

Molekularna dijagnostika spolno prenosivih infekcija

Molecular Diagnostics of Sexually Transmitted Infections

Snježana Židovec Lepej, Adriana Vince

Klinika za infektivne bolesti "Dr. Fran Mihaljević"

10000 Zagreb, Mirogojska c. 8

Sažetak Metode molekularne dijagnostike dio su rutinskoga dijagnostičkog algoritma spolno prenosivih infekcija. Molekularna dijagnostika spolno prenosivih infekcija u kliničkim laboratorijima uglavnom se temelji na primjeni standardiziranih amplifikacijskih molekularnih testova. Najčešće se rabe metode lančane reakcije polimerazom (polymerase chain reaction, PCR), PCR u realnom vremenu (real-time PCR), tekućinska hibridizacija (hybrid capture), amplifikacija posredovana transkripcijom (transcription-mediated amplification) i tehnologija izmjene lanaca (strand displacement technology). Primjenom ovih metoda možemo detektirati uzročnike spolno prenosivih infekcija u različitim biološkim uzorcima, tj. obriscima cerviksa, vagine, uretre i u urinu.

Ključne riječi: spolno prenosive infekcije, molekularna dijagnostika, PCR, hibridizacija

Summary Molecular methods are a part of the routine diagnostic algorithm for sexually transmitted infections. Molecular diagnosis of sexually transmitted infections in routine clinical laboratories is based on standardized amplification assays. The majority of assays are based on polymerase chain reactions (PCR), real-time PCR, soluble hybridization, transcription-mediated amplification, and strand displacement technology. Molecular methods enable us to test a variety of biological samples including cervical, vaginal, and urethral swabs, as well as urine.

Key words: sexually transmitted infections, molecular diagnostics, PCR, hybridization

Molekularna dijagnostika spolno prenosivih infekcija

Metode molekularne dijagnostike danas su neizostavni dio rutinske dijagnostike spolno prenosivih infekcija. Molekularne metode su brze, specifične, osjetljive, omogućuju detekciju uzročnika infekcija koji se ne mogu uspješno kultivirati. Primjenom molekularnih metoda mogu se dokazati uzročnici infekcija čak i tijekom antimikrobnog liječenja.

U kliničkim se laboratorijima najčešće rabe standardizirani molekularni testovi koji zadovoljavaju europske i američke standarde kvalitete (CE certifikat, odobrenje Američke uprave za hranu i lijekove, tj. FDA). U standardiziranim se testovima najčešće rabe metode lančane reakcije polimerazom (polymerase chain reaction, 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). U ovom preglednom članku bit će opisani standardizirani molekularni testovi za detekciju *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, humanih papilomavirusa (HPV), herpes simpleks virusa tipa 1 i 2 (HSV-1/2), streptokoka grupe B, kao i molekularni test za dijagnostiku uzročnika vaginitisa (*Gardnerella vagi-*

nalis, *Trichomonas vaginalis* i *Candida albicans*). Primjena standardiziranih molekularnih testova za detekciju *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* i HPV-a propisana je preporukama internacionalnih i nacionalnih stručnih društava koja se bave spolno prenosivim infekcijama.

Uz standardizirane molekularne metode, za detekciju nekih uzročnika spolno prenosivih infekcija (primjerice mikoplazme i ureaplazme) često se rabe *in house* testovi. Preduvjet primjene ovih testova u rutinskoj dijagnostici spolno prenosivih infekcija je detaljna analitička i klinička validacija.

Molekularni testovi omogućuju detekciju uzročnika spolno prenosivih infekcija u različitim biološkim uzorcima, najčešće obriscima cerviksa, vagine, uretre, kao i u urinu.

Molekularna dijagnostika urogenitalnih infekcija

C. trachomatis i *N. gonorrhoeae*

Svjetska zdravstvena organizacija procjenjuje da su *C. trachomatis* i *N. gonorrhoeae* najčešći uzročnici spolno prenosivih infekcija u svijetu (1). S obzirom na iznimno veliki postotak asimptomatskih genitalnih infekcija klamidijom tra-

homatis i najserijom gonoreje kao i na ozbiljne posljedice neliječenih infekcija (upalna bolest zdjelice, kronična bol u zdjelici, neplodnost i izvanmaternične trudnoće), brojne su biotehnoške tvrtke razvile osjetljive i specifične molekularne testove za detekciju ovih mikroorganizama (2, 3).

Europske preporuke za testiranje na *C. trachomatis* i *N. gonorrhoeae* sadržane su u dokumentu "European STD Guidelines" iz 2001. godine. Ovaj je dokument odobrio Europski odjel društva International Union against Sexually Transmitted Infection, kao i Europski ured Svjetske zdravstvene organizacije (4, 5). Brojne europske zemlje redovito donose svoje nacionalne preporuke za dijagnostiku i liječenje urogenitalnih infekcija *C. trachomatis* i *N. gonorrhoeae*. Primjer recentnih nacionalnih preporuka je dokument "2006 UK National Guideline for the Management of Genital Tract Infection with *Chlamydia trachomatis*" (6). Američke preporuke za testiranje *C. trachomatis* i *N. gonorrhoeae* sadržane su u dokumentu "Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines" koje je 2006. godine izradio CDC (7).

Urogenitalne infekcije *C. trachomatis* i *N. gonorrhoeae* u žena dokazuju se analizom obrisaka cerviksa odnosno vagine, kao i testiranjem urina.

Detekcija *C. trachomatis* metodom kultivacije u kombinaciji s primjenom protutijela specifičnih za MOMP (major outer membrane protein) dugo je godina bila zlatni standard rutinske dijagnostike za urogenitalne uzorke zbog 100%-tne specifičnosti (8). Međutim, osjetljivost metode kultivacije u usporedbi s molekularnim amplifikacijskim metodama vrlo je niska i varijabilna i iznosi samo 40–85% (6, 9). Brojni literaturni podatci nedvojbeno dokazuju da su amplifikacijski molekularni testovi najosjetljivije metode za dijagnostiku urogenitalnih infekcija *C. trachomatis* i *N. gonorrhoeae* (10–17). Danas su molekularne metode (hibridizacijski i amplifikacijski testovi) standard rutinske dijagnostike urogenitalnih infekcija *C. trachomatis* u žena i muškaraca (4, 6, 7), dok se metoda kultivacije (u svrhu genotipizacije izolata i određivanja rezistencije na antimikrobne lijekove) izvodi u specijaliziranim referentnim laboratorijima.

Laboratorijska dijagnostika *N. gonorrhoeae* temelji se na identifikaciji ovog mikroorganizma u genitalnim, faringalnim ili okularnim sekretima. Europske preporuke o liječenju gonoreje propisuju da se svi uzorci moraju testirati metodama specifične dijagnostike (kultivacija, hibridizacijski testovi, amplifikacijski testovi) (5). Molekularnim amplifikacijskim testovima može se analizirati najširi spektar bioloških uzoraka: obrisci cerviksa, vagine i uretre te urin, a posebno su važni za dokazivanje infekcije u asimptomatskih muškaraca. Metoda kultivacije iznimno je važna zbog mogućnosti testiranja osjetljivosti izolata na antimikrobne lijekove, kao i za dokazivanje infekcije u rektumu i farinksu.

Većina komercijalnih molekularnih testova za detekciju *C. trachomatis* i *N. gonorrhoeae* omogućava i istodobno detekciju obaju mikroorganizama. Ciljna struktura većine komercijalnih molekularnih testova za *C. trachomatis* nalazi se u kriptičkom plazmidu, dok je ciljna sekvenca testova za detekciju *N. gonorrhoeae* najčešće gen Opa.

Molekularni amplifikacijski testovi dijele se u dvije veli-

ke skupine: testovi koji se temelje na metodi "klasičnog" PCR-a i testovi koji se temelje na metodi PCR-a u realnom vremenu.

Najčešće upotrebljavani "klasični" PCR-testovi za detekciju *C. trachomatis* i *N. gonorrhoeae* jesu COBAS AMPLICOR™ *Chlamydia trachomatis* Test i COBAS AMPLICOR™ *Neisseria gonorrhoeae* Test (Roche Diagnostics, SAD) (18–20). Ovi se testovi temelje na kombinaciji PCR-a i hibridizacije nukleinskih kiselina. Ciljna sekvenca za detekciju *C. trachomatis* veličine 207 nukleotida nalazi se u kriptičkom plazmidu koji je zajednički svim serovarima *C. trachomatis* (2). Stoga se primjenom ovih testova ne mogu detektirati varijante *C. trachomatis* koje su izgubile kriptički plazmid. Ciljna sekvenca za detekciju *N. gonorrhoeae* rabljena u ovom testu je konzervirana sekvenca MNgp PII veličine 1044 para baza koja kodira sintezu citozinske DNK metiltransferaze. Ova sekvenca je karakteristična za *N. gonorrhoeae* i ne nalazi se u većini negonokoknih *Neisseria*.

Najčešće upotrebljavani testovi za detekciju *C. trachomatis* i/ili *N. gonorrhoeae* koji se temelje na metodi PCR-a u realnom vremenu jesu Abbott RealTime™ CT/NG test, Abbott RealTime™ CT (Abbott Molecular, SAD) i COBAS TaqMan CT test (Roche Diagnostics, SAD).

Ciljne sekvence za detekciju *C. trachomatis* i *N. gonorrhoeae* u Abbott RealTime™ CT/NG testu nalaze se u kriptičkom plazmidu odnosno u genu Opa (17). Ciljna sekvenca za detekciju *C. trachomatis* primjenom COBAS TaqMan CT testa također se nalazi u kriptičkom plazmidu.

Jedini komercijalni PCR-test u realnom vremenu koji detektira dvije ciljne sekvence u *C. trachomatis* (jedna u kriptičkom plazmidu, a druga u dijelu kromosoma koji kodira sintezu MOMP-a) jest RealArt™ *C. trachomatis* PCR test (Qiagen, Njemačka). Stoga se primjenom ovog testa može detektirati i varijanta *C. trachomatis* s delecijom ukupno 377 parova baza u regiji kriptičkog plazmida koja je nedavno opisana u okrugu Halland na jugozapadu Švedske (21).

RealArt™ testovi postoje u četiri oblika koji su posebno prilagođeni za detekciju *C. trachomatis* na najčešće rabljenim aparatima za PCR u realnom vremenu. Tako postoje RealArt™ kitovi za LightCycler Instrument (Roche Diagnostics, SAD), Rotor-Gene (Corbett Research, SAD), ABI PRISM 7700 i 7900 (Applied Biosystems, SAD) i ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems, SAD).

Uz PCR-testove dostupni su nam i standardizirani molekularni testovi koji se temelje na drugim tehnologijama. Primjerice, često se rabe hibridizacijski testovi za detekciju *C. trachomatis* i *N. gonorrhoeae* Gen-Probe APTIMA Combo 2 (GEN PROBE Inc., SAD) i Hybrid Capture 2 *C. trachomatis* /*N. gonorrhoeae* Assay (Digene, SAD).

Gen-Probe APTIMA Combo 2 test omogućava *in vitro* kvalitativnu detekciju i razlikovanje ribosomske RNK (rRNK) *C. trachomatis* i/ili *N. gonorrhoeae* u obriscima cerviksa, vagine i uretre, kao i u urinu muškaraca i žena (19). Ovaj je test odobren za detekciju genitalnih infekcija *C. trachomatis* i/ili *N. gonorrhoeae* u asimptomatskih i simptomatskih bolesnika. Ciljne regije za amplifikaciju signala u ovim testovima nalaze se u 23S rRNK *C. trachomatis* i 16S rRNK u genu *N. gonorrhoeae*.

Biološki uzorci često sadržavaju inhibitore PCR-a. Najčešći inhibitori PCR-a u genitalnim obriscima su krv i spermicidi. U urinu, nepovoljan učinak na PCR najčešće imaju vitamini, minerali, analgetici i krv. Specifična izolacija rRNK u ovom testu omogućava uklanjanje rezidualnog matriksa uzorka koji sadržava niz inhibitora, što omogućava vrlo uspješno testiranje uzoraka koji često sadržavaju inhibitore, posebice urina.

Hybrid Capture 2 *C. trachomatis*/*N. gonorrhoeae* Assay (Digene, SAD) jest hibridizacijski molekularni test koji se temelji na kombinaciji vezanja specifičnog protutijela, hibridizacije nukleinskih kiselina i detekcije produkta kemiluminiscencijom (22).

Najčešće upotrebljavan molekularni test za detekciju *C. trachomatis* i *N. gonorrhoeae* koji se temelji na tehnologiji amplifikacije potaknute transkripcijom (u realnom vremenu) jest BD ProbeTec™ ET System (Becton Dickinson, SAD) (23). BD ProbeTec™ ET System je potpuno automatiziran. Ovaj je test prikladan za testiranje obrisaka cerviksa i uretre kao i urina asimptomatskih i simptomatskih zaraženih osoba.

Molekularna dijagnostika HPV-a

Humani papilomavirusi heterogena su grupa DNK virusa povezanih s nastankom benignih i malignih novotvorina višeslojnoga pločastog epitela (24). Genom HPV-a sastoji se od cirkularne dvolančane DNK veličine 7,9 kb. Do sada je opisano 97 genotipova HPV-a koji su detaljno karakterizirani na molekularnoj razini (25). Sukladno službenoj klasifikaciji papilomavirusa (De Villiers i sur. iz 2004.), humani papilomavirusi ubrajaju se u rodove alfa, beta, gama, nu i mu papilomavirusa (24).

Kultivacija HPV-a u staničnim kulturama *in vitro* nije moguća. Stoga se dijagnoza aktivne infekcije ovim virusima temelji na detekciji HPV DNK metodama molekularne dijagnostike. Molekularna dijagnostika/analiza HPV-a sastoji se od: (1) kvalitativnih testova za detekciju HPV DNK (2) genotipizacijskih testova i (3) sekvenciranja DNK i filogenetske analize sekvenci HPV-a. U sklopu rutinske dijagnostike primjenjuju se kvalitativni testovi za detekciju HPV DNK.

Indikacije za primjenu kvalitativnih testova za detekciju HPV DNK su: (1) dijagnostičko praćenje žena s ASCUS-om (Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance) (2) dijagnostičko praćenje žena s CIN-om ili karcinomom vrata maternice nakon liječenja (test izlječenja) i (3) kao primarni pretražni test u žena starijih od 30 godina (7).

Kvalitativni testovi za detekciju HPV DNK temelje se na različitim metodama molekularne dijagnostike. U kliničkim laboratorijima najčešće se rabe testovi amplifikacije signala (hibridizacijski test Digene HPV test, Digene, SAD) i testovi amplifikacije nukleinskih kiselina (PCR test Amplicor HPV Test, Roche Diagnostics, SAD). Za kvalitativnu detekciju HPV DNK mogu se rabiti i metode PCR-a u realnom vremenu (Reveal HPV Real-time Detection kit, GenOLD, SDA), hibridizacije *in situ* (Inform HPV test, Ventana, SAD; Gen-Point Assay, Dako, Danska, InPath In-Cell HPV test, Inviri-

on, Njemačka) i NASBA (PreTec HPV-Proofer, Norchip, Norveška). Kvalitativni testovi za detekciju HPV DNK većinom omogućavaju detekciju genotipova HPV-a koji su povezani s visokim rizikom od nastanka raka vrata maternice (16/18/31/33/35/39/45/51/52/56/58/59/68), dok samo neki testovi omogućavaju i detekciju niskorizičnih genotipova (6/11/42/43/44) (26).

Digene HPV Test (Hybrid Capture 2, Digene, SAD) jedini je kvalitativni test za detekciju HPV DNK za koji ima Conformité Européenne (CE) certifikat kvalitete i odobrenje Američke uprave za hranu i lijekove i za koji postoje dostatni dokazi o korisnosti kliničke primjene (7). Primjenom ovog testa u biološkim se uzorcima može dokazati HPV DNK jednog ili više visokorizičnih genotipova HPV-a, a postoji i mogućnost detekcije DNK niskorizičnih genotipova HPV-a. Ovaj se test temelji na metodi tekućinske hibridizacije primjenom koktela specifičnih RNK proba te enzimskoj amplifikaciji signala. S obzirom na analitičku osjetljivost metode hibridizacije treba istaknuti da negativan rezultat Digene HPV testa znači da je količina HPV DNK u uzorku manja od 1 pg po ml (5.000 kopija), tj. niža od količine HPV DNK koja se povezuje s rizikom od nastanka karcinoma vrata maternice u periodu praćenja do 10 godina.

Amplicor HPV test (Roche Diagnostics, SAD) kvalitativni je molekularni test koji se temelji na kombinaciji PCR-a i hibridizacije nukleinskih kiselina i kojim se u biološkom uzorku dokazuje prisutnost DNK jednog ili više visokorizičnih genotipova HPV-a. Ovaj test ima CE certifikat kvalitete. Ciljna sekvenca ovog testa je L1 regija genoma, a primjenom odabranih početnica nastaje PCR-produkt veličine 165 pb. U ovom se PCR-testu nalazi i interna kontrola (β -globinski gen) koja omogućava kontrolu kvalitete izolacije i amplifikacije DNK čime ovaj test zadovoljava sve kriterije za primjenu u rutinskoj dijagnostici. Tijekom 2006. i 2007. godine objavljen je niz radova u kojima je dokazana klinička korisnost primjene ovog testa (27-29).

Genotipizacija HPV-a omogućuje točnu identifikaciju genotipa/genotipova virusa koji se nalaze u biološkim uzorcima. Genotipizacija HPV-a u istraživačkim laboratorijima uglavnom se temelji na primjeni *in house* molekularnih metoda. Međutim, dostupnost komercijalnih standardiziranih testova omogućila je genotipizaciju HPV-a u rutinskim kliničkim laboratorijima. Najčešće rabljeni standardizirani genotipizacijski testovi su Linear Array HPV Genotyping Test (Roche Diagnostics, SAD) koji omogućava detekciju 37 genotipova HPV-a i Inno-LIPA HPV genotyping assay (Innogenetics, Belgija) koji omogućava detekciju 16 genotipova HPV-a. Genotipizacijski testovi rabe se uglavnom za praćenje distribucije genotipova HPV-a u različitim grupama bolesnika i za sada nisu dio rutinske dijagnostike.

Molekularna dijagnostika HSV-1/HSV-2

Dijagnostika HSV-1/2 temelji se na metodama izolacije virusa, detekcije antigena, serološkim testovima i detekciji HSV-1/2 DNK.

Većina standardiziranih molekularnih testova za detekciju HSV-1/2 omogućuje istodobnu detekciju i genotipizaciju ovih virusa, a neki testovi i kvantifikaciju HSV DNK u uzorku.

U rutinskim kliničkim laboratorijima najčešće se rabe LightCycler HSV-1/2 Detection kit (Roche Diagnostics, SAD), artus HSV-1/2 PCR Kit (Qiagen, Njemačka) i Cepheid HSV ASR typing (Cepheid, SAD) koji su prilagođeni za različite aparate za PCR u realnom vremenu (Light Cycler tvrtke Roche, ABI PRISM 7000 SDS tvrtke Applied Biosystems, SmartCycler tvrtke Cepheid) (30-32). Primjenom ovih molekularnih testova možemo detektirati HSV-1/2 DNK u serumu, plazmi, cerebrospinalnoj tekućini i obriscima.

Molekularne metode za detekciju HSV-1/2 su specifične i vrlo osjetljive. Primjerice, granica detekcije artus HSV-1/2 PCR testa (Qiagen, SAD) na aparatu ABI PRISM 7000 SDS (Applied Biosystems, SAD) jest 0,9 kopija DNK/μl za HSV-1 i 0,5 kopija DNK/μl za HSV-2.

Molekularna dijagnostika uzročnika vaginitisa

Najčešći uzročnici vaginitisa su *Trichomonas vaginalis*, *Candida albicans* (uzročnik vaginalne kandidoze) i *Gardnerella vaginalis* (uzročnik bakterijske vaginoze, BV) (33).

Širu primjenu molekularnih metoda u dijagnostici vaginitisa omogućio je standardizirani test BD Affirm VPIII Microbial Identification Test (Beckton Dickinson Diagnostics, SAD) koji detektira tri najčešća uzročnika vaginitisa (*G. vaginalis*, *C. species* i *T. vaginalis*). Ovaj dijagnostički test temelji se na principu hibridizacije nukleinskih kiselina. Velika prednost ovog testa je gotovo potpuna automatizacija te brzina analize (testom se može analizirati 18 uzoraka za 60 minuta).

Bakterijsku vaginozu karakteriziraju kvalitativne promjene vaginalne flore pri kojima dominantne bakterije iz roda *Lactobacillus* zamjenjuju bakterije *G. vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, *Mobiluncus species*, *Bacteroides fragilis*, *Atopobium vaginae* i drugi gram-negativni štapići (33). U BD Affirm VPIII testu *G. vaginalis* je odabrana kao indikator bakterijske vaginoze, a test je prilagođen za detekciju isključivo klinički značajnog broja *G. vaginalis* ($>2 \times 10^5$ CFU/ml (colony forming units, CFU)).

Primjenom BD Affirm VPIII testa mogu se detektirati *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. kefyr*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* koje su najčešće povezane s vulvovaginalnom kandidozom. Granica detekcije *T. vaginalis* u ovom testu je 5×10^3 trihomonada/ml. Primjenjivost ovog testa dokazana je i u kliničkoj praksi (34).

Opisani su i brojni *in house* PCR-testovi za detekciju i kvantifikaciju *M. hominis*, *G. vaginalis* i *Lactobacillus* spp. u cervikovaginalnim lavatima (35), kao i višestruki *in house* PCR-testovi koji omogućuju istodobnu kvalitativnu detekciju *Mobiluncus mulieris*, *Mobiluncus curtisii*, *B. fragilis* i *G. vaginalis* u biološkim uzorcima (36).

Biotehnoške tvrtke danas se intenzivno bave razvojem standardiziranih molekularnih testova za detekciju *T. vaginalis* posebice u uzorcima koje pacijenti mogu samostalno prikupljati (urin, vaginalni obrisci). Standardizirani molekularni test za detekciju *T. vaginalis* tvrtke Gen-Probe Inc. (SAD) koji se temelji na metodi amplifikacije potaknute transkripcijom (TMA), tj. na detekciji 16S rRNK u fazi je kliničke validacije. Hardick i sur. (2006.) pokazali su da primjena ovog testa omogućuje uspješnu detekciju *T. vaginalis* u urinu muškaraca i vaginalnim obriscima žena (37). Opisano je i nekoliko *in house* metoda za detekciju *T. vaginalis* koje se uglavnom temelje na PCR-u u realnom vremenu i rabe se u istraživačke svrhe (38, 39).

Molekularna dijagnostika vaginalne i rektalne infekcije streptokokom grupe B

Infekcija streptokokom grupe B najčešći je uzročnik mortaliteta novorođenčadi i teških neonatalnih infekcija (sepsa, pneumonija, meningitis). Novorođenčad se može zaraziti tijekom porođaja ako je majka kolonizirana streptokokom grupe B (40, 41).

Brzi molekularni testovi koji se temelje na PCR-u u realnom vremenu omogućuju brzu detekciju streptokoka grupe B u porođajnom kanalu roditelja te ciljanu primjenu profilakse i uspješnu prevenciju infekcije novorođenčadi (42). Danas nam je dostupan i standardizirani dijagnostički molekularni test za detekciju streptokoka grupe B (Xpert GBS test, Cepheid, SAD). Detekcija streptokoka grupe B primjenom ovog testa traje samo 75 min, a zbog tehničke jednostavnosti izvedbe može se rabiti i kao *point-of-care* test. Usporedba rezultata Xpert GBS testa i metode kultivacije pokazala je 91,9%-tnu osjetljivost i 95,6%-tnu specifičnost ove molekularne metode.

Molekularna dijagnostika *Treponema pallidum*

Molekularne metode najčešće se rabe za tipizaciju *T. pallidum* temeljem analize sekvenci gena tpr E, tpr G, tpr J i arp (43, 44).

Opisano je i nekoliko *in house* metoda za detekciju *T. pallidum* konvencionalnim PCR-om i PCR-om u realnom vremenu koji imaju visoku specifičnost i osjetljivost te, u kombinaciji sa serološkim testovima, mogu biti korisni u dijagnostici primarnog i sekundarnog sifilisa (45-47). Ciljna struktura većine PCR-testova za detekciju *T. pallidum* je polA, tj. segment gena koji kodira sintezu polimeraze I.

Molekularna dijagnostika mikoplazma i ureaplazma

Molekularna dijagnostika mikoplazma i ureaplazma temelji se na primjeni *in house* PCR-testova, PCR-testova u realnom vremenu, kao i kombinaciji PCR-a i hibridizacije na mikrotitracijskim pločicama. Molekularnim se testovima najčešće dokazuju nukleinske kiseline *M. genitalium*, *M. hominis*, *Ureaplasma parvum* i *Ureaplasma urealyticum*, a opisani su i višestruki PCR-testovi koji omogućavaju istodobnu detekciju ovih mikroorganizama. U rutinskim se laboratorijima primjenjuju i testovi za detekciju genoma *M. genitalium*, *M. hominis*, *U. parvum* i *U. urealyticum* u urinu muškaraca koji se temelje na kombinaciji PCR-a i hibridizacije (48, 49).

S obzirom na zahtjevnost i nisku osjetljivost metode kulture za *M. genitalium*, nastoji se razviti standardizirani molekularni test za detekciju nukleinske kiseline upravo ovog mikroorganizma. U laboratorijima se najčešće primjenjuju različiti *in house* PCR-testovi (konvencionalni PCR-testovi i

PCR-testovi u realnom vremenu) (50, 51). Osim PCR-testova, razvijen je i TMA-test za detekciju *M. genitalium* tvrtke Gen-Probe Inc. (SAD). Klinička evaluacija ovog testa koji se temelji na detekciji rRNK pokazala je da se uspješno može primijeniti za dokazivanje infekcije *M. genitalium* u obriscima vagine i cerviksa, kao i u urinu (50).

Nedavno su Cao i sur. 2007. godine evaluirali i dva TaqMan PCR-testa koji omogućavaju detekciju i kvantifikaciju *U. parvum* i *U. urealyticum* u kliničkim uzorcima (52).

Zaključak

Standardizirani molekularni testovi danas su metoda izbora za dijagnostiku uzročnika spolno prenosivih infekcija u kliničkim laboratorijima zbog brzine, vrlo visoke osjetljivosti i specifičnosti. Algoritmi primjene ovih testova propisani su nacionalnim i internacionalnim preporukama, koje se temelje na poznavanju epidemioloških i kliničkih podataka o prevalenciji i incidenciji spolno prenosivih infekcija u pojedinim zemljama.

Literatura

- Centers for Disease Control and Prevention. Sexually Transmitted Disease Surveillance, 2004. Atlanta GA. U.S. Department of Health and Human Services, CDC. National Center for HIV, STD, and TB Prevention: 2005.
- PEIPERT JF. Genital chlamydial infections. *N Engl J Med* 2003; 349: 2424-30.
- RIDGWAY GL. *Chlamydia trachomatis* U: Begovac J, ur. Infektologija. Profil International, Zagreb 2006.
- BIGNEL CJ. European guideline for the management of chlamydial infection. *Int. J STD&AIDS* 2001; 12: 30-3.
- BIGNEL CJ. European guideline for the management of gonorrhoea. *Int J STD&AIDS* 2001; 12: 27-9.
- HORNER PJ, BOAG F. 2006 UK national guideline for the management of genital tract infection with *Chlamydia trachomatis*. London (UK): British Association of Sexual Health and HIV (BASHH); 2006.
- Centers for Disease Control and Prevention. Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines, 2006. *MMWR*, 2006;55(No. RR-11):38.
- BLACK CM. Current methods of laboratory diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections. *Clin Microbiol Rev* 1997; 10: 160-84.
- CARROLL K. Use of molecular approaches for the diagnosis of common sexually transmitted diseases. Program and abstracts of the Annual Meeting of the American Society of Clinical Pathology; September 18-21, 2003; New Orleans, Louisiana.
- BLACK CM, MARRAZZO J, JOHNSON RE i sur. Head-to-head multicenter comparison of DNA probe and nucleic acid amplification tests for *Chlamydia trachomatis* infection in women performed with an improved reference standard. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 3757-63.
- GAYDOS CA, THEODORE M, DALESIO N i sur. Comparison of three nucleic acid amplification tests for detection of *Chlamydia trachomatis* in urine specimens. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 3041-5.
- MARTIN DH, CAMMARATA C, VAN DER POL B i sur. Multicenter evaluation of AMPLICOR and automated COBAS AMPLICOR CT/NG tests for *Neisseria gonorrhoeae*. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 3544-9.

13. VAN DER POL B, FERRERO DV, BUCK-BARRINGTON L i sur. Multicenter evaluation of the BDProbeTec ET system for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in urine specimens, female endocervical swabs, and male urethral swabs. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 1008-16.
14. VAN DER POL B, QUINN TC, GAYDOS CA i sur. Multicenter evaluation of the AMPLICOR and automated COBAS AMPLICOR CT/NG tests for detection of *Chlamydia trachomatis*. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 1105-12.
15. SCHACHTER J, CHOW JM, HOWARD H i sur. Detection of *Chlamydia trachomatis* by nucleic acid amplification testing: our evaluation suggests that CDC-recommended approaches for confirmatory testing are ill-advised. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 2512-17.
16. Department of Health. Sexual health and HIV strategy: *Chlamydia* Screening. London: DoH; 2003.
17. MARSHALL R, CHERNESKY M, JANG D i sur. Characteristics of the m2000 Automated Sample Preparation and Multiplex Real Time PCR System for the Detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *J Clin Microbiol* 2007; 45:747-51.
18. JALAL H, AL-SUWAINE A, STEPHEN H i sur. Comparative performance of the Roche COBAS Amplicor assay and an in-house real-time PCR assay for diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infection. *J Med Microbiol* 2007; 56: 320-2.
19. LOWE P, O'LOUGHLIN P, EVANS K i sur. Comparison of the Gen-Probe APTIMA Combo 2 assay to the AMPLICOR CT/NG for Detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in Urine Samples from Australian Men and Women. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 2619-21.
20. MUKENGE-TSHIBAKA L, ALARY M, BERNIER F i sur. Diagnostic performance of the Roche AMPLICOR PCR in detecting *Neisseria gonorrhoeae* in genitourinary specimens from female sex workers in Cotonou, Benin. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 4076-9.
21. RIPA T, NILSSON P. A variant of *Chlamydia trachomatis* with deletion in cryptic plasmid: implications for use of PCR diagnostic tests. *Euro Surveill* 2006; 11: E061109.2
22. DARWIN LH, CULLEN AP, CROWE SR i sur. Evaluation of the Hybrid Capture 2 CT/GC DNA tests and the GenProbe PACE 2 tests from the same male urethral swab specimens. *Sex Transm Dis* 2002; 29: 576-80.
23. VAN DER POL B, FERRERO DV, BUCK-BARRINGTON L i sur. Multicenter evaluation of the BDProbeTec ET system for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in urine specimens, female endocervical swabs, and male urethral swabs. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 1008-16.
24. DE VILLIERS EM, FAUQUET C, BROKER TR i sur. Classification of papillomaviruses. *Virology* 2004; 32:17-27.
25. CHEN Z, FU L, HERRERO R i sur. Identification of a novel human papillomavirus (HPV97) related to HPV18 and HPV45. *Int J Cancer* 2007; (u tisku).
26. MUNOZ N, BOSCH FX, DE SANJOSE S i sur. INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, MULTICENTER CERVICAL CANCER STUDY GROUP. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 348: 518-27.
27. CAROZZI F, BISANZI S, SANI C i sur. Agreement between the AMPLICOR Human Papillomavirus Test and the Hybrid Capture 2 assay in detection of high-risk papillomavirus and diagnosis of biopsy-confirmed high-grade cervical disease. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 364-69.
28. 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: 313-6.
29. SANDRI MT, LENTATI P, BENINI E i sur. Comparison of the Digene HC2 assay and the Roche AMPLICOR human papillomavirus (HPV) test for detection of high-risk HPV genotypes in cervical samples. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 2141-6.
30. ISSA NC, ESPY MJ, UHL JR i sur. Comparison of specimen processing and nucleic acid extraction by the swab extraction tube system versus the MagNA Pure LC system for laboratory diagnosis of herpes simplex virus infections by LightCycler PCR. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 1059-63.
31. WHILEY DM, SYRMIS MW, MACKAY IM i sur. Preliminary comparison of three LightCycler PCR assays for the detection of herpes simplex virus in swab specimens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2003; 22: 764-7.
32. PODZORSKI RP. Evaluation of the Cepheid herpes simplex virus typing real-time PCR assay using dermal and genital specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2006; 56: 173-7.
33. SOBEL JD. Vaginitis. *N Engl J Med* 1997; 337:1896-903.
34. GAZI H, DEGERLI K, KURT O. Use of DNA hybridization test for diagnosing bacterial vaginosis in womens with symptoms suggestive of infection. *AMPIS* 2006; 114: 784-7.
35. SHA B, CHEN HY, WANG QJ i sur. Utility of Amsel Criteria, Nugent Score, and Quantitative PCR for *Gardnerella vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, and *Lactobacillus* spp. for Diagnosis of Bacterial Vaginosis in Human Immunodeficiency Virus-Infected Women. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 4607-12.
36. OBATA-YASOUKA M, BA-THEIN W, HAMADA H i sur. A multiplex polymerase chain reaction-based diagnostic method for bacterial vaginosis. *Obstetrics&Gynecology* 2002; 100: 759-64.
37. HARDICK A, HARDICK J, WOOD BJ i sur. 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: 4197-9.
38. HARDICK J, YANG S, LIN L i sur. Use of the Roche Light-Cycler Instrument in a real-time PCR for *Trichomonas vaginalis* in urine samples from females and males. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 5619-22.
39. JORDAN J, LOWERY AD, TRUCCO M. TaqMan-based detection of *Trichomonas vaginalis* DNA from female genital specimens. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 3819-22.
40. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Prevention of Perinatal Group B Streptococcal Disease. *MMWR* 2002; 51 (No. RR-11): 1-26.
41. PUOPOLO KM, MADOFF LC, EICHENWALD EC. Early-Onset group B streptococcal disease in the era of maternal screening. *Pediatrics* 2005; 115: 1240-6.
42. DAVIES HD, MILLER MA, FARO S. Multicenter Study of a rapid molecular-based assay for the diagnosis of group B streptococcus colonization in pregnant women. *Clin Infect Dis* 2004; 30: 1129-35.
43. POPE V, FOX K, LIU H i sur. Molecular subtyping of *Treponema pallidum* from North and South Carolina. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 3743-6.

44. MOLEPO J, PILLAY A, WEBER B i sur. Molecular typing of *Treponema pallidum* strains from patients with neurosyphilis in Pretoria, South Africa. *Sex Transm Infect* 2007 (in press).
45. PALMER HM, HIGGINS SP, HERRING AJ i sur. Use of PCR in the diagnosis of early syphilis in the United Kingdom. *Sex Transm Infect* 2003; 79: 479-83.
46. LESLIE DE, AZZATO F, KARAPANAGIOTIDIS T i sur. Development of a real-time PCR assay to detect *Treponema pallidum* in clinical specimens and assessment of the assay's performance by comparison with serological testing. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 93-6.
47. KOEK AG, BRUISTEN SM, DIERDORP M i sur. Specific and sensitive diagnosis of syphilis using a real-time PCR for *Treponema pallidum*. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12: 1233-6.
48. MAEDA S, DEGUCHI T, ISHIKO H. Detection of *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma parvum* (biovar 1) and *Ureaplasma urealyticum* (biovar 2) in patients with non-gonococcal urethritis using polymerase chain reaction-microtiter plate hybridization. *Int J Urol* 2004; 11: 750-4.
49. YOSHIDA T, MAEDA S, DEGUCHI T i sur. (2003) 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: 1850-5.
50. 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: 3306-12.
51. HASHIMOTO O, YOSHIDA T, ISHIKO H i sur. (2006) Quantitative detection and phylogeny-based identification of mycoplasmas and ureaplasmas from human immunodeficiency virus type 1-positive patients. *J Infect Chemother* 2006; 12: 25-30.
52. CAO X, WANG Y, HU X i sur. Real-time TaqMan polymerase chain reaction assays for quantitative detection and differentiation of *Ureaplasma urealyticum* and *Ureaplasma parvum*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007; 57: 373-8.