princip ovih testova je da se istodobno zbivaju i amplifikacija i detekcija. Komercijalni testovi bazirani na PCR-metodi u realnom vremenu su COBAS Taqman RealTime CT test (Roche Diagnostics, SAD) i Abbott RealTime™ CT test, Abbott RealTime™ CT/NG test (Abbott Diagnostics, SAD), RealArt™ *C. trachomatis* PCR test (Qiagen, Njemačka) (15, 16).

Osim amplifikacijskih testova baziranih na PCR-tehnologiji postoje i testovi koji se temelje na amplifikaciji potaknutoj transkripcijom (TMA) i tehnologiji izmjene lanaca (SDA). Najčešće upotrebljavani testovi bazirani na ovoj tehnologiji su APTIMA Combo 2 test (AC2) (Gen-Probe Inc., SAD), odnosno ProbeTec Strand Displacement Assay (SDA) (Becton Dickinson, SAD), koji je također u realnom vremenu (17-19).

Svi serovari *Chlamydiae trachomatis* sadržavaju velik broj kopija kriptičkog plazmida te se on zbog toga rabi kao ciljna sekvenca većine komercijalnih dijagnostičkih testova (12-14). Međutim, 2006. godine u Švedskoj je otkrivena nova varijanta *Chlamydiae trachomatis* (nvCT) koja ima deleciju 377 bp u ORF-1 dijelu plazmida koji je ciljna regija sljedećih testova baziranih na amplifikaciji nukleinskih kiselina (NAATs): Cobas Amplicor, Cobas Taqman48 (Roche Diagnostics, SAD) i Abbott m2000 (Abbott Diagnostics, SAD) (20-23). Kao posljedica toga ovi testovi daju lažno negativne rezultate u populaciji koja je zaražena nvCT-om. Testo-

vi koji kao ciljnu sekvencu rabe druge dijelove genoma *C. trachomatis* detektiraju i nvCT. To su sljedeći testovi: AP-TIMA Combo 2 (AC2) (ciljna sekvenca rRNA), zatim RealArt CT Test (ciljna sekvenca *omp*-gen i kriptički plazmid) i SDA (ciljna sekvenca druga regija kriptičkog plazmida).

Ova varijanta *C. trachomatis* proširena je u Švedskoj; procjenjuje se da se prevalencija kreće između 10% i 66%, ovisno o regiji (20, 21). Međutim, nvCT je u drugim zemljama nađen vrlo rijetko (24-26). Preliminarna istraživanja pokazala su da se radi o identičnom genotipu. Smatra se da je visoka proširenost ovog soja u Švedskoj nastala pod pritiskom selekcije, s obzirom na to da je AmpliCor (Roche) bio gotovo jedini test koji se rabi diljem Švedske.

Neisseria gonorrhoeae

Neisseria (N.) gonorrhoeae bila je jedan od najčešćih bakterijskih uzročnika spolno prenosivih bolesti, no, uvođenjem antibiotika te, poglavito u razvijenijim zemljama, učestalost gonoreje snižena je u usporedbi s prvom polovicom 20. stoljeća, odnosno u uporedbi s nerazvijenim zemljama nižega socijalnog i ekonomskog standarda (v. članak o gonoreji).

Mikrobiološka dijagnostika je obvezna za dijagnostiku gonoreje. S obzirom na to da je inkubacijski period kratak, a infektivnost uzročnika visoka, u kontroli širenja infekcije i sprečavanja komplikacija važna je brza dijagnostika te adekvatno liječenje.

Kod muškaraca sa simptomima uretritisa (dizurične smetnje, iscjedak iz uretre), direktni mikroskopski preparat bojen po Gramu ili metilenskim plavilom omogućuje postavljanje presumptivne dijagnoze u istom danu. Osjetljivost ove metode u simptomatskih muškaraca kreće se od 83 do 96%, a specifičnost od 95 do 99%. Međutim, osjetljivost preparata iz obriska cerviksa mnogo je niža i kreće se od 23 do 65%, a specifičnost od 88 do 100% (27).

Klasična laboratorijska dijagnostika *Neisseriae gonorrhoeae* predstavlja izazov jer je ova bakterija vrlo osjetljiv i zahtjevan mikroorganizam te je potrebno zadovoljiti stroge uvjete transporta i obrade uzorka. Najbolje je uzorak uzimati u laboratoriju tako da se odmah nakon uzimanja može nasaditi na selektivne hranjive podloge. Ako to nije moguće, uzorak treba staviti u jednu od transportnih podloga, međutim, vrijeme transporta ne bi smjelo biti duže od 6 sati. Metoda kultivacije traje od 48 do 72 sata (28, 29).

Svi molekularni testovi opisani kod dijagnostike *Chlamydiae trachomatis*, osim odvojenog testiranja *Chlamydiae trachomatis* ili *Neisseriae gonorrhoeae*, nude mogućnost istodobne detekcije obaju uzročnika (9-12). Zbog visoke osjetljivosti ovih metoda njima se kod diseminirane gonokokne infekcije mogu dijagnosticirati gonokoki iz kožnih lezija i zglobove tekućine. Naime, zbog malog broja uzročnika u ovim uzorcima, direktni preparat i kultura nisu dovoljno osjetljivi. Iz istog razloga molekularne metode rabe se za dijagnostiku infekcija u asimptomatskih osoba te iz neinvazivnih uzoraka koji sadržavaju nižu koncentraciju uzročnika (npr. urin) (30).

Kultura ostaje i dalje nezaobilazna metoda u laboratoriji-ma koji nemaju molekularnu dijagnostiku, kao i za određivanje osjetljivosti na antibiotike (posebno u područjima koja imaju visoku rezistenciju).

Genitalne mikoplazme

Od velikog broja različitih mikoplazma, u genitalnom i respiratornom traktu nalazimo 16 različitih vrsta. Kao genitalne mikoplazme najčešće se navode *Mycoplasma (M.) hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma (U.) urealyticum* i *Ureaplasma parvum* (31).

Smatra se da su genitalne mikoplazme povezane s različitim infekcijama genitourinarnog trakta, poremećajima funkcije reproduktivnog trakta, kao i s morbiditetom i mortalitetom u novorođenčadi.

Zahvaljujući velikoj učestalosti genitalnih mikoplazma u zdravih osoba, teško je dokazati njihovu ulogu u etiologiji mnogih bolesti. Osim toga, izolacija *M. genitalium* vrlo je zahtjevna i dugotrajna te je tek pojava molekularnih tehnika omogućila detekciju ove bakterije u dijagnostici infekcija, kao i u istraživačke svrhe.

M. hominis, *U. urealyticum* i *U. parvum* mogu se uzgajati u tekućim i na krutim hranjivim podlogama koje moraju biti obogaćene svježim ekstraktom kvasca i konjskim serumom (32). Međutim, optimalna izolacija mikoplazma, kao i *C. trachomatis*, zahtijeva stroge uvjete transporta i pohrane. Danas postoje molekularni testovi koji osim *M. genitalium* detektiraju i ove mikoplazme; među njima i testovi koji detektiraju različite mikoplazme u jednoj reakciji (multiplex PCR) (33). Zbog teškoća u izolaciji *M. genitalium*, molekularni testovi su glavni način dijagnostike ove bakterije. U ovom trenutku postoje različiti *in house* PCR-testovi (konvencionalni i PCR-testovi u realnom vremenu) za dijagnostiku *M. genitalium*. Ovi PCR-testovi razlikuju se u ciljnim sekvencama, izolacijskim tehnikama, detekcijskim metodama nakon amplifikacije, provođenju interne kontrole te stoga imaju različitu osjetljivost i specifičnost (34-38). Stoga se podaci dobiveni u različitim istraživanjima teško mogu uspoređivati. Nedavno su razvijeni molekularni testovi za detekciju genitalnih mikoplazma iz urina koji se baziraju na kombinaciji PCR-metode i hibridizacije u mikrotitarskoj pločici (39). Kao alternativnu metodu PCR-u, Gene-Probe Inc. (San Diego, CA) razvio je TMA-test za detekciju *M. genitalium*. Ciljna sekvenca u ovom testu je rRNA, molekula koja ima multiple kopije u svakoj stanici. Na taj način povećana je osjetljivost ovog testa u odnosu na PCR (37, 38).

TaqMan PCR-test koji omogućuje detekciju i kvantifikaciju, evaluiran je osim za *M. genitalium* i za ostale genitalne mikoplazme (40).

Izbor optimalnog uzorka može varirati ovisno o metodi izolacije (sample preparation method) koja se rabe u pojedini laboratoriju. U jednom velikom istraživanju prvi mlaz urina, kao i kod *C. trachomatis*, pokazao se boljim uzorkom od obriska uretre. Međutim, ovaj nalaz može biti samo odraz veće količine uzorka koji se rabio za izolaciju.

Kod žena, uzimanje više uzoraka odjednom (npr. cervikalnog obriska i urina) može povećati osjetljivost testa.

Za sada ne postoje komercijalni testovi koji imaju odobrenje Američke uprave za hranu i lijekove (FDA) ili koji zadovoljavaju europske standarde kvalitete (CE), iako su testovima za istraživanje postignuti obećavajući rezultati. Vjerojatno će se uskoro ovakvi testovi pojaviti na tržištu, a do tada je važno da rutinski dijagnostički laboratoriji aktivno sudjeluju u programima vanjske kontrole kvalitete rada, radeći kliničke uzorke, prije nego molekularne metode počnu rabiti za rutinsku dijagnostiku.

Trichomonas vaginalis

Trichomonas vaginalis jedan je od najčešćih uzročnika vaginitisa (uz *Candida spp.* i bakterije koje dovode do bakterijske vaginoze). Trihomonijaza je najčešća parazitarne spolno prenosiva bolest u svijetu. Osim vaginitisa u žena uzrokuje cervicitis i uretritis te može dovesti do preranog poroda. U muškaraca uzrokuje uretritis, prostatitis, međutim, infekcija je najčešće asimptomatska (40-42) (v. članak o trihomonijazi u ovom broju).

Tradicionalne metode dijagnostike *Trichomonasa vaginalis* baziraju se na dokazivanju uzročnika u sekretima iz genitalnog trakta nativnim mikroskopskim preparatom ili kulturom. Za obje metode potreban je vijabilan mikroorganizam, što zahtijeva mikroskopiranje, odnosno nasađivanje uzorka neposredno nakon uzimanja ili stroge uvjete transporta u nekom od transportnih medija (43). Uz sve to obje metode imaju nisku osjetljivost, posebno nativni preparat (~30%) (44-46).

Danas postoje različiti *in house* i komercijalni testovi bazirani na amplifikaciji nukleinskih kiselina koji su se u kliničkim ispitivanjima pokazali značajno osjetljivijim od kulture (APTIMA *Trichomonas vaginalis* ASR, Gen-Probe Inc., SAD), metoda amplifikacije potaknute transkripcijom (46-48). Očekuje se da će uskoro dobiti odobrenje Američke uprave za hranu i lijekove (FDA) za uporabu u rutinskoj dijagnostici. Postoje i testovi koji se u ovom trenutku rabe u istraživanjima. To su PCR-testovi u realnom vremenu (BTUB PCR, Roche Diagnostics, SAD i *Trichomonas vaginalis* Real-TM, Sacace Biotechnologies, Italija) (49).

Humani papilomavirusi

Infekcija humanim papilomavirusima (HPV) najčešća je spolno prenosiva infekcija (50, 51). To su DNK-virusi koji pokazuju afinitet za pločasti epitel. Prirodni tijek infekcije najčešće je supklinički s rijetkim, ali ozbiljnim posljedicama.

Najvažnija posljedica infekcije HPV-om je karcinom vrata maternice, kojemu prethode premaligne lezije, po Richardovoj klasifikaciji nazvane cervikalna intraepitelna neoplazija (CIN) (52-55).

Probir (screening) za karcinom vrata maternice tradicionalno je baziran na citološkoj detekciji premalignih promjena,

koje se relativno lako liječe, bez ozbiljnijih posljedica na reproduktivno zdravlje. S obzirom na uzročnu vezu perzistentnih infekcija genotipovima visokog rizika HPV-a (hrHPV) i karcinoma vrata maternice, zaključeno je da uvođenje testova za detekciju hrHPV-a može poboljšati algoritam za screening karcinoma vrata maternice (56-58).

U ovom trenutku indikacije za primjenu ovog testa su ove:

1. kao primarni screening uz dodatak citologiji za žene iznad 30 godina;
2. za praćenje žena svih dobni skupina čija je citološka dijagnoza ASC-US (Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance);
3. te za praćenje žena nakon konizacije, odnosno kirurškog liječenja zbog CIN-a ili invazivnog karcinoma. U praćenju ovih žena testiranje hrHPV-a pokazalo se osjetljivijom metodom nego citologija (59, 60).

HPV se razmnožavaju u terminalno diferenciranim epitelnim stanicama i zato se ne mogu uzgajati u staničnoj kulturi (61). Zbog toga se danas svi testovi za dijagnostiku HPV-a baziraju na detekciji virusne nukleinske kiseline (62). Razvijeni su brojni testovi za dijagnostiku HPV-a koji rabe različite molekularne metode. Svaki od njih ima prednosti i nedostatke te indikacije za koje je namijenjen. Mogu se podijeliti na različite načine:

1. ovisno o metodi: na amplifikacijske i hibridizacijske;
2. ovisno o tome da li samo detektiraju prisutnost hrHPV-a ili se njima određuje pojedini genotip: na detekcijske i genotipizacijske;
3. ovisno o tome da li samo detektiraju prisutnost virusa ili se njima određuje i količina virusa: na kvalitativne i kvantitativne;
4. te jesu li testovi komercijalni ili *in house*.

Za screening u kliničkim laboratorijima najčešće se rabe komercijalni kvalitativni testovi namijenjeni za detekciju genotipova visokog rizika:

- a) hibridizacijski testovi s amplifikacijom signala (Digene Hybrid Capture Test, Digene, SAD);
- b) testovi bazirani na amplifikaciji nukleinskih kiselina (Amplicor HPV Test, Roche Diagnostics, SAD).

Digene Hybrid Capture Test temelji se na metodi tekućinske hibridizacije. To je trenutačno jedini test za dijagnostiku infekcije HPV-om koji uz zadovoljavanje europskih standarda kvalitete (CE) ima odobrenje Američke uprave za hranu i lijekove (FDA) za uporabu u rutinskoj dijagnostici. 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 pojedinoga genotipa nije moguća. Ovim testom detektira se čak 1 pg HPV DNK/ml; njegova osjetljivost i specifičnost gotovo se mogu uspoređivati s PCR-om. Prednost ovog testa je relativno jednostavna izvedba i dobra reproducibilnost rezultata (63).

Amplicor HPV Test baziran je na kombinaciji amplifikacije nukleinskih kiselina (PCR) i hibridizacije. Ciljna sekvenca je dio gena L1 koji omogućuje umnožavanje širokog spek-

12. VAN DER POL B, MARTIN DH, SCHACHTER J i sur. Enhancing the Specificity of the COBAS AMPLICOR CT/NG Test for *Neisseria gonorrhoeae* by Retesting Specimens with Equivocal Results. *J Clin Microbiol* 2001; 39(9): 3092-8.
13. MARTIN DH, CAMMARATA C, VAN DER POL B, JONES RB i sur. Multicenter Evaluation of AMPLICOR and Automated COBAS AMPLICOR CT/NG Tests for *Neisseria gonorrhoeae*. *J Clin Microbiol* 2000; 38(10): 3544-9.
14. JALAL H, AL-SUWAINE A, STEPHEN H i sur. Comparative performance of the Roche COBAS Amplicor assay for diagnosis of *Chlamydia trachomatis* Infection. *J Med Microbiol* 2007; 56: 320-2.
15. MAGBANUA J, PAOLO V, GOH BT, MICHEL C-E i sur. *Chlamydia trachomatis* variant not detected by plasmid based nucleic acid amplification tests: molecular characterisation and failure of single dose azithromycin. *Sex Transm Inf* 2007; 83: 339-43.
16. HADAD R, FREDLUND H, UNEMO M. Evaluation of the new COBAS TaqMan CT Test v2.0 and the impact on the proportion of the new variant of *Chlamydia trachomatis* (nvCT) by introduction of diagnostics detecting nvCT (LightMix 480HT PCR) in Örebro county, Sweden. *Sex Transm Infect*. Published Online First: 5 December 2008.
17. KHRYANIN AA, RESHETNIKOV OV, VLASPOLDER V. Comparison of APTIMA COMBO 2 assay with polymerase chain reaction Roche assay for detection of *Chlamydia trachomatis* in endocervical swabs 2007. *Int Jour STD & AIDS*; 18: 871-2.
18. CHERNESKY M, JANG D, LUINSTR A K i sur. High analytical sensitivity and low rates of inhibition may contribute to detection of *Chlamydia trachomatis* in significantly more women by the APTIMA Combo 2 assay. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 400-5.
19. SKIDMORE S, HORNER P, MALLINSON H. Testing specimens for *Chlamydia trachomatis*. *Sex Transm Inf* 2006; 82: 272-5.
20. RIPA T, NILSSON P. A variant of *Chlamydia trachomatis* with deletion in cryptic plasmid: implications for use of PCR diagnostic. *Euro Surveill* 2006; E061109.2.
21. RIPA T, NILSSON P. A *Chlamydia trachomatis* Strain With a 377-bp Deletion in the Cryptic Plasmid Causing False-Negative Nucleic Acid Amplification Tests. *Sex Transm Dis* 2007; 34(5): 255-6.
22. MARIONS L, ROTZEN-OSTLUND M, GRILLNER L i sur. High occurrence of a new variant of *Chlamydia trachomatis* escaping diagnostic tests among STI clinic patients in Stockholm, Sweden. *Sex Transm Dis* 2008; 35(1): 61-4.
23. HERRMANN B, TÖRNER A, LOW N i sur. Emergence and spread of *Chlamydia trachomatis* variant, Sweden. *Emerg Infect Dis* 2008; 14 (9): 1462-5.
24. ALEXANDER S, ISON C. Is new variant *Chlamydia trachomatis* present in England and Wales? *Sex Transm Inf* 2008; 84: 29-31.
25. VAN DE LAAR M, ISON C. Europe-wide investigation to assess the presence of new variant *Chlamydia trachomatis* in Europe. *Euro Surveill* 2007; 12: E070201.2.
26. WESTH H, JENSEN JS. Low prevalence of the new variant of *Chlamydia trachomatis* in Denmark. *Sex Transm Inf* 2008; 84: 546-7.
27. McMILLAN A. GONORRHOEA. U: McMillan A, Young H (ur.) *Clinical Practice in Sexually Transmissible Infections*. Edinburgh:Saunders:2002.
28. HUMAN RP, JONES GA. Survival of bacteria in swab transport packs. *Med Lab Sci* 1986;43:14-8.
29. EBRIGHT JR, SMITH KE, DREXLER L i sur. Evaluation of modified Stuart's medium in culturettes for transport of *Neisseria gonorrhoeae*. *Sex Transm Dis* 1982;9:44-7.
30. LUJIT DS, BOS P. A. J, VAN ZWET AA, VAN VOORST VADER PC, SCHIRM J. Comparison of COBAS AMPLICOR *Neisseria gonorrhoeae* PCR, Including Confirmation with *N. gonorrhoeae*-Specific 16S rRNA PCR with Traditional Culture. *J Clin Microbiol* 2005;43(3):1445-7.
31. RIEMERSMA WA, VAN DER SCHEE CJC, VAN DER MEIJDEN WI i sur. Microbial Population Diversity in the Urethras of Healthy Males and Males Suffering from Nonchlamydial, Nongonococcal Urethritis. *J Clin Microbiol* 2003; 41(5): 1977-86.
32. McMILLAN A, BALLARD RC. Non-specific genital tract infection and chlamydial infection, including lymphogranuloma venereum. U: McMillan A, Young H (ur.) *Clinical Practice in Sexually Transmissible Infections*. Edinburgh:Saunders:2002.
33. STELLRECHT KA, WORON AM, MISHRIK NG, VENEZIA RA. Comparison of Multiplex PCR Assay with Culture for Detection of Genital Mycoplasmas. *J Clin Microbiol* 2004; 42(4): 1528-33.
34. 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.
35. JENSEN JS, BJÖRNELIUS E, DOHN B, LIDBRINK P. Use of TaqMan 5' Nuclease Real-Time PCR for Quantitative Detection of *Mycoplasma genitalium* DNA in Males with and without Urethritis Who Were Attendees at a Sexually Transmitted Disease Clinic. *J Clin Microbiol* 2004; 42(2): 683-92.
36. HAMASUNA R, OSADA Y, JENSEN JS. Antibiotic Susceptibility Testing of *Mycoplasma genitalium* by TaqMan 5' Nuclease Real-Time PCR. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49(12): 4993-8.
37. WROBLEWSKI JKH, MANHART LE, DICKEY KA i sur. Comparison of Transcription-Mediated Amplification and PCR Assay Results for Various Genital Specimen Types for Detection of *Mycoplasma genitalium*. *J Clin Microbiol* 2006;44(9):3306-12.
38. HARDICK J, GILES J, HARDICK A, HSIEH YH, GAYDOS C. Performance of the gen-probe transcription-mediated [corrected] amplification research assay compared to that of a multitarget real-time PCR for *Mycoplasma genitalium* detection. *J Clin Microbiol* 2006;44(4):1236-40.
39. YOSHIDA T, MAEDA S, DEGUCHI T i sur. Rapid detection of *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma parvum*, and *Ureaplasma urealyticum* organisms in genitourinary samples by PCR-microtiter plate hybridization assay. *J Clin Microbiol* 2003; 41(5): 1850-5.
40. YOSHIDA T, DEGUCHI T, MEDA S i sur. Quantitative detection of *Ureaplasma parvum* (biovar 1) and *Ureaplasma urealyticum* (biovar 2) in urine specimens from men with and without urethritis by real-time polymerase chain reaction. *Sex Transm Dis*. 2007 Jun; 34(6): 416-9.
41. GRAVES A, GARDNER WA JR. Pathogenicity of *Trichomonas vaginalis*. *Obstet Gynecol* 1993; 36(1): 145-52.
42. KRIEGER JN. Trichomoniasis in men: Old issues and new data. *Sex Transm Dis* 1995; 22: 83-96.
43. BEVERLY AL, VENGLARIK M, COTTON B i sur. Viability of *Trichomonas vaginalis* in transport medium. *J Clin Microbiol* 1999;37:3749-50.
44. LOSSICK JC, KENT HL. Trichomoniasis: trends in diagnosis and management. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 165: 1217-22.

45. BORCHARDT KA, ZHANG MZ, SHING H i sur. A comparison of the sensitivity of the InPouch TV, Diamond's, and Trichosol media for detection of *Trichomonas vaginalis*. *Genitourin Med* 1997;73:297-8.
46. 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. *CID* 2002;35:576-80.
47. HEINE RP, WIESENFELD HC, SWEET RL i sur. Polymerase chain reaction analysis of distal vaginal specimens: a less invasive strategy for detection of *Trichomonas vaginalis*. *Clin Infect Dis* 1997;24:985-7.
48. HARDICK A, HARDICK J, WOOD BJ, GAYDOS C. Comparison between the Gen-Probe Transcription-Mediated Amplification *Trichomonas vaginalis* Research Assay and Real-Time PCR for *Trichomonas vaginalis* Detection Using a Roche LightCycler Instrument with Female Self-Obtained Vaginal Swab Samples and Male Urine Samples. *J Clin Microbiol* 2006; 44(11): 4197-9.
49. HARDICK J, YANG S, LIN L i sur. Use of the Roche LightCycler Instrument in a real-time PCR for *Trichomonas vaginalis* in urine samples from females and males. *J Clin Microbiol* 2003; 41(12): 5619-22.
50. KOUTSKY L. Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Am J Med* 1997; 102: 3-8.
51. SCHIFFMAN MH. Epidemiology of cervical human papillomavirus infections. *Curr Top Microbiol Immunol* 1994; 186: 55-81.
52. BOSCH FX, MANOS MM, MUÑOZ N i sur. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 796-801.
53. SCHIFFMAN MH, BAUER HM, HOOVER RN i sur. Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85: 958-64.
54. WIELAND U, PFISTER H. Papillomaviruses in human pathology; epidemiology, pathogenesis and oncogenic role. U: Gross G, Barrasso, ur. Human papillomavirus infection. A Clinical Atlas. Berlin, Wiesbaden: Ullstein Mosby, 1997: 1-16.
55. RICHART RM. The patient with an abnormal smear: screening techniques and management. *N Engl J Med* 1980; 302: 332-4.
56. MUÑOZ N, BOSCH FX, DE SANJOSE S i sur. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003; 348: 518-27.
57. LORINCZ AT, REID R, JENSON AB i sur. Human papillomavirus infection of the cervix: relative risk associations of 15 common anogenital types. *Obstet Gynecol* 1992; 79: 328-37.
58. ZEHBE I, WILANDER E. Human papillomavirus infection and invasive cervical neoplasia: a study of prevalence and morphology. *J Pathol* 1997; 181: 270-5.
59. LORINCZ AT, RICHART RM. Human papillomavirus DNA testing as an adjunct to cytology in cervical screening programs. *Arch Path & Lab Med* 2003; 127: 959-68.
60. DALSTEIN V, RIETHMULLER D, SAUTIERE JL i sur. Detection of cervical precancer and cancer in a hospital population: benefits of testing for human papillomavirus. *Eur J Cancer* 2004; 40: 1225-32.
61. BEUTNER KR, TYRING S. Human papillomavirus and human disease. *Am J Med* 1997;102:9-15.
62. MANOS MM, GRAVITT PE. Nucleic acid hybridization methods to detect microorganisms. *Lab Anim Sci* 1993;43:5-10.
63. CLAVEL C, MASURE M, LEVERT M i sur. 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.
64. HALFON P, TREPO E, ANTONIOTTI G i sur. Prospective evaluation of The Hybrid Capture 2 and Amplicor human papillomavirus (HPV) test for detection of 13 high-risk HPV genotypes in atypical squamous cells of uncertain significance. *J Clin Microbiol* 2007; 45(2): 313-16.
65. TROFFATER KF. Diagnosis of human papillomavirus genital tract infection. *Am J Med* 1997;102:21-27.
66. 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.
67. RESNICK RM, CORNELISSEN MT, WRIGHT DK i sur. 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.
68. BERNARD H-U, CHAN S-Y, MANOS MM i sur. 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.
69. 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.
70. RADY PL, CHIN R, ARANY I i sur. Direct sequencing of consensus primer generated PCR fragments of human papillomavirus. *J Virol Methods* 1993;43:335-50.
71. YONGTAEK O, SU MI B, YONG-WAN K i sur. Polymerase chain reaction-based fluorescent Luminex assay to detect the presence of human papillomavirus types. *Cancer Sci* 2007; 98(4): 549-54.
72. SCHMITT M, BRAVO IG, SNIJDERS PJF i sur. Bead-Based Multiplex Genotyping of Human Papillomaviruses. *Clin Microbiol* 2006; 44(2): 504-12.

Adresa za dopisivanje:

Prim. dr. sc. Lidija Žele Starčević, dr. med.
 Klinički zavod za kliničku i molekularnu mikrobiologiju
 Kliničkoga bolničkog centra Zagreb i
 Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
 10000 Zagreb, Kišpatičeva 12
 e-mail adresa: lidija.zele@zg.t-com.hr

Primljeno / Received

20. 12. 2008.
 December 20, 2008

Prihvaćeno / Accepted

8. 7. 2009.
 July 8, 2009



Bisolex[®]

Pobjeđuje kašalj!

Bisolex klinički dokazano pobjeđuje 'mokri', produktivni kašalj, pospješuje iskašljavanje i čišćenje bronhija te olakšava disanje. Dostupan je u obliku otopine, sirupa, tableta i Forte tableta što ga čini jedinstvenim lijekom izbora za cijelu obitelj.



Zajedno prema zdravlju  PLIVA

Prije upotrebe pažljivo pročitati uputu o lijeku. Za obavijesti o indikacijama, mjerama opreza i nuspojavama upitajte svog liječnika ili ljekarnika.