

Učestalost infekcije bakterijama Chlamydia trachomatis i Neisseria gonorrhoeae iz različitih bioloških uzoraka nuškaraca

Đurek, Valentina

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, University Department of Forensic Sciences / Sveučilište u Splitu, Sveučilišni odjel za forenzične znanosti**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:227:698330>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivs 3.0 Unported](#)/[Imenovanje-Bez prerada 3.0](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-25**

SVEUČILIŠTE
U
SPLITU



SVEUČILIŠNI
ODJEL ZA
FORENZIČNE
ZNANOSTI

Repository / Repozitorij:

[Repository of University Department for Forensic Sciences](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



SVEUČILIŠTE U SPLITU
SVEUČILIŠNI ODJEL ZA
FORENZIČNE ZNANOSTI

FORENZIČNA KEMIJA I MOLEKULARNA
BIOLOGIJA

DIPLOMSKI RAD

UČESTALOST INFEKCIJE BAKTERIJAMA
CHLAMYDIA TRACHOMATIS* I *NEISSERIA
***GONORRHOEAE* IZ RAZLIČITIH BIOLOŠKIH**
UZORAKA MUŠKARACA

Valentina Đurek

Split, rujan 2024.g.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
SVEUČILIŠNI ODJEL ZA
FORENZIČNE ZNANOSTI

FORENZIČNA KEMIJA I MOLEKULARNA
BIOLOGIJA

DIPLOMSKI RAD

UČESTALOST INFEKCIJE BAKTERIJAMA *CHLAMYDIA*
***TRACHOMATIS* I *NEISSERIA GONORRHOEAE* IZ**
RAZLIČITIH BIOLOŠKIH UZORAKA MUŠKARACA

Mentor: izv.prof.dr.sc. Snježana Židovec Lepej

Komentor: Livia Slišković, mag.forens.

Valentina Đurek

1003077003

Split, rujan 2024.g.

Rad je izrađen u Odjelu za imunološku i molekularnu dijagnostiku Klinike za infektivne bolesti “dr. Fran Mihaljević“ u Zagrebu i Sveučilišnom odjelu za forenzične znanosti u Splitu

pod nadzorom izv.prof.dr.sc. Snježana Židovec Lepej i Livia Slišković, mag.forens.

u vremenskom razdoblju od svibnja 2024. do rujna 2024. godine.

Datum predaje diplomskog rada: 02. rujna 2024.

Datum prihvaćanja rada: 20. rujna 2024.

Datum usmenog polaganja: 27. rujna 2024.

Povjerenstvo: 1. doc.dr.sc. Snježana Štambuk

2. doc.dr.sc. Nenad Vuletić

3. izv.prof.dr.sc. Snježana Židovec Lepej

SADRŽAJ

| | |
|---|----|
| 1. UVOD..... | 1 |
| 1.1. Spolno-prenosive infekcije..... | 1 |
| 1.2. <i>Chlamydia trachomatis</i> | 3 |
| 1.2.1. Epidemiologija i klinički simptomi <i>C. Trachomatis</i> | 4 |
| 1.3. <i>Neisseria gonorrhoeae</i> | 7 |
| 1.3.1. Epidemiologija i klinički simptomi <i>N. gonorrhoeae</i> | 8 |
| 1.4. Metode određivanja spolno-prenosivih infekcija..... | 9 |
| 1.4.1. Mikroskopski razmazi briseva na <i>C. Trachomatis</i> i <i>N. gonorrhoeae</i> | 12 |
| 1.4.2. Uzgoj <i>C. Trachomatis</i> i <i>N. gonorrhoeae</i> na hranjivim podlogama..... | 13 |
| 1.4.3. Imunološka dijagnostika <i>C. Trachomatis</i> i <i>N. gonorrhoeae</i> | 15 |
| 1.4.4. Dokazivanje nukleinskih kiselina <i>C. Trachomatis</i> i <i>N. gonorrhoeae</i> | 15 |
| 1.4.4.1. Test lančane reakcije polimerazom (PCR)..... | 16 |
| 1.4.4.2. Inhibicija PCR reakcije..... | 18 |
| 1.5. Vrste bioloških uzoraka za detekciju <i>C. Trachomatis</i> i <i>N. gonorrhoeae</i> | 20 |
| 1.5.1. Urin..... | 20 |
| 1.5.2. Bris orofarinksa..... | 21 |
| 1.5.3. Bris rektuma..... | 21 |
| 2. CILJ RADA..... | 22 |
| 3. IZVORI PODATAKA I METODE..... | 23 |
| 3.1. Ustroj studije i ispitanici..... | 23 |
| 3.2. Metode analize..... | 23 |
| 3.2.1. Biološki uzorci..... | 23 |
| 3.2.2. Detekcija bakterija <i>C. Trachomatis</i> i <i>N. gonorrhoeae</i> Abbott Real/Time CT/NG testom..... | 25 |
| 3.2.2.1. Princip rada Abbott Real/Time CT/NG testa..... | 28 |
| 3.2.2.2. Prikaz rezultata..... | 29 |
| 3.2.3. Statističke metode..... | 31 |
| 4. REZULTATI..... | 32 |
| 5. RASPRAVA..... | 36 |
| 6. ZAKLJUČAK..... | 40 |
| 7. LITERATURA..... | 41 |
| 8. SAŽETAK..... | 45 |
| 9. ABSTRACT..... | 47 |
| 10. ŽIVOTOPIS..... | 49 |
| 11. Izjava o akademskoj čestitosti..... | 50 |

Popis kratica

CT – Chlamydia trachomatis

NG –Neisseria gonorrhoeae

WHO - World Health Organisation

ECDC - European Centre for Disease Prevention and Control

PCR – polimerase chain reaction

RT-PCR - real time polimerase chain reaction

1. UVOD

1.1. Spolno-prenosive infekcije

Spolno-prenosive infekcije su zarazne bolesti koje uzrokuje više od 30 različitih bakterija, virusa i parazita. Prenose se putem spolnog kontakta te danas i u modernom društvu predstavljaju značajan javnozdravstveni i socioekonomski problem koji utječe na spolno i reproduktivno zdravlje muškaraca i žena. Posebnu problematiku predstavljaju iz nekoliko razloga kao što su raširenost u nerazvijenim i razvijenim zemljama te mogućnosti razvoja brojnih komplikacija u medicinskoj i društvenoj domeni. Iako se uglavnom prenose spolnim putem, moguć je i nespolni način prijenosa kao što su infekcije tjelesnim tekućinama (krvlju, slinom), upotrebom inficiranog predmeta ili sa majke na novorođenče (1).

Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije (WHO), tijekom 2020.g. u svijetu je zabilježeno 374 milijuna novih infekcija uzrokovanih najčešćim uzročnicima spolno-prenosivih infekcija bakterijama *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Treponema pallidum* i parazitom *Trichomonas vaginalis* (2). Sukladno tim podacima, infekcije bakterijama *C. trachomatis* i *N. gonorrhoeae* koje se prenose spolnim putem, to jest izravnim kontaktom tijekom spolnog odnosa (vaginalnog, analnog ili oralnog), jesu najčešće spolno-prenosive infekcije kod muškaraca i žena. Tablica 1 prikazuje broj novooboljenih osoba od navedenih spolno prenosivih infekcija u 2020. godini.

Podatci iz literature upućuju na porast spolno-prenosivih infekcija zabilježenih u Hrvatskoj. Prema podacima prijava zaraznih bolesti Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo, u 2022. godini zabilježeno je 158 slučajeva infekcija *C. trachomatis*, većinom kod osoba ženskog spola. Većina infekcija sa *N. gonorrhoeae* zabilježeno je kod muškaraca, a ukupno je evidentiran 41 slučaj *N. gonorrhoeae* (3). U CheckPoint centru Zagreb Hrvatske udruge za borbu protiv HIV-a i virusnih hepatitisa (HUHIV) 2023. godine otkriveno je 180 preliminarno pozitivnih spolno-prenosivih infekcija. Najviše je bilo utvrđeno infekcija *C. trachomatis*, njih 38%, dok je infekcija *N. gonorrhoeae* utvrđena kod 16% testiranih pacijenata. Porast broja novooboljenih od spolno-prenosivih bolesti raste i zbog pojačanog nadzora uz sve više dostupnog testiranja kod kuće (samotestiranja). (3)

Tablica 1. Prikaz broja novoboljelih odraslih osoba od četiri najčešće spolne infekcije u 2020. godini

(izvor: World Health Organization, Research DoRHa. Guidelines for the management of symptomatic sexually transmitted infections. June 2021.)

| Zemlja | Broj novooboljelih slučajeva |
|-----------------------------|-------------------------------------|
| Afrička regija | 96 milijuna |
| Regije Amerika | 74 milijuna |
| Regija jugoistočne Azije | 60 milijuna |
| Europska regija | 23 milijuna |
| Istočno-mediteranska regija | 36 milijuna |
| Zapadna pacifička regija | 86 milijuna |

1.2. *Chlamydia trachomatis*

Klamidija je jedna od najčešćih spolno-prenosivih bakterijskih infekcija u svijetu. U 2022. godini Europskom centru za prevenciju i kontrolu bolesti (EDCD-u) prijavljeno je ukupno 216 508 potvrđenih slučajeva infekcije *C. trachomatis* (Tablica 1). Hrvatska je 2022. godine prema EDCD podacima imala 100 potvrđenih slučajeva sa omjerom 2,6 na 100 000 stanovnika (4).

Tablica 2. Prikaz potvrđenih slučajeva infekcije *C. trachomatis* i omjera infekcije na 100 000 stanovnika u europskim zemljama kroz razdoblje od 5 godina (izvor: European Centre for Disease Prevention and Control. Chlamydia. In: ECDC. Annual Epidemiological Report for 2022. Stockholm: ECDC; 2024.)

| Zemlja | 2018. | | 2019. | | 2020. | | 2021. | | 2022. | |
|----------------------------|---------------------------|-------------|---------------------------|-------------|---------------------------|-------------|---------------------------|-------------|---------------------------|-------------|
| | Broj potvrđenih infekcija | Omjer | Broj potvrđenih infekcija | Omjer | Broj potvrđenih infekcija | Omjer | Broj potvrđenih infekcija | Omjer | Broj potvrđenih infekcija | Omjer |
| Hrvatska | 213 | 5,2 | 150 | 3,7 | 121 | 3,0 | 115 | 2,8 | 100 | 2,6 |
| EU/EEA (30 zemalja) | 164 570 | 70,9 | 175 823 | 77,8 | 161 991 | 72,7 | 188 572 | 75,8 | 216 508 | 87,9 |

Chlamydia trachomatis je gram-negativna bakterija koja se prenosi tijekom vaginalnog, analnog ili oralnog spolnog odnosa te se može detektirati u ustima, na spolnim organima i anusu (5). Klamidije su male, anaerobne, nepokretne, kokoidne nesporigene bakterije koje pripadaju rodu *Chlamydia* i obitelji *Chlamydiaceae* zajedno sa *C. pneumoniae*, *C. psittaci* i *C. pecorum*. Za razliku od drugih bakterija imaju jedinstven način razmnožavanja jer imaju elemetarno tjelešće (ET) koje se na stanicama domaćina veže uz receptore te se pretvara u reproduktivno retikularno tjelešće (RT), a životni ciklus im traje 48 do 72 sata. Građene su od DNA, RNA, prokariotskih ribosoma, proteina i lipida. (1)

Klamidije patogene za čovjeka su svrstane u dva biotipa zbog svojih različitih bioloških obilježja koja se odnose na razlike u vrsti infekcije i invazivnosti. Biotipovi su prema antigenskim svojstvima podijeljeni u serotipove koji uzrokuju specifične infekcije. Način prijenosa *C. trachomatis* je najčešće nezaštićenim spolnim putem. Može se prenijeti s majke na novorođenče tijekom poroda, a također i kontaminacijom prstiju s genitalnim iscjetkom pri čemu može doći do infekcije konjunktive oka. (6)

1.2.1. Epidemiologija i klinički simptomi i bolesti *C. trachomatis*

Infekcija *C. trachomatis* može proći nedijagnosticirano s obzirom na to da više od 70% inficiranih žena i oko 50% inficiranih muškaraca nema simptome (7). Neadekvatno liječenje može dovesti do komplikacija u reproduktivnom sustavu kao što su upalna bolest zdjelice, izvanmaternična trudnoća i neplodnost kod žena te epididimis kod muškaraca. Stoga je pravovremeno otkrivanje i liječenje uz adekvatnu laboratorijsku dijagnostiku od iznimne važnosti (8).

Klinička slika *C. trachomatis* ovisi o serotipu kojim je osoba zaražena, a bolesti koje određeni serotipovi uzrokuju prikazane su u tablici 3.

Tablica 3. Serotip, klinički sindromi i bolesti koje uzrokuje *C. trachomatis* (izvor: Begovac J, Bušić B, Kuzman I, et al. (ur.) , Zagreb: Medicinska naklada. Klinička infektologija 2019)

| Serotip | Bolesti |
|--|--|
| A, B, Ba, C | trahom |
| D, E, F, G, H, I, J, K | <ul style="list-style-type: none"> - konjuktivitis - urogenitalne infekcije: uretitis, epididimis, prostatitis, cervicitis, endometritis, izvanmaternična trudnoća, proktitis, kronična zdjelična bol, spontani pobačaj, prijevremena ruptura plodovih ovojnica, reaktivni artritis, Reiterov sindrom - perinatalne infekcije - intersticijska pneumonija, otitis media, rinitis, faringitis, vulvovaginitis |
| Posebno G | <ul style="list-style-type: none"> • mogući samostalni pokretač cervikalne karcinogeneze |
| L ₁ , L ₂ , L ₃ | lymphogranulomavenereum |

Trahom je kronični enterokonjuktivitis, bolest poznata kao bolest siromaštva i nečistoće. Endemska je bolest u Africi i Aziji gdje su glavni rezervoari trahoma djeca koja imaju infekciju oka uzrokovanu *C. trachomatis*, a bolest prenose dodirrom (rukama) (5).

Serotipovi D – K su najčešći bakterijski uzročnici spolno-prenosivih bolesti i infekcija. Rezervoar tih serotipova su muškarci i žene sa asimptomatskom infekcijom (oko 25% muškaraca i 70-80% žena). S obzirom na to da je infekcija često asimptomatska, kod žena je to bolest neprepoznate infekcije. Također, razlikujemo nekompliciranu, kompliciranu i perzistentnu klamidijsku infekciju koje se razlikuju u simptomima. Neki od simptoma i bolesti kod žena su: uretitis, proktitis te komplikacije kao što su zdjelična upalna bolest, ektopična trudnoća, bolest novorođenčeta. Kod muškaraca uretritis može biti simptomatski i asimptomatski. Osim uretritisa mogući je razvoj epididimitisa i prostatitisa. Prostatitis koji uzrokuje *C. trachomatis* može biti asimptomatski, akutni ili kronični. Neki od kriterija za dokazivanje *C. trachomatis* kod prostatitisa su: prisutnost kliničkih simptoma, više od 10 leukocita u vidnom polju pod mikroskopom sa velikim povećanjem u uzorku eksprimata prostate ili uzorku urina, odsutnost *C. trachomatis* u brisu uretre i odsutnost drugih mogućih uzročnika kroničnog prostatitisa. (1)

Lymphogranuloma venereum (LGV) se prenosi spolnim odnosom. Bolest je raširena u Africi, Aziji, Južnoj Americi, a od nedavno i u SAD-u te i Zapadnoj Europi. Za bolest su karakteristične vezikule koje se pojavljuju 1 – 4 tjedna nakon spolnog odnosa uz moguću pojavu glavobolje, vrućice i bolova u mišićima. Kod muškaraca dolazi do oticanja ingvinalnih, a kod ženar etroperitonelanih i perirektalnih limfnih čvorova. LGV serotipovi također mogu uzrokovati okuloglandularni konjuktivitis s regionalnom limfadenopatijom. (1)

1.3. *Neisseria gonorrhoeae*

Gonoreja spada u skupinu najčešćih spolno-prenosivih infekcija u svijetu. Nakon klamidije druga je po redu najčešće prijavljivana spolno-prenosiva infekcija u Europi. Kao i *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* se također prenosi nezaštićenim spolnim odnosom i može se prenjeti s majke na novorođenče prilikom poroda. Europskom centru za prevenciju i kontrolu bolesti (EDCD-u) 2022. godine je ukupno prijavljeno 70 881 potvrđenih infekcija *N. gonorrhoeae* što je najviše potvrđenih infekcija *N. gonorrhoeae* od 2009. godine od kada EDCD službeno vodi evidenciju (Tablica 4). Hrvatska je prema EDCD podacima imala 21 potvrđeni slučaj sa omjerom 0,5 na 100 000 stanovnika. (9)

Tablica 4. Prikaz potvrđenih slučajeva infekcije *N. gonorrhoeae* i omjera infekcije na 100 000 stanovnika u europskim zemljama kroz razdoblje od 5 godina (izvor: European Centre for Disease Prevention and Control. Chlamydia. In: ECDC. Annual Epidemiological Report for 2022. Stockholm: ECDC; 2024.)

| Zemlja | 2018. | | 2019. | | 2020. | | 2021. | | 2022. | |
|----------------------------|---------------------------|------------|---------------------------|-------------|---------------------------|------------|---------------------------|-------------|---------------------------|-------------|
| | Broj potvrđenih infekcija | Omjer | Broj potvrđenih infekcija | Omjer | Broj potvrđenih infekcija | Omjer | Broj potvrđenih infekcija | Omjer | Broj potvrđenih infekcija | Omjer |
| Hrvatska | 38 | 0,9 | 40 | 1,0 | 13 | 0,3 | 17 | 0,4 | 21 | 0,5 |
| EU/EEA (30 zemalja) | 39 082 | 9,8 | 40 639 | 10,4 | 39 170 | 9,5 | 49 987 | 11,7 | 70 881 | 17,9 |

Neisseria gonorrhoeae je gram–negativna diplokokna bakterija koja kolonizira genitalne, oralne i rektalne sluznice. Pripada rodu *Neisseria*, od kojih je zajedno sa *N. meningitidis* jedna od patogenih vrsta. Bakterija *N. gonorrhoeae* uzrokuje gonoreju, spolno-prenosivu infekciju koja je urogenitalne i/ili ekstragenitalne lokacije. Patogeneza *N. gonorrhoeae* se razvija u četiri glavna stadija: u prvom stadiju pomoću pila i proteina vanjske membrane prijanja na površinu stanica sluznice domaćina, zatim prodire kroz sluznicu gdje se odvija proliferacija stanica nakon čega dolazi do lokalnog upalnog odgovora organizma. (10)

1.3.1. Epidemiologija i klinički simptomi i bolesti *N. gonorrhoeae*

Rizik za infekciju *N. gonorrhoeae* po kontaktu procjenju se na 20 – 50% za muškarce i 60 – 90% za žene (1). Infekcija *N. gonorrhoeae* može biti i asimptomatska pa asimptomatske osobe tijekom spolnog odnosa mogu prenijeti infekciju dalje. Inkubacija traje 2 -5 dana, a do pojave prvih simptoma može proći i do 2 tjedna i osoba je u tom vremenskom periodu zarazna. Primarni put prijenosa je seksualnim odnosom, ali se može i prenijeti sa majke na dijete tijekom porođaja. Neki od simptoma infekcije *N. gonorrhoeae* kod žena su: vaginalni iscjedak, bol ili peckanje pri mokrenju, bol u donjem dijelu trbuha, krvarenje između menstruacija i bol tijekom spolnog odnosa, a kod muškaraca su osjećaj pečenja tijekom mokrenja, gnojni iscjedak iz penisa i rjeđe bolni ili natečeni testisi. Oba spola mogu oboljeti od ekstragenitalne infekcije (rektum i ždrijelo) pri čemu su kod infekcije rektuma simptomi iscjedak, svrbež, bol i krvarenje iz rektuma, a kod infekcije ždrijela se može javiti bol. (11) Kod žena je većina infekcija uzrokovanih *N. gonorrhoeae* simptomatska ili imaju nespecifične simptome. Urogenitalna gonoreja se javlja kod oba spola podjednako, a rektalna i faringealna gonoreja najčešće se dijagnosticiraju u muškaraca koji imaju spolne odnose sa muškarcima (MSM). (12)

U tablici 5 su prikazane neke od bolesti uzrokovane infekcijom *N. gonorrhoeae* kod muškaraca i žena (13).

Tablica 5. Prikaz bolesti uzrokovanih *N. gonorrhoeae* kod oba spola
(izvor:<https://medilib.ir/uptodate/show/15893>)

| Spol | Bolesti |
|----------|--|
| Žene | - cervicitis, uretitis, - upalna bolest zdjelice, perihepatitis - komplikacije trudnoće |
| Muškarci | - uretitis, epididimitis - ekstragenitalne infekcije – rektum, ždrijelo - diseminirana infekcija gonokokom |

Upalna bolest zdjelice se pojavljuje kod 10 – 20% žena s cervikalnom gonorejom, a oko 40% svih upalnih bolesti zdjelice su posljedica infekcije *N. gonorrhoeae* (1).

1.4. Metode određivanja spolno-prenosivih infekcija

Tijekom godina razvijene su različite metode za laboratorijsku dijagnostiku spolno-prenosivih infekcija. Svaka od metoda ima svoje karakteristike, a odabir najprikladnije metode ovisi o osjetljivosti testa, specifičnosti kao i o zahtjevnosti izvedbe, troškovima i vremenu potrebnom da se izradi nalaz. Karakteristike laboratorijskih metoda koje se uzimaju u obzir prilikom odabira dijagnostičke metode za dijagnostiku spolno-prenosivih infekcija su:

- Osjetljivost: točna identifikacija pojedinca s infekcijom (stvarna pozitivna stopa)
- Specifičnost: točna identifikacije pojedinca bez infekcije (prava negativna stopa)
- Pozitivna prediktivna vrijednost (PPV): vjerojatnost da pozitivne osobe zaista imaju infekciju
- Negativna prediktivna vrijednost (NPV): vjerojatnost da negativne osobe zaista nemaju infekciju
- Složenost testa: uključuje sve tehničke zahtjeve (oprema, reagensi, osoblje) potrebne za optimalnu izvedbu testa

- Troškovi: vezani uz materijale i rad
- Izvedivost: broj dovršenih testova u određenom vremenu
- Vrijeme do rezultata: vrijeme potrebno za dobivanje krajnjeg rezultata

Metode za određivanje spolno-prenosivih infekcija su kultura stanica i mikroskopski razmaz, imunološki testovi te testovi amplifikacije nukleinskih kiselina. U tablici 6 je prikaz usporedbe laboratorijskih metoda za detekciju spolno-prenosivih infekcija. Sama dijagnostika ovisi i o vrsti infekcije i mjestu s kojega se uzima uzorak ili o vrsti uzorka. (14)

Tablica 6. Prikaz i karakteristike metoda detekcije spolno-prenosivih infekcija *C. trachomatis* i *N. gonorrhoeae* (izvor: Caruso G, Giammanco A, Virruso R, Fasciana T. Current and Future Trends in the Laboratory Diagnosis of Sexually Transmitted Infections. 2021;18(3):1038.)

| Bakterija | Metoda | Vrsta uzorka | Osjetljivost | Specifičnost | Zahtjevnost izvođenja testa/ Cijena | Izvedivost/ Automatizacija | Multipleksnost | Upotreba |
|-----------------------|--|--|---|---|--------------------------------------|----------------------------|----------------|--|
| <i>N. gonorrhoeae</i> | Mikroskopija (razmaz bojan po Gram-u) | Brisevi (EC, UR, CO) | Niska za žene i ASYM muškarce; visoka za SYM muškarce | Niska za žene i ASYM muškarce; visoka za SYM muškarce | Niska/niska | Umjerena/ne | Ne | Dijagnostika |
| | Stanična kultura (selektivni medij) | Brisevi (EC, UR, CO, OP, VA, RE) | Umjerena do visoka | Vrlo visoka | Umjerena/ umjerena | Umjerena/ne | Ne | Dijagnostika, AMR testiranje |
| | Detekcija antigena (OI, ICT) | Brisevi (EC, CE, VA), urin | Niska do umjerena | Visoka | Niska do umjerena/ umjerena | Umjerena/ne | Da | Dijagnostika, skrining |
| | NAAT (PCR, IA) | Brisevi (EC, UR, CO, OP, VA, RE), urin | Vrlo visoka | Umjerena do visoka | Niska za IA; visoka za PCR | Visoka/moguća | Da | Dijagnostika, skrining, AMR testiranje |
| <i>C. trachomatis</i> | Mikroskopija | Brisevi (EC, UR, CO, OP, RE) | Niska | Visoka | Umjerena/ niska | Umjerena/ne | Ne | Dijagnostika (preporučljivo za CO briseve) |
| | Stanična kultura | Brisevi (EC, UR, CO, OP, RE) | Umjerena do visoka | Vrlo visoka | Visoka/ umjerena | Niska/ne | Ne | Dijagnostika, AMR testiranje, genotipizacija |
| | Detekcija antigena (OI, ICT, biosensors) | Brisevi (EC, VA, UR), urin | Umjerena do visoka | Vrlo visoka | Niska do umjerena/ Niska do umjerena | Niska/ne | Da | Dijagnostika, skrining |
| | NAAT (PCR, IA) | Brisevi (EC, UR, CO, OP, VA, RE), urin, tekući medij | Vrlo visoka | Vrlo visoka | Niska za IA; visoka za PCR | Visoka/moguća | Da | Dijagnostika, skrining |

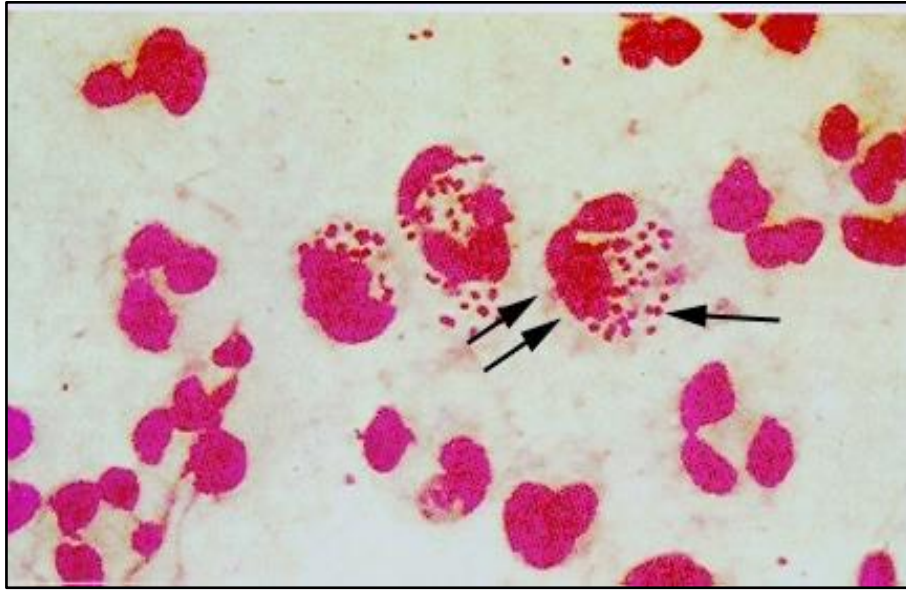
OI = optički imunološki test; ICT = imunokromatografski test; NAAT = test amplifikacije nukleinskih kiselina; PCR = lančana reakcija polimerazom; IA = izotermalna amplifikacija; AMR = antimikrobna rezistencija; EC = endocervikalni bris; VA = vaginalni bris; UR = bris uretre; CO = bris konjunktive oka; OP = bris orofarinksa; RE = bris rektuma; ASYM = asimptomatski; SYM = simptomatski

1.4.1. Mikroskopski razmazi briseva na *C. trachomatis* i *N. gonorrhoeae*

Mikroskopija razmaza briseva je metoda izravnog pretraživanja uzorka vizualizacijom. Metoda je jednostavna, jeftina i brza. S obzirom na to da je metoda osjetljiva i specifična, mikroskopiranjem možemo dobiti pretpostavljenu dijagnozu koja usmjerava na liječenje. Uzorak dobre kvalitete, uzet s odgovarajućeg mjesta s prikladnim štapićem bitan je za dobar mikroskopski razmaz. Kao uzorak za mikroskopiranje koriste se brisevi sluznica (bris uretre, rektuma, orofarinksa, vaginalni bris, endocervikalni bris) te se za detekciju *C. trachomatis* i *N. gonorrhoeae* razmazi bojaju po Gramu. Bojanje po Gramu pokazuje morfologiju bakterija prema kojoj se bakterije dijele u dvije skupine: Gram pozitivne (ljubičasto obojenje) i Gram negativne (crveno-ružičasto obojenje). Takav nalaz daje pretpostavljenu identifikaciju pri čemu je važno imati odgovarajući mikroskop te potrebno znanje za interpretaciju nalaza. *C. trachomatis* se još boji i po Giemsa metodi radi boljeg raspoznavanja bakterije. (15) Na slikama 1 i 2 se vidi prikaz bakterije *C. trachomatis* obojane Giemsametodom i *N. gonorrhoeae* obojane po Gramu.



Slika 1. Prikaz *C. trachomatis* obojane po Giemsi (izvor: https://www.stepwards.com/?page_id=5266)



Slika 2. Prikaz *N. gonorrhoeae* obojane po Gramu (izvor: <https://step1.medbullets.com/microbiology/104044/neisseria-gonorrhoeae>)

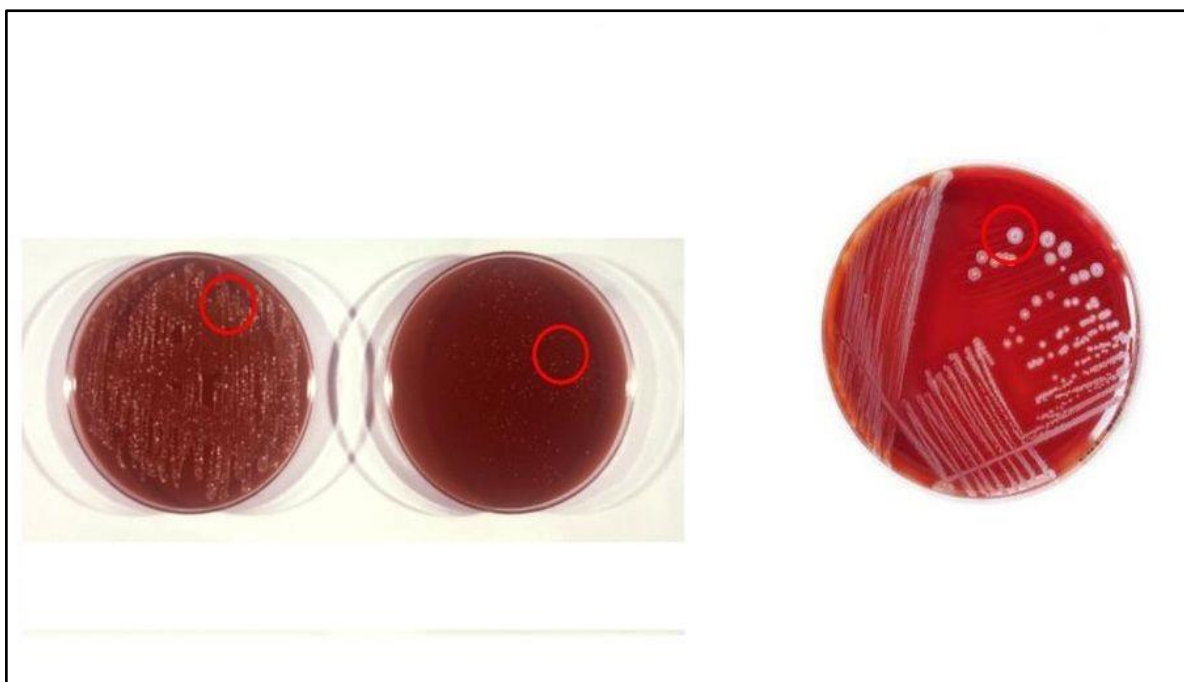
1.4.2. Uzgoj *C. trachomatis* i *N. gonorrhoeae* na hranjivim podlogama

Uzgoj organizama na specifičnim hranjivim podlogama je visoko standardizirana metoda koja ima dobru specifičnost i osjetljivost i pouzdana je metoda za testiranje na antimikrobne rezistencije. Mana uzgoja kulture stanica na staničnim podlogama je to što uzorak zahtijeva brzi hladni transportni sustav za očuvanje uzorka, a sam postupak stanične kulture je zahtjevan i dugotrajan (16). Danas pojedini laboratoriji koriste sustav matične laserske ionizacije (MALDI) uzgoja bakterija koji omogućuje preciznu identifikaciju, podvrstu i serotip bakterije u kratkom roku za razliku od tradicionalnog uzgoja bakterija na hranjivim podlogama koje ovisno o vrsti bakterije traje nekoliko dana. Za identifikaciju bakterija na hranjivim podlogama izuzimaju se brisevi: endocervikalni, vaginalni, bris rektuma, bris orofarinksa, bris konjunktive oka. (14)

C. trachomatis uzgaja se na staničnim kulturama McCo, HeLa, HL i Hep-2. Nakon inkubacije od 48 – 72 sata prisutnost *C. trachomatis* dodatno se dokazuje bojanjem kolonija po Gimsei ili Lugolovom otopinom. Osjetljivost metode ovisi o kakvoći uzorka koji mora sadržavati stanice kako bi one u dovoljnoj mjeri narasle i bile pogodne za identifikaciju. (1)

N. gonorrhoeae se istovremeno uzgaja na selektivnoj (čokoladnoj) hranjivoj podlozi i neselektivnoj te se ploče inkubiraju u posebnim uvjetima 18 – 48 sati. Nakon rasta kolonija detekcija se dalje provodi bojanjem po Gramu i pozitivnom reakcijom citokromoksidaze. Za kultivaciju *N. gonorrhoeae* najpovoljniji su uzrci brisa uretre i cerviksa. (17)

Izgled pozitivnih kolonija *N. Gonorrhoea* i *C. trachomatis* na hranjivim podlogama prikazan je na slici 3.



Slika 3. Pozitivne kolonije *N. gonorrhoeae* (slika lijevo) i *C. trachomatis* (slika desno) (izvor: <https://jpabs.org/misc/what-antibiotic-is-good-for-gonorrhea-and-chlamydia.html>)

1.4.3. Imunološka dijagnostika *C. trachomatis* i *N. gonorrhoeae*

Imunološki testovi otkrivaju antigene patogena ili prisutnost protutijela proizvedenih imunološkim odgovorom na infekciju te omogućuju dijagnozu trenutne infekcije. Iako relativno brza metoda, Svjetska zdravstvena organizacija (WHO) ne preporuča korištenje imunoloških testova kao metodu dijagnostike *C. trachomatis* i *N. gonorrhoeae* zbog smanjene osjetljivosti testa ako su istovremeno dostupne i druge metode detekcije (14). Kod bolesnika sa dokazanim LGV-om protutijela *C. trachomatis* se mogu dokazati ELISA-om, RVK-om i imunofluorescencijom (1). Serološki testovi i testovi na principu antigen-antitijelo nisu metoda detekcije za *N. gonorrhoeae* zbog svoje nedovoljne osjetljivosti i specifičnosti (17).

1.4.4. Dokazivanje nukleinskih kiselina *C. trachomatis* i *N. gonorrhoeae*

Testovi amplifikacije nukleinskih kiselina (eng. Nucleic Acid Amplification Test - NAAT) predstavljaju standard u dijagnostici spolno-prenosivih infekcija. Imaju visoku specifičnost i osjetljivost, potrebna je manja količina neinvazivnih uzoraka kao što je urin ili bris spolovila te omogućuju jednostavnije uzorkovanje, pakiranje uzorka i transport uzorka. Nedostatak takvih testova je skuplja oprema i cijena i samim time nedostupnost u zemljama u razvoju. (16)

Uzorci kod dokazivanja nukleinskih kiselina na bakterije *C. trachomatis* i *N. gonorrhoeae* su urin, vaginalni i endocervikalni bris, bris urete, bris rektuma i bris orofarinksa. Kontinuirani napredak u molekularnoj dijagnostici bakterija koje uzrokuju spolno-prenosive infekcije posljednjih nekoliko desetljeća doveo je do povećane automatizacije i sustava koji imaju mogućnosti višestruke detekcije ciljnih bakterija (18). Neki od takvih testova su prikazani u tablici 7. Danas postoji više komercijalnih testova za amplifikaciju DNA *C. trachomatis* i *N. gonorrhoeae*. Neki od njih su lančana reakcija polimeraze (PCR; Roche Molecular Systems, Branchburg, N.J.), lančana reakcija ligaze (LCR; Abbott Laboratories, Abbott Park, Ill.) i amplificiranje pomakom lanca (SDA; Becton Dickinson, Sparks, Md.) (19).

Tablica 7. Prikaz Multiplex PCR testova za detekciju spolno-prenosivih infekcija (izvor: Meyer T, Buder S. The Laboratory Diagnosis of Neisseria gonorrhoeae: Current Testing and Future Demands. 2020;9(2):91)

| Test | Metoda amplifikacije i detekcije | Vrijeme potrebno za analizu | Detektirani patogeni |
|---|--|-----------------------------|---|
| FTD STD 9 (FastTrackDiagnostics) | Real-time PCR Fluorescence | 3–4 h | <i>Ct, Ng, Tv, Mg, Uu, Up, Gv, HSV1, HSV2</i> |
| Anyplex II STI-7 (Seegene) | Real-time PCR fluorescence and melting curve | 4–5 h | <i>Ct, Ng, Tv, Mg, Uu, Up, Mh</i> |
| Amplisense (Interlab Service) | Real-time PCR Fluorescence | 3–4 h | <i>Ct, Ng, Tv, Mg</i> |
| FilmArray STI (BioMerieux) | Nested PCR Fluorescence | 1 h | <i>Ct, Ng, Tp, Tv, Mg, HSV1, HSV2, Uu, Hd</i> |
| Easy Screen (GeneticSignatures) | 3-base real-time PCR (Bisufit-PCR) melting curve | 3 h | <i>Ct, LGV, Ng, Mg, Tv, Uu, Up, Mh, GBS, Candida, Gv, HSV 1, HSV 2, VZV, Tp</i> |
| STI Multiplex Array (Randox Laboratories) | Real-time PCR Fluorescence | 30 min | <i>Ct, Ng, Mg, Tv, Uu, Mh, Hd, Tp, HSV 1, HSV 2</i> |

Ct: Chlamydia trachomatis, Ng: Neisseria gonorrhoeae, Tv: Trichomonas vaginalis, Mg: Mycoplasma genitalium, Uu: Ureaplasma urealyticum, Up: Ureaplasma parvum, Gv: Gardnerella vaginalis, HSV: Herpes simplex virus, Mh: Mycoplasma hominis, Hd: Hemophilus ducreyi, LGV: Lymphogranuloma venereum, GBS: Group B streptococci, VZV: Varicella zoster virus, Tp: Treponema pallidum.

1.4.4.1. Test lančane reakcije polimerazom (PCR)

PCR (eng. Polymerase Chain Reaction) je reakcija koja umnožava određeni dio DNA u nestaničnom sustavu (u epruveti). Metoda se temelji na sintezi to jest umnožavanju molekule DNA in vitro s pomoću specifične DNA polimeraze – enzima koji katalizira sintezu DNA. Od jednog lanca DNA dobije se velik broj kopija. DNA se denaturira (razdvajaju se lanci) na temperaturi taljenja te takva denaturirana DNA služi kao kalup (informacija) za sintezu drugog komplementarnog DNA lanca u PCR reakciji. Za sintezu komplementarnog DNA lanca osim jednolančanog kalupa potrebna je i DNA polimeraza. DNA polimeraza je enzim koji katalizira nizanje nukleotidnih ostataka u molekulu DNA te za svoju aktivnost treba slobodne nukleotide i kratke odsječke DNA – početnice (eng. primeri) potrebne za početak

sinteze. Početnice su kratki oligonukleotidni lanci komplementarni početnom i završnom dijelu gena koji želimo umnožiti. Rezultat PCR reakcije je eksponencijalno nakupljanje specifično ciljanog fragmenta DNA. U reakcijsku smjesu uz kalup i početnice ulaze i sva četiri deoksiribonukleotida kao građevni elementi za nove molekule DNA.

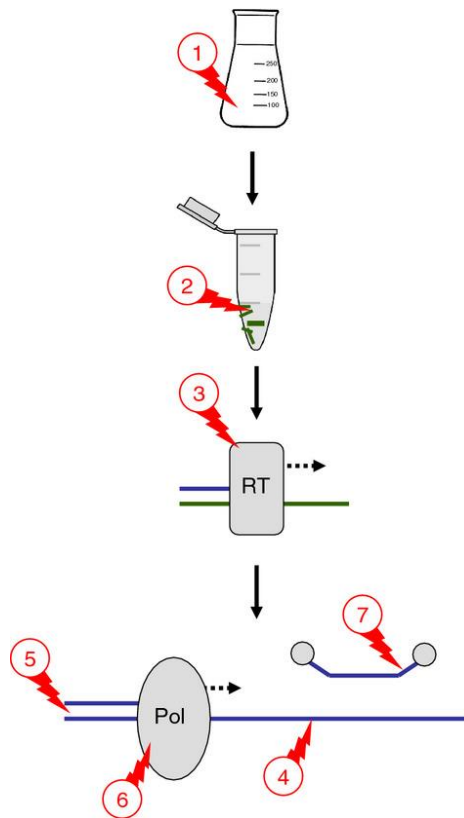
Svaki PCR ciklus ima tri koraka: denaturacija DNA (pucanje vodikovih veza između komplementarnih lanaca kalupa DNA na temperaturi od 94 - 96°C), hibridizacija početnica (komplementarno sparivanje početnica na temperaturi 54 - 58°C) i polimerizacija (sinteza DNA pomoću Taq polimeraze na temperaturi od 72°C). PCR metoda se izvodi na uređajima na kojima možemo programirati izvođenje ciklusa prema želji i optimizirati uvjete reakcije za željeni genski fragment. (20)

PCR reakcija slijedi nakon prvotne izolacije uzročnika infekcije koja se može raditi ručno ili automatizirano. Omogućuje umnožavanje malih količina DNA ili RNA čak i iz uzoraka koji nisu prva metoda izbora za analizu tradicionalnim metodama kao što su bris orofarinksa ili bris rektuma. Izolacija DNA obuhvaća niz fizikalno-kemijskih postupaka s ciljem izdvajanja DNA od ostalih staničnih komponenti koje bi mogle imati potencijalno negativan utjecaj na uspješnost PCR reakcije (21). Danas u dijagnostici spolno-prenosivih infekcija postoje razne vrste PCR testova kao što su RT-PCR (lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu), singleplex PCR (detekcija jednog uzročnika) i multiplex PCR (istovremena detekcija dva ili više uzročnika bolesti iz jednog uzorka) (14).

Metoda lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (RT-PCR) temelji se na umnožavanju određenih odsječaka DNA pomoću para nukleotidnih početnica i fluorescirajuće probe. Intenzitet fluorescencije je u korelaciji s količinom nastalog produkta što posljedično omogućava kvalitativno i kvantitativno određivanje mjerenjem promjene fluorescencijskog signala u stvarnom vremenu. (21)

1.4.4.2. Inhibicija PCR reakcije

PCR je enzimska reakcija i kao takva osjetljiva je na inhibitore. Inhibitori obuhvaćaju raznoliku skupinu tvari koje svojim svojstvima nepovoljno utječu na PCR reakciju. Inhibitori PCR reakcije potječu iz uzorka ili se mogu unijeti tijekom transporta uzorka i procesa obrade ili tijekom procesa ekstrakcije nukleinskih kiselina. Inhibitori svojim djelovanjem mogu utjecati na smanjenje osjetljivosti testa te mogu uzorkovati i lažno negativne rezultate. Pojedini inhibitori mogu se naći u određenim vrstama uzoraka što prilikom rada u laboratoriju za pripremu nukleinskih kiselina prije PCR-a zahtijeva specifične protokole za matriks te su iz tog razloga razvijeni različiti protokoli za uklanjanje PCR inhibitora. PCR inhibitori se pojavljuju kao organske i anorganske tvari. U skupinu anorganskih tvari koji mogu inhibirati PCR reakciju spadaju ioni kalcija dok u skupinu organskih tvari spadaju urea, žučne soli, etanol, polisaharidi, melanin, proteini (hemoglobin, laktoferin, imunoglobulin G) i druge. Mehanizam djelovanja PCR inhibitora tijekom pripreme uzorka i tijekom PCR-a prikazan je na slici 4. U svakoj fazi PCR reakcije može doći do inhibicije. DNA kao jedna od komponenti PCR-a može se adsorbirati na stijenku reakcijskih tubica tijekom obrade uzorka, ekstrakcije ili tijekom samog PCR-a što posljedično utječe na učinkovitost obrade uzorka i ekstrakciju nukleinske kiseline. U laboratorijskoj praksi inhibitori ovise o vrsti uzorka. Kod uzroka urina urea je tvar koja inhibira PCR reakciju jer dovodi do degradacije polimeraze. Veća mogućnost inhibicije je kod uzoraka brisa rektuma. Uzorak fecesa sadrži tvari koje ovise o prehrani i crijevnoj flori pacijenta te inhibitori mogu biti polisaharid ili klorofil iz bilja, žučne soli, glikolipidi, hemoglobin. Inhibitori PCR reakcije koji uđu u uzorak tijekom obrade uzorka ili tijekom ekstrakcije nukleinskih kiselina uključuju puder iz rukavica, soli, deterdžente, etanol. Utjecaj inhibitora PCR reakcije može se umanjiti odabirom odgovarajuće metode za obradu uzorka i ekstrakciju nukleinske kiseline, izborom manje osjetljive DNA polimeraze i/ili uporabom specifičnih PCR aditiva. (22)



Slika 4. Prikaz mehanizma djelovanja inhibitora PCR reakcije: nukleinske kiseline interferiraju s površinom epruvete (1); inhibicijske tvari reagiraju sa nukleinskim kiselinama tijekom obrade uzorka i ekstrakcije (2); inhibicija obrnute transkripcije (3); inhibicijske tvari modificiraju predložak DNA (4); inhibitori otežavaju spajanje početnica na matriks (5); mijenjanju ili degradiraju DNA polimerazu (6); mogu interferirati i sa vezanjem proba (7) (izvor: <https://enviromicro-journals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x>)

1. 5. Vrste bioloških uzoraka za detekciju *C. trachomatis* i *N. gonorrhoeae*

U testiranju na spolno-prenosive infekcije koriste se razni biološki uzorci kao što su urin, bris spolnih organa, bris orofarinksa, bris rektuma, endocervikalni bris, vaginalni bris, bris uretre. Ekstragenitalni uzroci su bris orofarinksa i bris rektuma. Infekcije rektuma i orofarinksa obično su asimptomatske te je pravilno uzorkovanje uzoraka od iznimne važnosti. Takve infekcije se obično detektiraju probirom, a procjenjuje se da bi do 70% infekcija moglo proći nezamijećeno u MSM (muškaraci koji imaju spolne odnose sa muškarcima) populaciji. Detekcija *N. gonorrhoeae* u brisu orofarinksa smatra se rezervoarom na antimikrobnu rezistenciju *N. gonorrhoeae* stoga je njena detekcija prioritet s obzirom na to da antimikrobna rezistencija postaje sve veći problem u svijetu. (23)

Prilikom uzorkovanja potrebno je pridržavati se uputa dobre laboratorijske prakse što znači prikupiti dovoljnu količinu uzorka, pravilno pakirati, obilježiti i pohraniti uzorak. Za potrebe ovog rada detaljnije su opisani uzorci urina, brisa orofarinksa i brisa rektuma.

1.5.1. Urin

Urin je neinvazivna vrsta uzorka koju pacijent sam može uzorkovati te u određenom vremenskom roku dostaviti u laboratorij. Inicijalno je urin sterilan uzorak no vrlo lako se može kontaminirati obilnom mikrobiotom periuretralnog područja, a u uvjetima smanjene otpornosti domaćina skoro svaka bakterija može uzrokovati infekciju mokraćnog sustava što u laboratorijskoj dijagnostici dodatno otežava razlučivanje pravih patogena u urinu od kontaminirajućih bakterija (24). Stoga je pravilno uzorkovanje urina koje ovisi o vrsti pretrage na koju se uzorak testira od iznimne važnosti. Ovisno o vrsti pretrage koja se radi, urin se uzorkuje iz prvog ili srednjeg mlaza. Za testiranje na spolno-prenosive infekcije potrebno je pomokriti prvi mlaz urina (VB 1- engl. voidedbladder urine 1, urin iz uretre) u količini od 10-20 mL (barem jedan do dva sata nakon posljednjeg mokrenja) u plastičnu sterilnu posudicu (24). Za urinokulturu je potrebno urin uzorkovati iz prvog jutarnjeg urina, nakon higijene spolovila potrebno je prvi mlaz normalno pomokriti te je srednji mlaz (20-30mL) potrebno pomokriti u plastičnu sterilnu posudicu (25). Prilikom svakog uzorkovanja urina, urin je potrebno u što mogućem kraćem roku dostaviti u laboratorij pri čemu prilikom transporta

treba paziti da je čašica dobro zatvorena kako ne bi došlo do prolijevanja i kontaminacije uzorka.

1.5.2. Bris orofarinksa

Infekcije grla uzorkovane spolno-prenosivim bakterijama mogu ostati asimptomatske stoga je oralno testiranje na spolno-prenosive infekcije ključno u ranom otkrivanju i pravovremenom liječenju bolesti kao i u sprječavanju širenja infekcije (26). Infekcije orofarinksa smatraju se rezervoarom za antimikrobnu rezistenciju (AMR) kod *N. gonorrhoeae* pa je pravilno izuzimanje uzorka od velike važnosti (23). Za razliku od urina, uzorkovanje brisa orofarinksa je malo invazivnija pretraga za koju je potrebno uzorkovanje medicinskog osoblja. Danas se uzorak brisa orofarinksa koristi i za probir na spolno-prenosive infekcije te ih uzorkuje isključivo medicinsko osoblje zbog poteškoća u samostalnom uzimanju brisa stražnje stijenke ždrijela i tonzila bez dodirivanja jezika i izazivanja refleksa povraćanja (27). Bris orofarinksa uzima se propisanim vatenim štapićem sa područja stražnjeg dijela (korijena) jezika i ždrijela. Jezik se pritisne drvenom lopaticom i laganom rotacijom vatenog štapića pritisne se navedeno područje ždrijela pazeći pri tome da se ne dotakne sluznica usne šupljine ili jezik zbog kontaminacije. Bris se tada pohrani u odgovarajuću tubicu koja sadrži prijenosni tekući medij i dostavlja se u laboratorij. (25)

1.5.3. Bris rektuma

Bris rektuma je uzorak koji pacijent sam uzorkuje čime se smanjuje neugodnost pacijentu i troškovi uzorkovanja su jeftiniji i isplativiji. Rektalne infekcije mogu biti asimptomatske te se većinom otkrivaju probirom (28). Bris rektuma za PCR detekciju bakterija *C. trachomatis* i *N. gonorrhoea* potrebno je pravilno uzorkovati kako ne bi došlo do kontaminacije uzorka i posljedično do inhibicije PCR reakcije. Uzorak se uzorkuje vatenim štapićem koji se tada pohranjuje u tubicu sa tekućim medijem i tako se transportira do laboratorija. (25)

2. CILJ RADA

Glavni ciljevi ovog istraživanja su:

- usporedba učestalosti infekcije bakterijama *C. trachomatis* i *N. gonorrhoeae* u urinu, brisevima orofarinksa i rektuma muškaraca na temelju retrospektivno prikupljenih podataka iz arhive Odjela za imunološku i molekularnu dijagnostiku Klinike za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ u razdoblju od 01.01.2022. do 31.12.2022. godine
- analiza razlika u prevalenciji infekcija bakterijama *C. trachomatis* i *N. gonorrhoeae* kod muškaraca s obzirom na dob pacijenata i vrstu biološkog uzorka
- analiza i usporedba stope inhibicije testa lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu u različitim biološkim uzorcima koji se koriste u standardnoj dijagnostičkoj obradi spolno-prenosivih infekcija u muškaraca (urin, brisevi orofarinksa i rektuma)

3. IZVORI PODATAKA I METODE

3.1. Ustroj studije i ispitanici

U ovu retrospektivnu studiju uključeno je 372 muških pacijenata koji su primali kliničku skrb u Ambulanti za spolno-prenosive bolesti kod muškaraca Zavoda za infekcije imunokompromitiranih bolesnika u Klinici za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ u razdoblju od 1. siječnja do 31. prosinca 2022. godine. Podatci o ispitanicima prikupljeni su iz laboratorijske baze podataka Odjela za imunološku i molekularnu dijagnostiku KZIB te analizirani primjenom statističkog paketa Statistica 13.3 (dostupno na <https://statistica.software.informer.com/>). Prikupljeni podatci uključuju spol, dob ispitanika i vrstu biološkog uzorka. Svi ispitanici su bili muškog spola. Od ukupnog broja ispitanika najmlađi pacijent je imao 22 godine, a najstariji 60 godina te je prosječna dob ispitanika bila 34 godine. Svakom pacijentu izuzeta su 3 različita biološka uzorka (urin, bris rektuma i bris orofarinksa) te je ukupno analizirano 1116 uzoraka. Ovo istraživanje odobrilo je Etičko povjerenstvo Klinike za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ (01-1505-2-2023, 24. kolovoz 2023.godine) i Etičko povjerenstvo Sveučilišnog odjela za forenzične znanosti (KL:025-03/23-03/17, UR:2181-227-102/01-4).

3.2. Metode analize

3.2.1. Biološki uzorci

Za detekciju bakterija *C. trachomatis* i *N. gonorrhoeae* svakom pacijentu uzorkovani su uzorci urina, brisa rektuma i brisa orofarinksa. Uzorci su prikupljeni Abbott multi-Collect Specimen Collection setom (Abbott Molecular, SAD) tijekom kliničke skrbi pacijenta, a obrađeni su u Odjelu za imunološku i molekularnu dijagnostiku Klinike za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“. Abbott multi-Collect Specimen Collection Kit (Abbott Molecular, SAD) to jest set za uzorkovanje uzoraka je posebno dizajniran kako bi omogućio

uzorkovanje, transport i pohranu uzoraka s ciljem da uzorci na mjesto testiranja stignu spremni za obradu i detekciju bakterija, a služi za uzorkovanje uzoraka urina i briseva (bris orofarinksa, rektuma, vaginalni bris). Slika 5 prikazuje Abbott *multi-Collect* Specimen Collection set (Abbott Molecular, SAD) i njegove dijelove za uzorkovanje uzoraka. Set sadrži prijenosnu pipetu kojom se dodaje oko 3mL urina u transportnu eprvetu i posebno zapakirani sterilni štapić za uzorkovanje uzoraka brisa koji se nakon uzorkovanja pohranjuje u transportnu eprvetu. Transportna eprveta sadrži 1,2 mL pufera za transport uzorka te služi za stabilizaciju DNA do pripreme uzorka. (29)

Uzorak urina prikuplja se na način da pacijent pomokri prvi mlaz urina (20-30mL) u plastičnu sterilnu čašicu pri čemu treba proći barem jedan sat od prethodnog mokrenja te nakon toga ambulantna medicinska sestra dio urina plastičnom sterilnom pipetom iz seta prebacuje u transportnu eprvetu. Uzorak brisa rektuma pacijent sam uzorkuje prema uputama i setu za uzorkovanje dobivenim u ambulanti te bris nakon uzorkovanja pohranjuje u transportnu eprvetu. Uzorak brisa orofarinksa uzorkuje liječnik u ambulanti i pohranjuje bris u transportnu eprvetu. Svi uzorci se označuju imenom, prezimenom i datumom rođenja te dopremaju u laboratorij gdje se obilježavaju rednim brojem.



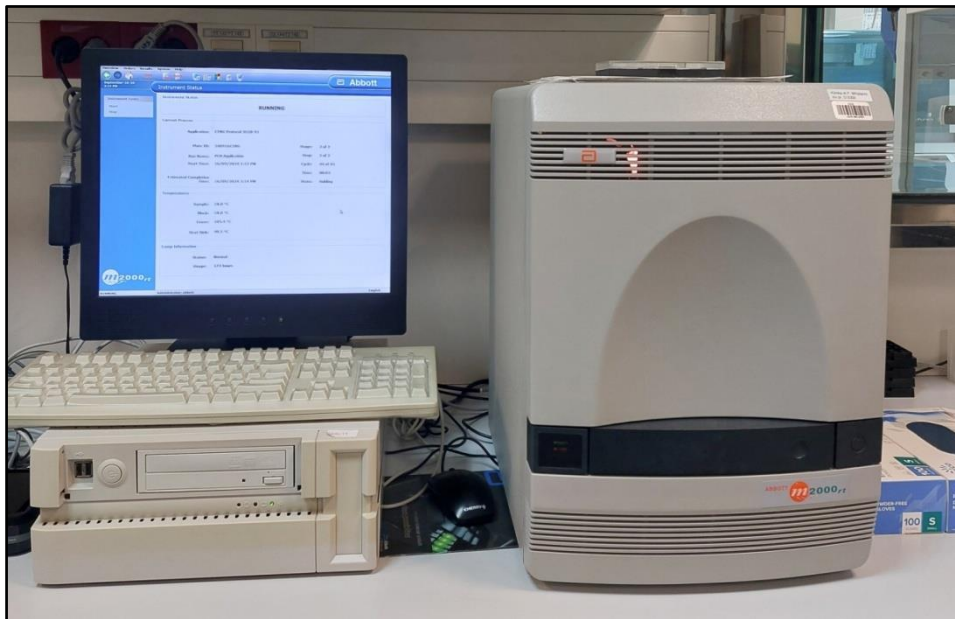
Slika 5. Abbot multi-collect set za uzorkovanje uzoraka (izvor: autor)

3.2.2. Detekcija bakterija *C. trachomatis* i *N. gonorrhoeae* Abbott RealTime CT/NG testom

Nakon što su uzorci dostavljeni u laboratorij Odjela za imunološku i molekularnu dijagnostiku KZIB, upisuju se u radne knjige i označavaju rednim brojem. Laboratorijsko osoblje priprema uređaj za rad te se uzorci direktno postavljaju u uređaj Abbott m2000sp (Abbott Molecular, SAD) za daljnju analizu (Slika 6). Abbott RealTime CT/NG (Abbott Molecular, SAD) test je in vitro test lančane reakcije polimeraze (PCR) za izravnu i kvalitativnu detekciju plazmidne DNA *Chlamydia trachomatis* i genomske DNA *Neisseria gonorrhoeae*. Test je dvojni test kojim se istovremeno otkrivaju uzročnici bakterija *C. trachomatis* i *N. gonorrhoeae* koristeći PCR tehnologiju sa homogenom fluorescencijom u stvarnom vremenu. Abbott RealTime CT/NG (Abbott Molecular, SAD) test izvodi se na Abbott m2000 sustavu (Abbott Molecular, SAD). Abbott m2000 sustav (Abbott Molecular, SAD) se sastoji od Abbott m2000sp (Abbott Molecular, SAD) i Abbott m2000rt (Abbott Molecular, SAD). U m2000sp (Abbott Molecular, SAD) dijelu odvija se automatizirana ekstrakcija DNA iz uzorka koja se zatim izdvaja zajedno s PCR amplifikacijskim mastermixom u optičku reakcijsku pločicu s 96 jažica. Laboratorijski djelatnik prekriva pločicu posebnim najlonom koja se zatim prenosi na instrument m2000rt na kojem se odvija proces lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu. Ako su određene CT i NG ciljne sekvence prisutne, one se pojačavaju i otkrivaju upotrebom fluorescentno obilježenih oligonukleotidnih sonda bez potrebe za otvaranjem zatvorene pločice. Sonde ne stvaraju signal osim ako nisu posebno vezane za amplificirani produkt. Na slici 7 prikazan je uređaj Abbott m2000rt na kojem se finalno očitavaju rezultati analize (30).

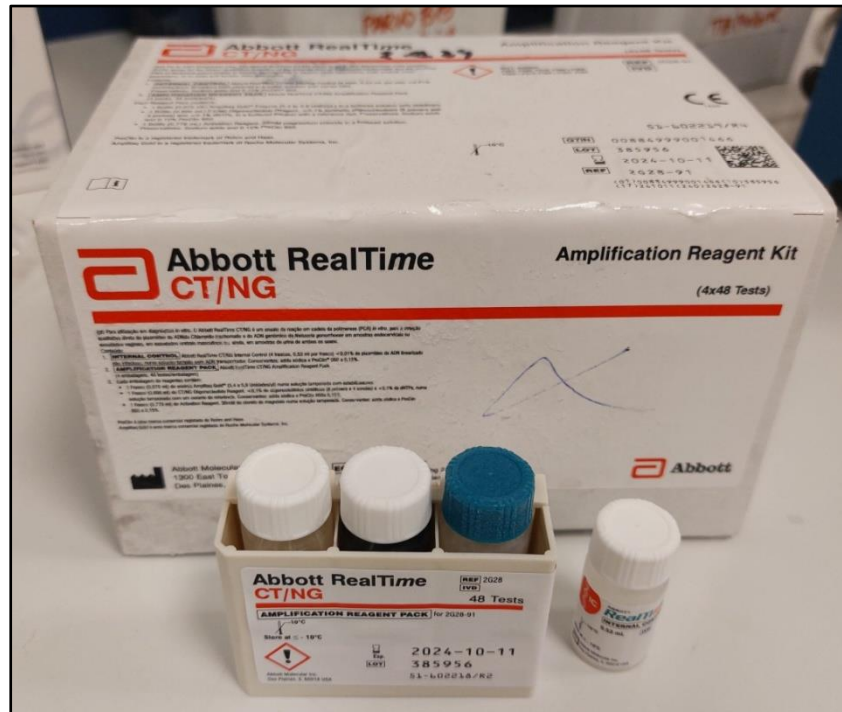


Slika 6. Abbott m2000sp uređaj (izvor: autor)

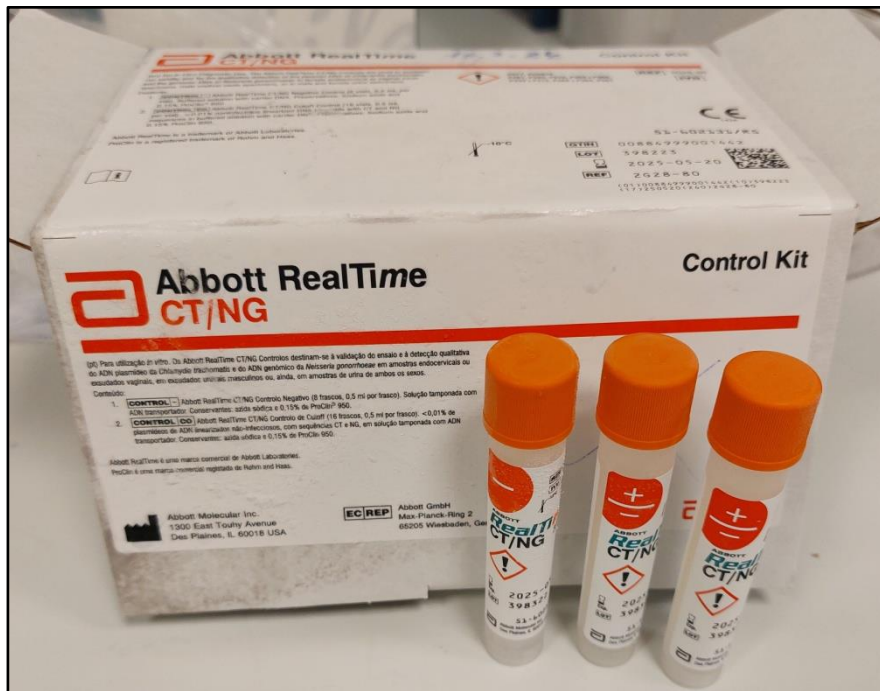


Slika 7. Abbott m2000rt uređaj (izvor: autor)

Abbott RealTime CT/NG test sastoji se od dva kompleta reagensa: Abbott RealTime CT/NG set reagensa za amplifikaciju (Abbott Molecular, SAD) (Slika 8) i Abbott RealTime CT/NG kontrolni set (Abbott Molecular, SAD) (Slika 9). Abbott RealTime CT/NG set reagensa za amplifikaciju (Abbott Molecular, SAD) sadrži internu kontrolu (manje od 0,01% neinfektivnog lineariziranog DNA plazmida u puferskoj otopini s DNA nosačem i konzervansi natrijev azid i 0,15% ProClin®950) te set reagensa za amplifikaciju koji čine DNA polimeraza u puferiranoj otopini sa stabilizatorima, amplifikacijski reagens (manje od 0,1% sintetskih oligonukleotida (8 početnica i 4 sonde) i manje od 0,1% dNTP u puferiranoj otopini s referentnom bojom i konzervanse natrijev azid i 0,15% ProClin®950) i aktivacijski reagens (38 mM magnezijevog klorida u puferiranoj otopini i konzervansi natrijev azid i 0,15% ProClin®950). Abbott RealTime CT/NG kontrolni set (Abbott Molecular, SAD) sadrži Abbott RealTime CT/NG negativnu kontrolu (puferirana otopina s DNA nosačem i konzervansi natrijev azid i 0,15% ProClin®950) i Abbott RealTime CT/NG cutoff kontrolu (manje od 0,01% neinfektivnih lineariziranih DNA plazmida s CT i NG sekvencama u puferiranoj otopini s nosačem DNA i konzervansi natrijev azid i 0,15% ProClin®950). (30)



Slika 8. Abbott RealTime CT/NG set reagensa za amplifikaciju (izvor: autor)



Slika 9. Abbott RealTime CT/NG kontrolni set (izvor: autor)

3.2.2.1. Princip rada Abbott RealTime CT/NG testa

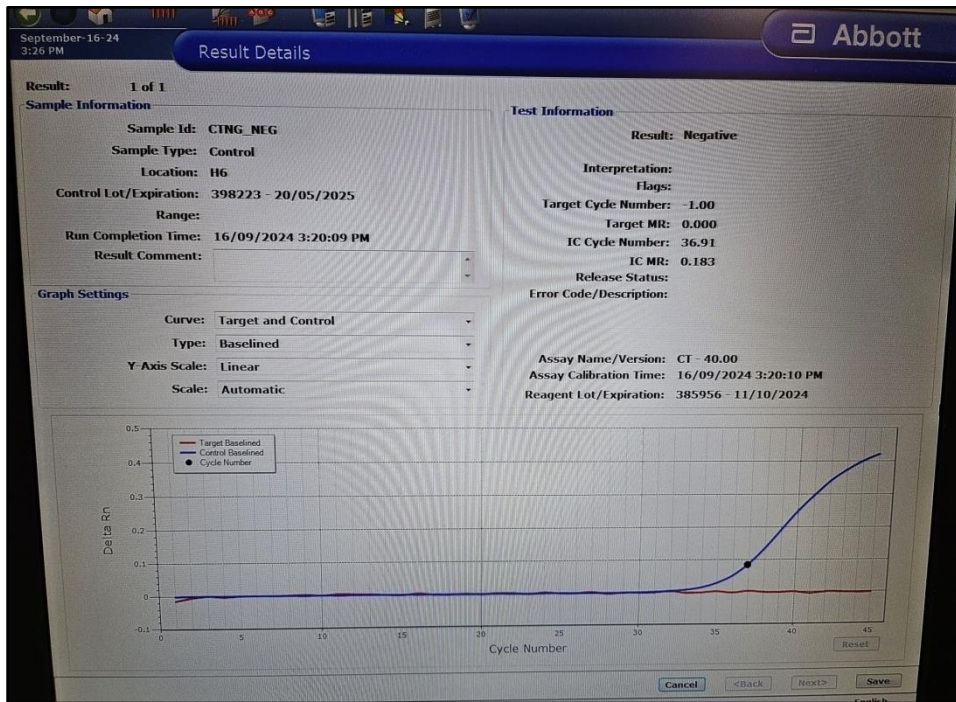
Uzorak DNA se umnožava pomoću PCR reakcije. Regens za amplifikaciju sadrži specifične početnice za *C. trachomatis* i *N. gonorrhoeae* i za internu kontrolu. Tijekom faze PCR amplifikacije dolazi do visoke temperature koja odvaja dvolančane DNA. Nakon toga dolazi do smanjenja temperature pri čemu se oligonukleotidne početnice jednolančane DNA specifične za određeni analit vežu za DNA analita to jest uzorka. Početnice se produljuju pomoću AmpliTaq Gold DNA[®] DNA polimeraze (Abbott Molecular, SAD) pri čemu se stvara kopija kratkog ciljnog dijela DNA analita. DNK *C. trachomatis* sadrži i kriptični plazmid koji se nalazi u svim serovarima u oko 7 do 10 kopija po organizmu. Stoga amplifikacijski reagens sadrži dva seta PCR početnica za *C. trachomatis* koje ciljaju dvije različite regije plazmida. Oba seta početnica ciljaju kratke sekvence koje se nalaze u svim serovarima *C. trachomatis* i nisu prisutne u drugim vrstama. Prvi set *C. trachomatis* početnica cilja 102 para baza unutar plazmida, a drugi set PCR početnica cilja 140 parova baza koje se nalaze izvan prethodno izbrisane regije. Početnice *N. gonorrhoeae* ciljaju na regiju Opa gena *N. gonorrhoeae* i to sekvencu od 122 parova baza jer se nalazi u svim sojevima *N.*

gonorrhoeae, osim u nespolnim *Neisseriam*. Početnice interne kontrole ciljaju 136 baza sekvenci koje nisu povezane sa CT/NG sekvencama analita. Tijekom svakog procesa amplifikacije fluorescentne probe se spajaju sa ciljnom DNA. Probe su označene različitim fluorescentnim molekulama čime se omogućuje razlikovanje *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* i interne kontrole. Fluorescentne probe su linearni jednolančani oligonukleotidi koji su posebno modificirani i fluorescentnom polovicom su kovalentno vezani za jedan kraj probe i suzbijajućim dijelom su vezani za drugi kraj probe. Prilikom vezanja probe sa komplementarnom sekvencom, fluoroforni dio i suzbijajući dio se drže odvojeni pri čemu se javlja fluorescentna emisija i detekcija. S obzirom na to da se ta fluorescencija javlja prilikom svakog ciklusa, PCR reakcija se može očitati u stvarnom vremenu. (30)

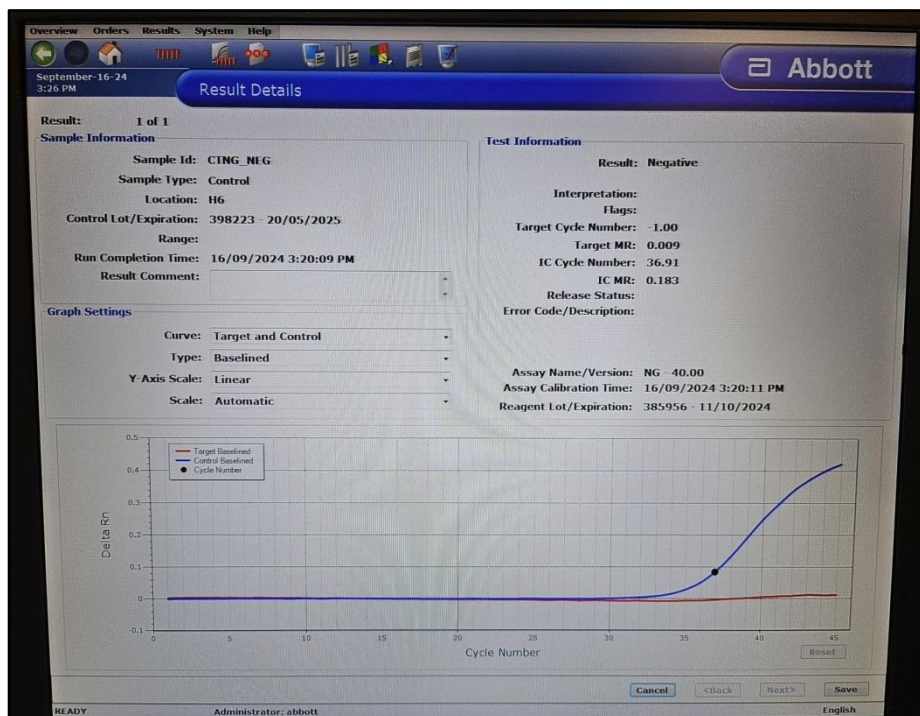
3.2.2.2. Prikaz rezultata

Nakon završene analize, rezultati se očitavaju na Abbott m2000rt uređaju (Abbott Molecular, SAD). S obzirom na to da je Abbott RealTime CT/NG kvalitativni test, za izvođenje svakog testa potrebna je negativna kontrola i dvije kopije granične kontrole koje su na uređaju označene kao kalibrator. Za svaku traženu pretragu (*C. trachomatis* ili *N. gonorrhoeae*) uređaj izračuna ciljanu vrijednost broja ciklusa (CN – cycle number) od granične kontrole te zbroji predodređen broj ciklusa kako bi se izračunao granični broj ciklusa (CO – assay cutoff). Ako je kod testiranog uzorka broj ciklusa manji ili jednaki graničnom broju ciklusa (CO), rezultat se izdaje kao pozitivan. Uzorci u kojima nije došlo do procesa amplifikacije izdaju se kao negativni. Negativna kontrola služi kao provjera da kod pripreme uzorka i postavljanja amplifikacijske reakcije nije došlo do kontaminacije sa DNA *C. trachomatis* ili *N. gonorrhoeae*. Interna kontrola služi kao provjera da je svaki uzorak pravilno obrađen i da nisu prisutne tvari koje inhibiraju PCR reakciju. (30)

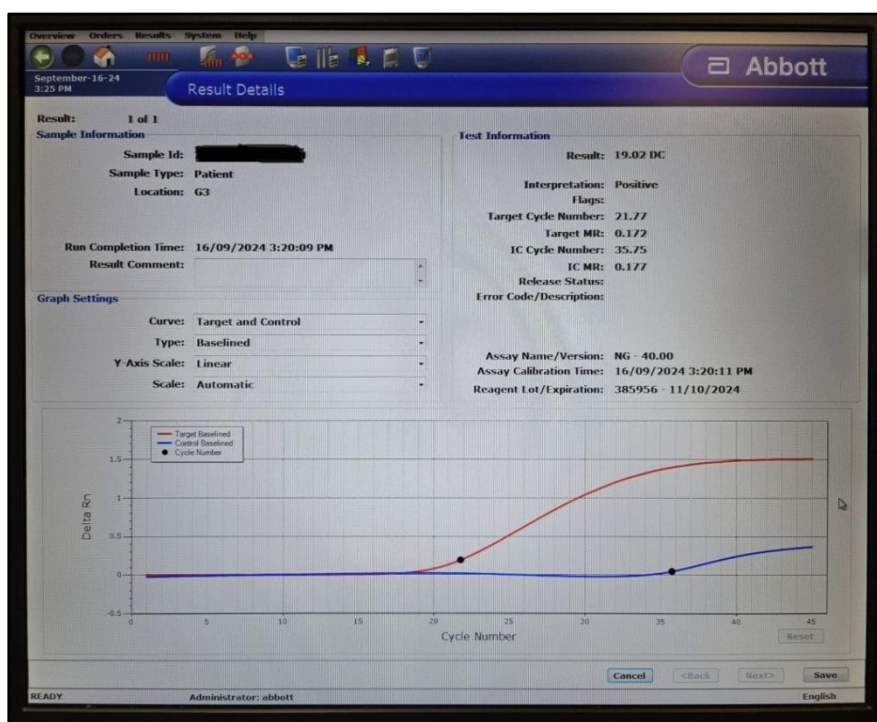
Slike 10 i 11 prikazuju negativne kontrole *C. trachomatis* i *N. gonorrhoeae*. Na slici 12 prikazan je primjer pozitivnog testa na *N. gonorrhoeae*.



Slika 10. Prikaz negativne kontrole *C. trachomatis* (izvor:autor)



Slika 11. Prikaz negativne kontrole *N. gonorrhoeae* (izvor: autor)



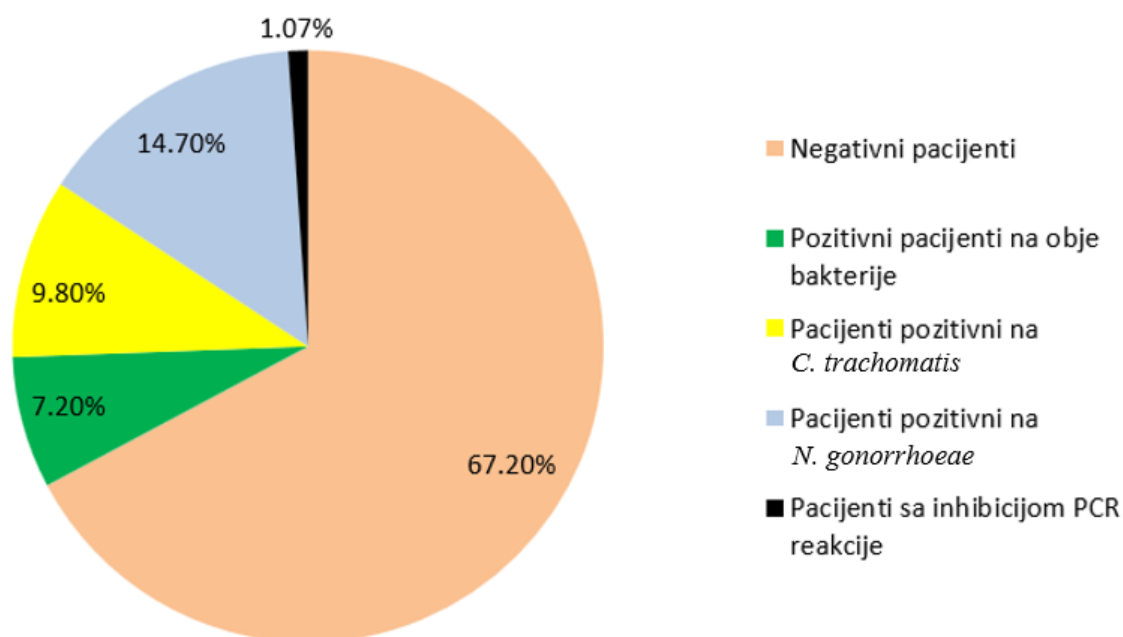
Slika 12. Prikaz pozitivnog testa na *N. gonorrhoeae* (izvor: autor)

3.2.3. Statističke metode

Svi rezultati istraživanja su obrađeni metodama deskriptivne statistike koristeći program Microsoft Excel (Microsoft Office 2007). Statističke metode koje su korištene u Excelu su: brojanje (Count), sumarijacija podataka SUM funkcijom (SUM), postotci (Percentage). Navedene metode omogućuju sveobuhvatnu analizu i razumijevanje podataka prilikom uspoređivanja rezultata uzoraka testiranih na *C. trachomatis* i *N. gonorrhoeae*.

4. REZULTATI

U Klinici za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“, u Odjelu za imunološku i molekularnu dijagnostiku u vremenskom razdoblju od 1. siječnja do 31. prosinca 2022. godine analizirani su biološki uzorci 372 muška pacijenata na bakterije *C. trachomatis* i *N. gonorrhoeae*. Za svakog muškarca prikupljeni su uzorci urina, brisa rektuma i brisa orofarinksa te je ukupno analizirano 1116 uzoraka. Kod 250 ispitanika (67,2%) testirani uzorci bili su negativni na obje bakterije, 27 (7,2%) je bilo pozitivno na obje bakterije, 36 (9,8%) je bilo pozitivno na *C. trachomatis*, 55 (14,7%) je bilo pozitivno na *N. gonorrhoeae* dok je kod 4 ispitanika (1,07%) detektirana inhibicija PCR reakcije (Graf 1).



Graf 1. Rapodjela ispitanika testiranih na bakterije *C. trachomatis* i *N. gonorrhoeae* s obzirom na rezultat analize

S rasponom godina ispitanika između 20 i 60 godina, ukupni medijan dobi iznosi 34 godine. Od ukupnog broja testiranih pacijenata, većina (43,8%) je bila u dobnoj skupini od 20-32 godine (Tablica 8). Također, utvrđeno je da većina pacijenata (43,8%) pozitivnih na obje bakterije pripada dobnoj skupini između 20 i 32 godine (Tablica 9).

Tablica 8. Raspodjela ispitanika testiranih na bakterije *C.trachomatis* i *N. gonorrhoeae* s obzirom na dob

| DOB (godine) | BROJ (%) PACIJENATA (N = 372) |
|---------------------|--------------------------------------|
| 53 – 60 | 11 (2,9%) |
| 43 – 51 | 60 (16%) |
| 33 – 42 | 138 (37,1%) |
| 20 – 32 | 163 (43,8%) |

Tablica 9. Raspodjela ispitanika pozitivnih na bakterije *C.trachomatis* i *N. gonorrhoeae* s obzirom na dob

| DOB (godine) | BROJ (%) PACIJENATA (N = 27) |
|---------------------|-------------------------------------|
| 53 – 60 | 1 (3,7%) |
| 43 – 51 | 3 (11,1%) |
| 33 – 42 | 10 (37%) |
| 20 – 32 | 13 (48%) |

Tablica 10 prikazuje udio pacijenata pozitivnih na *C. trachomatis* te je vidljivo da ih je najviše u dobnoj skupini između 33 i 42 godine (47,2%). U dobnoj skupini između 23 i 32 godine je najviše pacijenata (43,6%) pozitivno na *N. gonorrhoeae* (Tablica 11). Najmanje pozitivnih pacijenata kod obje bakterije zabilježeno je u dobnoj skupini između 53 i 60 godina.

Tablica 10. Raspodjela ispitanika pozitivnih na bakteriju *C.trachomatis* s obzirom na dob

| DOB (godine) | BROJ (%) PACIJENATA (N = 36) |
|---------------------|-------------------------------------|
| 53 – 60 | 1 (2,7%) |
| 43 – 51 | 5 (13,8%) |
| 33 – 42 | 17 (47,2%) |
| 20 – 32 | 13 (36,1%) |

Tablica 11. Raspodjela ispitanika pozitivnih na bakteriju *N. gonorrhoeae* s obzirom na dob

| DOB (godine) | BROJ (%) PACIJENATA (N = 55) |
|---------------------|-------------------------------------|
| 53 – 60 | 2 (3,6%) |
| 43 – 51 | 9 (16,4%) |
| 33 – 42 | 20 (36,4%) |
| 20 – 32 | 24 (43,6%) |

Inhibicija PCR reakcije bila je prisutna u uzorcima 4 ispitanika, odnosno kod 1% od ukupnog broja testiranih pacijenata te nije utvrđena u uzorcima koji pripadaju dobnoj skupini između 20 i 32 godine (Tablica 12). Svi uzorci u kojima je zabilježena inhibicija PCR reakcije su brisevi rektuma.

Tablica 12. Udio pacijenata sa inhibicijom PCR reakcije s obzirom na dob

| DOB (godine) | BROJ (%) PACIJENATA (N = 4) |
|---------------------|------------------------------------|
| 53 – 60 | 1 (25%) |
| 43 – 51 | 1 (25%) |
| 33 – 42 | 2 (50%) |
| 20 – 32 | 0 (0%) |

Od ukupnog broja analiziranih uzoraka većina pozitivnih na obje bakterije su uzorci brisa rektuma, njih 47 (4,21%) pozitivnih na *C. trachomatis* i 60 (5,37%) pozitivnih na *N. gonorrhoeae*.

Tablica 13. Udio pojedinih vrsta bioloških uzoraka pozitivnih na bakterije *C. trachomatis* i *N. gonorrhoeae*

| BROJ (%) POZITIVNIH UZORAKA (N = 1116) | <i>C. trachomatis</i> | <i>N. gonorrhoeae</i> | <i>C. trachomatis</i> i <i>N. gonorrhoeae</i> |
|---|-----------------------|-----------------------|--|
| Urin | 13 (1,16%) | 13 (1,16%) | 4 (0,36%) |
| Bris orofarinksa | 7 (0,63%) | 53 (4,75%) | 2 (0,18%) |
| Bris rektuma | 47 (4,21%) | 60 (5,37%) | 38 (3,40%) |

N. gonorrhoeae detektirana je u sve tri vrste bioloških uzoraka kod 4 (1,07%) pacijenta. Kod pacijenata kod kojih je *N. gonorrhoeae* detektirana u dvije vrste bioloških uzoraka, njih 5 (1,34%) je imalo *N. gonorrhoeae* pozitivnu u uzorcima urina i brisa rektuma, a 22 (5,91%) pacijenta u uzorcima brisa orofarinksa i brisa rektuma.

C. trachomatis nije bila pozitivna u sva tri uzorka kod niti jednog pacijenta. Kod 2 (0,54%) pacijenta je detektirana u dvije vrste bioloških uzoraka: kod jednog pacijenta je detektirana u uzorcima urina i brisa rektuma, a kod drugog pacijenta je detektirana u uzorcima brisa orofarinksa i brisa rektuma.

Kod pacijenata kod kojih su u biološkim uzorcima detektirane obje bakterije, kod njih 13 (3,50%) su bakterije detektirane u dvije vrste uzorka, dok su kod 2 (0,54%) pacijenta sva tri biološka uzorka pozitivna.

5. RASPRAVA

Spolno-prenosive infekcije predstavljaju globalni problem koji utječe na spolno i reproduktivno zdravlje muškaraca i žena diljem svijeta. Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije, svakodnevno oko milijun ljudi oboli od neke izlječive spolno-prenosive infekcije. Procjenjuje se da je 2020. godine zabilježeno 374 milijuna novih infekcija, od čega je 129 milijuna infekcija sa *C. trachomatis* te 82 milijuna infekcija sa *N. gonorrhoeae*. (31).

Prema podacima registra zaraznih bolesti i registra za HIV/AIDS u Hrvatskoj se u posljednjih 5 godina godišnje prosječno bilježi oko 129 oboljelih od infekcije *C. trachomatis* i 24 oboljelih od infekcije *N. gonorrhoeae* (32). Nakon razdoblja pandemije, 2022. godine dolazi do povećanog broja pozitivnih slučajeva na *C. trachomatis* pri čemu su zabilježeni novi rekordi pozitivnih slučajeva i kod muškaraca i kod žena za 2022. godinu u Europi, prema Europskom centru za prevenciju i kontrolu bolesti (ECDC-u) (4). Od ukupno 216 176 prijavljenih pozitivnih slučajeva na *C. trachomatis*, njih 103 119 je zabilježeno kod muškaraca (4). Najviše prijavljenih slučajeva, njih 40% je bilo kod pacijenata u dobi između 20 i 24 godine, a u dobi između 25 i 34 godine je bilo 27% prijavljenih slučajeva pozitivnih na *C. trachomatis* u 2022. godini (4). Broj prijavljenih slučajeva pozitivnih na *C. trachomatis* kod muškaraca koji imaju spolne odnose s muškarcima (MSM) povećao se za 72% u razdoblju od 2018. do 2022. godine (4).

Tijekom godina došlo je do porasta i infekcija *N. gonorrhoeae* pa je tako 2022. godine u Europi zabilježeno 59% više prijavljenih pozitivnih slučajeva u odnosu na 2018. godinu (9). Većina pacijenata pozitivnih na *N. gonorrhoeae* u 2022. godini kod oba spola je bila u dobnoj skupini od 20 do 24 godine, a više od pola prijavljenih slučajeva, njih 60% su činili muškarci iz MSM populacije (9).

Iz navedenih podataka za obje bakterije možemo zaključiti kako je infekcijama izložena mlađa populacija koja je sklona eksperimentiranju i seksualnim odnosima bez zaštite. Ovo istraživanje je u skladu s tim zaključkom jer je najviše testiranih i pozitivnih pacijenata bilo u dobi između 20 i 32 godinete se poklapa sa godišnjim izvješćima ECDC-a za bakterije *C. trachomatis* i *N. gonorrhoeae* za 2022. godinu (4, 9).

C.trachomatis i *N. gonorrhoeae* su gram negativne bakterije koje inficiraju epitelne stanice uretre pri čemu su simptomi infekcije donjeg genitalnog trakta izraženi kod malog broja bolesnika. Većina infekcija prođe nedijagnosticirano čime se ujedno povećava rizik od daljnjeg širenja bolesti i razvoja težih simptoma. U današnje vrijeme analize su usmjerene na programe probira za prepoznavanje i liječenje zaraženih pacijenata i njihovih partnera pri čemu se kod muškaraca uzorkuju biološki uzorci urina, brisa orofarinksa i brisa rektuma. Navedeni uzorci su učinkoviti pokazatelj infekcije bakterijama *C.trachomatis* i *N. gonorrhoeae* kada se testiraju testovima amplifikacije nukleinskih kiselina (eng. Nucleic Acid Amplification Test – NAAT) poput lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (33). Danas se većinom koristi Abbott m2000sp sustav za dvojni detekciju bakterija iako već postoje i noviji uređaji koji mogu detektirati i četiri vrste bakterija iz jednog uzorka. Takav sustav je Abbott Alinity platforma koja bi u budućnosti zamijenila Abbott m2000sp sustav. U Švedskoj je 2021. godine napravljena komparativna studija s ciljem uvođenja uređaja nove generacije Alinity, umjesto do sada korištene RealTime m2000 platforme. Studijom se pokazalo kako oba testa imaju jednako dobru osjetljivost za detekciju bakterija *C. trachomatis* i *N. gonorrhoe* (18).

Za potrebe ovog rada testiranje uzoraka na bakterije *C. trachomatis* i *N. gonorrhoeae* odrađeno je Abbott RealTime CT/NG testom koji je dovoljno osjetljiv i specifičan kako bi mogao detektirati plazmidnu DNA *C. trachomatis* i genomsku DNA *N. gonorrhoeae*. U Oaklandu je 2020. godine odrađena evaluacija Abbott RealTime CT/NG za uzorke brisa orofarinksa i brisa rektuma (36). Navedenom evaluacijom došlo se do zaključka da je Abbott RealTime CT/NG test točan, osjetljiv i specifičan za otkrivanje bakterija *C. trachomatis* i *N. gonorrhoeae* u uzorcima brisa rektuma i brisa orofarinksa što se potvrdilo i ovim radom. U Klinici za infektivne bolesti „dr. Fran Mihaljević“ Abbott RealTime CT/NG test se koristi za rutinski rad detekcije uzročnika spolno-prenosivih infekcija te bi u budućnosti mogao služiti i kao metoda probira za bakterije *C. trachomatis* i *N. gonorrhoeae*.

Prema dostupnoj literaturi, ovo je prvo istraživanje u Republici Hrvatskoj gdje se uspoređuju rezultati PCR testiranja dviju bakterija na tri različita biološka uzorka kod muškaraca. Ukupno je testirano 372 pacijenta od kojih su uzorci kod 250 (67,2%) pacijenata bili negativni na obje bakterije, 27 (7,2%) je bilo pozitivno na obje bakterije, a kod 4 (1,07%) pacijenta je detektirana inhibicija PCR reakcije. Na *C. trachomatis* je bilo pozitivno 36 (9,8%) pacijenata, dok je većina, odnosno 55 (14,7%) pacijenata bilo pozitivno na *N. gonorrhoeae*. Rezultati dobiveni u ovome radu slični su studiji iz 2015. godine u SAD-u gdje je testirano 260

muškaraca kojima su izuzeti uzorci urina, brisa orofarinksa i brisa rektuma te su testirani na bakterije *C. trachomatis* i *N. gonorrhoeae* Abbott m2000 RT-PCR CT/NG testom (34). Osim što je metoda detekcije bakterija ista kao i u ovom istraživanju, također je evidentirano više pozitivnih pacijenata na *N. gonorrhoeae* u odnosu na *C. trachomatis*. U rezultatima studije iz SAD-a kod 38 pacijenata je detektirana *N. gonorrhoeae*, a kod 26 pacijenata *C. trachomatis* (34).

Također, rezultati ovog istraživanja u korelaciji su s podacima Europskog centra za prevenciju i kontrolu bolesti (EDCD-u) prema kojima je 2022. godine broj prijavljenih slučajeva na spolno-prenosive infekcije porastao za 48% za *N. gonorrhoeae* i za 16% za *C. trachomatis* u odnosu na 2021. godinu (35).

U Velikoj Britaniji je između 2012. i 2013. godine provedena studija gdje su pacijenti sami uzorkovali uzorke urina, brisa orofarinksa i brisa orofarinksa za detekciju bakterija *C. trachomatis* i *N. gonorrhoeae*. Usporedno su im zdravstveni djelatnici uzrokovali briseve orofarinksa i brisa rektuma. Rezultati su pokazali sličnu učinkovitost za detekciju bakterija *C. trachomatis* i *N. gonorrhoeae* u usporedbi s uzorcima koje su prikupili zdravstveni djelatnici (37). Za potrebe ovog istraživanja, pacijenti su sami izuzimali uzorak brisa rektuma i uzorak urina, dok je uzorak brisa orofarinksa izuzimalo medicinsko osoblje. Rezultati su pokazali malu stopu inhibicije PCR reakcije, svega 1,07% kod 4 pacijenta u uzorcima brisa rektuma. S obzirom na mali broj rezultata inhibicije PCR reakcije može se zaključiti kako su pacijenti bili pravilno educirani za izuzimanje uzorka, ali i da je bris rektuma osjetljiv uzorak za analizu. Dobiveni rezultati daju mogućnost za samostalno uzorkovanje uzoraka kod kuće ili u nekliničkim uvjetima te smanjuju moguće neugodnosti pacijentima. U Melbourneu je 2020. godine provedeno istraživanje samostalnog izuzimanja uzoraka brisa orofarinksa na bakterije *C. trachomatis* i *N. gonorrhoeae* od strane muških pacijenata s obzirom na pandemiju COVID-19 (38). Rezultati su pokazali kako je bilo više nevažćih testova na *N. gonorrhoeae* kod uzoraka brisa orofarinksa koje su pacijenti sami uzimali. Što se tiče pozitivnih rezultata na obje bakterije, rezultati su u oba slučaja izuzimanja uzoraka bili podjednaki (38). Sukladno tome, može se zaključiti kako brisevi orofarinksa izuzeti od strane pacijenata za detekciju bakterija *C. trachomatis* i *N. gonorrhoeae* jesu prihvatljivi uzorak za analizu te smanjuju izravnu izloženost zdravstvenih djelatnika respiratornim infekcijama.

Od ukupnog broja od 1116 analiziranih uzoraka u ovom radu, najviše detektiranih bakterija je iz uzorka brisa rektuma: *C. trachomatis* detektirana je kod 47 (4,21%) uzoraka brisa rektuma,

a *N. gonorrhoeae* kod 60 (5,37%). U Italiji je 2017. godine provedena studija za procjenu prevalencije ekstragenitalnih infekcija *C. trachomatis* i *N. gonorrhoeae* u kojoj je uzorkovano 165 uzoraka brisa rektuma, 131 uzorak urina i 84 brisa orofarinksa muškaraca (39). Rezultati studije u korelaciji su sa rezultatima ovoga rada usprkos razlici u broju uzoraka. Najviše pozitivnih uzoraka je bilo iz brisa rektuma te je 45 (27,2%) uzoraka brisa rektuma bilo pozitivno na *N. gonorrhoeae* i 42 (25,4%) je bilo pozitivno na *C. trachomatis*. Iz navedenog se može zaključiti kako su rektalne infekcije zapravo učestale te u mnogim slučajevima bez kliničkih simptoma. Screening koji obuhvaća ekstragenitalne uzorke zajedno sa ispravnom dijagnozom i odgovarajućim liječenjem ključan je za prevenciju daljnjeg prijenosa spolno-prenosivih infekcija.

Danas su dostupnost brzih molekularnih metoda i mogućnost samostalnog izuzimanja uzoraka velika prednost u detekciji bakterija *C. trachomatis* i *N. gonorrhoeae*. Omogućen je probir čime se umanjuje širenje zaraznih infekcija i bolesti. Takvo probirno testiranje na spolno-prenosive infekcije molekularnim metodama uz adekvatne edukacije mladih osoba o spolno-prenosivim infekcijama trebalo bi postati standard u svim zemljama.

Nedostatak ovog rada je nedovoljno informacija o anamnezi pacijenata. U budućem radu trebalo bi koristiti podatke iz anamneze što bi omogućilo nove spoznaje poput simptoma infekcija, učestalosti asimptomatskih infekcija te povezanosti sa drugim spolno-prenosivom bolestima.

6. ZAKLJUČAK

- Rezultati ove retrospektivne studije upućuju na važnost molekularnih testova kod detekcije spolno-prenosivih bolesti jer molekularno testiranje na Abbott m2000 sustavu omogućuje brzu dijagnostiku iz manje količine uzorka te istovremenu detekciju dviju vrsta bakterija čime se smanjuje broj uzoraka u laboratoriju i vrijeme izdavanja nalaza
- Analizom rezultata utvrđeno je da je većina testiranih pacijenata kod kojih je utvrđeno da su uzorci pozitivni na obje bakterije (*C. trachomatis* i *N. gonorrhoeae*) bila u dobnoj skupini između 20 i 32 godine starosti što upućuje da je većinom riječ o mladim osobama. Takvi rezultati potencijalno upućuju na nedostatak informiranosti kod mladih osoba o rizicima spolnih odnosa i o spolno-prenosivim infekcijama
- Od 372 pacijenta kojima je izvršena analiza 3 vrste bioloških uzoraka na bakterije *C. trachomatis* i *N. gonorrhoeae*, njih 250 (67,2%) je bilo negativno na obje bakterije, a 27 (7,2%) je bilo pozitivno na obje bakterije
- Analizom podataka utvrđeno je da je 36 (9,8%) pacijenata je bilo pozitivno na *C. trachomatis*, a 55 (14,7%) pacijenata je bilo pozitivno na *N. gonorrhoeae*
- U odnosu na vrstu biološkog uzorka, od ukupnog broja testiranih uzoraka najviše je pozitivnih rezultata bilo iz uzorka brisa rektuma, 47 (4,21%) pozitivnih na *C. trachomatis*, 60 (5,37%) pozitivnih na *N. gonorrhoeae* te 38 (3,40%) pozitivnih na obje bakterije
- U uzorcima rektuma detektirana je inhibicija PCR reakcije kod 4 (1,07%) pacijenta. S obzirom na to da je bris rektuma uzorak koji pacijenti sami uzorkuju, za buduće analize trebalo bi dodatno adekvatno educirati pacijente o uzorkovanju uzorka
- S obzirom na to da infekcije *C. trachomatis* i *N. gonorrhoeae* mogu biti asimptomatske, preporučuje se u budućnosti raditi probirni test u određenoj populaciji kako bi se spriječilo daljnje širenje infekcije

7. LITERATURA

1. Begovac JB, Bruno; Kuzman, Ilija etal. (ur.) , Zagreb: Medicinska naklada. Klinička infektologija 2019.
2. World Health Organization, Research DoRHa. Guidelines for the management of symptomatic sexually transmitted infections. June 2021
3. HUHIV. Spolno prenosive bolesti u porastu diljem Europe 2024. [Available from: <https://huhiv.hr/spolno-prenosive-bolesti-u-porastu-diljem-europe/>].
4. Control ECfDPa. Chlamydia - Annual Epidemiological Report for 2022. Stockholm: European Centre for Disease Prevention and Control 2024.
5. Mohseni M, Sung S, Takov V, Doerr C. Chlamydia (Nursing). 2021.
6. Rodrigues R, Sousa C, Vale N. Chlamydia trachomatis as a Current Health Problem: Challenges and Opportunities. 2022;12(8):1795.
7. Monden K, Kumon H, Nishimura J, Ojima M. Genital chlamydial infection. 2009;67(1):125-8.
8. O'Connell CM, Ferone ME, JMc. Chlamydia trachomatis genital infections. 2016;3(9):390.
9. Control. ECfDPa. Gonorrhoea. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2022. Stockholm: ECDC; European Centre for Disease Prevention and Control.; 2024.
10. Quillin SJ, Seifert HS. Neisseria gonorrhoeae host adaptation and pathogenesis. Nature Reviews Microbiology. 2018;16(4):226-40.
11. Control ECfDPa. Gonorrhoea [Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/en/gonorrhoea>].
12. Unemo M, Seifert HS, Hook EW, Hawkes S, Ndowa F, Dillon J-AR. Gonorrhoea. Nature Reviews Disease Primers. 2019;5(1):79.
13. Khalil G Ghanem M, PhD. Clinical manifestations and diagnosis of Neisseria gonorrhoeae infection in adults and adolescents 2023. [Available from: <https://medilib.ir/uptodate/show/15893>].
14. Caruso G, Giammanco A, Virruso R, Fasciana T. Current and Future Trends in the Laboratory Diagnosis of Sexually Transmitted Infections. 2021;18(3):1038.
15. Organization WH. Laboratory and point-of-care diagnostic testing for sexually transmitted infections, including HIV: World Health Organization; 2023.
16. Peng L CJ, Wang D. Progress and Perspectives in Point of Care Testing for Urogenital Chlamydia trachomatis Infection: A Review. Med Sci Monit. 2020.

17. Meyer T, Buder S. The Laboratory Diagnosis of Neisseria gonorrhoeae: Current Testing and Future Demands. 2020;9(2):91.
18. Herrmann B MK. Comparison between Abbott m2000 RealTime and Alinity m STI systems for detection of Chlamydia trachomatis, Neisseria gonorrhoeae, and Mycoplasma genitalium. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2021.
19. Van Dyck E IM, Pattyn S, Van Damme L, Laga M. Detection of Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae by enzyme immunoassay, culture, and three nucleic acid amplification tests. J Clin Microbiol 2001.
20. Khehra N PI, Swift CJ. Polymerase Chain Reaction (PCR): StatPearls Publishing; 2023. [Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK589663/>].
21. Hanzer RDK. Važnost kvalitete DNA u Real Time PCR reakcijama. Zbornik sažetaka 56 hrvatski i 16 međunarodni simpozij agronoma, Osijek. 2021.:120-1.
22. Schrader C, Schielke A, Ellerbroek L, John R. PCR inhibitors – occurrence, properties and removal. Journal of Applied Microbiology. 2012;113(5):1014-26.
23. Adamson PC, Klausner JD. Diagnostic Tests for Detecting Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae in Rectal and Pharyngeal Specimens. 2022;60(4):e00211-21.
24. Tonkić M, Sušić E, Goić-Barišić I, Kaliterna V, Tambić Andrašević AJHLZ. Bakteriološka dijagnostika infekcija mokraćnog i spolnog sustava. 1-46.
25. HZJZ. Upute za uzimanje i slanje uzoraka [Available from: <https://www.hzjz.hr/sluzba-mikrobiologija/upute-za-uzimanje-i-slanje-uzoraka/>].
26. Best Practices for Oral STI Testing 2024 [Available from: <https://blog.puritanmedproducts.com/best-practices-for-oral-sti-testing>].
27. Chow EPF, Bradshaw CS, Williamson DA, Hall S, Chen MY, Phillips TR, et al. Changing from Clinician-Collected to Self-Collected Throat Swabs for Oropharyngeal Gonorrhea and Chlamydia Screening among Men Who Have Sex with Men. 2020;58(9):10.1128/jcm.01215-20.
28. CDC. Sexually Transmitted Infections Treatment Guidelines, 2021: Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR); 2021 [Available from: <https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/70/rr/rr7004a1.htm?fbclid=IwAR1ShNYWaOR0ZZdet-tOpPm7sizhaS1PecpaCpWkPVzHgUTIGnJL834dTg0#suggestedcitation>].
29. MULTI-COLLECT SPECIMEN COLLECTION KIT [Available from: <https://www.molecular.abbott/int/en/products/infectious-disease/multi-collect-specimen-collection-kit>].

30. Abbott RealTime CT/NG [Available from: <https://www.molecular.abbott/content/dam/add/molecular/products/pdf/-ctng-8107-91-us-final.pdf>].
31. WHO. Sexually transmitted infections (STIs) 2024 [Available from: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/sexually-transmitted-infections-\(stis\)?gad_source=1&gclid=CjwKCAjwodC2BhAHEiwAE67hJDIzYAA4pp7QLE7jEhOcywvIn9qPsw57C6edJU skeZW5EFa4IDIWfRoCFxEQAvD_BwE](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/sexually-transmitted-infections-(stis)?gad_source=1&gclid=CjwKCAjwodC2BhAHEiwAE67hJDIzYAA4pp7QLE7jEhOcywvIn9qPsw57C6edJU skeZW5EFa4IDIWfRoCFxEQAvD_BwE)].
32. HZJZ. Neki pokazatelji rizičnih ponašanja za krvlju i spolno-prenosive infekcije u Hrvatskoj. 2024. [Available from <https://www.hzjz.hr/sluzba-epidemiologija-zarazne-bolesti/neki-pokazatelji-rizicnih-ponasanja-za-krvlju-i-spolno-prenosive-infekcije-u-hrvatskoj/>].
33. Marshall R, Chernesky M, Jang D, Hook EW, Cartwright CP, Howell-Adams B, et al. Characteristics of the m2000 automated sample preparation and multiplex real-time PCR system for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *Journal of clinical microbiology*. 2007;45(3):747-51.
34. Moncada J, Shayevich C, Philip SS, Lucic D, Schachter J. Detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in Rectal and Oropharyngeal Swabs and Urine Specimens from Men Who Have Sex With Men with Abbott's M2000 RealTime. *Sexually transmitted diseases*. 2015;42(11):650-1.
35. Control ECfDPa. STI cases on the rise across Europe. Stockholm: European Centre for Disease Prevention and Control 2024.
36. Adamson PC, Pandori MW, Doernberg SB, Komarow L, Sund Z, Tran TTT, et al. Analytical Evaluation of the Abbott RealTime CT/NG Assay for Detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in Rectal and Pharyngeal Swabs. *The Journal of Molecular Diagnostics*. 2020;22(6):811-6.
37. B. Sultan JAW, R. Fish, G. Carrick, N. Brima, A. Copas, A. Robinson, R. Gilson, D. Mercey, P. Benn. The "3 in 1" Study: Pooling Self-Taken Pharyngeal, Urethral, and Rectal Samples into a Single Sample for Analysis for Detection of *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* in Men Who Have Sex with Men. *Journal of clinical microbiology*. 2016.
38. Chow EPF, Bradshaw CS, Williamson DA, Hall S, Chen MY, Phillips TR, et al. Changing from Clinician-Collected to Self-Collected Throat Swabs for Oropharyngeal Gonorrhoea and Chlamydia Screening among Men Who Have Sex with Men. *Journal of clinical microbiology*. 2020;58(9).

39. Foschi C, Gaspari V, Sgubbi P, Salvo M, apos, Antuono A, et al. Sexually transmitted rectal infections in a cohort of 'men having sex with men'. 2018;67(8):1050-7.

8. SAŽETAK

Usporedba učestalosti infekcije bakterijama *Chlamydia trachomatis* i *Neisseria gonorrhoeae* iz različitih bioloških uzoraka muškaraca

Cilj: Usporediti učestalost infekcija bakterijama *Chlamydia trachomatis* i *Neisseria gonorrhoeae* u različitim biološkim uzrocima muškaraca u razdoblju od 01.01.2022. do 31.12.2022.g. u Odjelu za imunološku i molekularnu dijagnostiku Klinike za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“.

Metode: Iz laboratorijske baze podataka Odjela za imunološku i molekularnu dijagnostiku Klinike za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ retrospektivno su prikupljeni podatci o pacijentima i rezultatima molekularnih testiranja koji su analizirani primjenom statističkog paketa Statistica 13.3 (dostupno na <https://statistica.software.informer.com/>). Prikupljeni su podatci o spolu, dobi ispitanika, vrsti biološkog uzorka i rezultatima testiranja na DNA bakterija *C. trachomatis* i *N. gonorrhoeae*. Detekcija DNA bakterija *C. trachomatis* i *N. gonorrhoeae* u Klinici za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ izvodi se na Abbott m2000 sustavu korištenjem Abbott RealTime CT/NG testa na uzorcima urina, brisa orofarinksa i brisa rektuma.

Rezultati: Kod 372 pacijenta koji su primali kliničku skrb u Ambulanti za spolno-prenosive bolesti kod muškaraca Zavoda za infekcije imunokompromitiranih bolesnika analizirane su tri vrste bioloških uzoraka (urin, bris orofarinksa i bris rektuma) na prisutnost DNA bakterija *Chlamydia trachomatis* i *Neisseria gonorrhoeae*. Od ukupnog broja testiranih pacijenata, njih 250 (67,2%) je bilo negativno na obje bakterije, 27 (7,2%) pozitivno na obje bakterije, 36 (9,8%) pozitivno na *C. trachomatis* dok je 55 (14,7%) pacijenata bilo pozitivno samo na *N. gonorrhoeae*. Kod 4 (1,07%) pacijenta je detektirana inhibicija PCR reakcije pri čemu su sve bili uzorci brisa rektuma. Većina testiranih pacijenata je bila u dobnoj skupini između 20 i 32 godine starosti.

Zaključci: Rezultati ove retrospektivne studije upućuju na važnost molekularnog testiranja kod spolno-prenosivih infekcija, naročito kod probira i asimptomatskih pacijenata. Danas

molekularne metode za detekciju spolno-prenosivih infekcija postaju standard zbog svoje visoke osjetljivosti i brze detekcije bakterija. Za potrebe probira sve više se koriste uzorci brisa rektuma i orofarinksa obzirom da većina takvih infekcija prođe asimptomatski, dok će u budućnosti pacijenti moći samostalno vršiti uzorkovanja što će smanjiti kliničko opterećenje. U budućim istraživanjima trebalo bi uzeti u obzir podatke iz anamneze pacijenata pri čemu bi se moglo saznati više o samim simptomima infekcija, učestalosti asimptomatskih pozitivnih infekcija te povezanosti ovog tipa spolnih infekcija sa drugim spolno-prenosivim bolestima.

Ključne riječi: spolno-prenosive infekcije, *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, Abbott RealTime CT/NG

9. ABSTRACT

Frequency of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* bacterial infections from different biological samples of men

Aim: To compare the frequency of infections with the bacteria *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in different biological samples in men during the period from January 1, 2022 to December 31, 2022 in the Department of Immunological and Molecular Diagnostics of the Clinic for Infectious Diseases "Dr. Fran Mihaljević".

Methods: From the laboratory data base of the Department of Immunology and Molecular Diagnostics of the Clinic for Infectious Diseases "Dr. Fran Mihaljević" patient data and results were retrospectively collected and analyzed using the statistical package Statistica 13.3 (available at <https://statistica.software.informer.com/>). Data on the gender and age of the patients, type of biological sample and results of DNA testing of bacteria *C. trachomatis* and *N. gonorrhoeae* were collected. DNA detection of bacteria *C. trachomatis* and *N. gonorrhoeae* at the Clinic for Infectious Diseases "Dr. Fran Mihaljević" is performed on the Abbott m2000 system using the Abbott RealTime CT/NG test on urine samples, oropharyngeal swabs and rectal swabs.

Results: Three types of biological samples (urine, oropharyngeal swab and rectal swab) were analyzed for the presence of DNA bacteria *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in 372 patients who received clinical care in the Outpatient Clinic for Sexually Transmitted Diseases in Men of the Institute for Infections of Immunocompromised Patients. 250 (67.2%) patients were negative for both bacteria, 27 (7.2%) were positive for both bacteria, 36 (9.8%) patients were positive only for *C. trachomatis* and 55 (14.7%) of patients were positive only for *N. gonorrhoeae*. PCR reaction inhibition was detected in only 4 (1.07%) patients, all of which were rectal swab samples. Most of the tested patients were between 20 and 32 years old.

Conclusions: The results of this retrospective study indicate the importance of molecular testing in sexually transmitted infections, especially in screening and asymptomatic patients. Today, molecular methods for the detection of sexually transmitted infections are becoming

the standard due to their high sensitivity and rapid detection of bacteria. Rectal and oropharyngeal swab samples are increasingly being used for screening because most of such infections are asymptomatic, and in the future patients will be able to collect samples themselves, which will reduce the clinical burden. The short coming of this research is insufficient information about the patients' anamnesis. In future research, data from the patients' anamnesis should be taken into account, so it would be possible to learn more about the symptoms of infections themselves, the frequency of asymptomatic positive infections and the connection of this type of sexual infections with other sexually transmitted diseases.

Keywords: STD, *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, Abbott RealTime CT/NG

10. ŽIVOTOPIS

OPĆI PODATCI

Ime i prezime: Valentina Đurek

Datum i mjesto rođenja: 09.07.1991., Zagreb

Mobitel: 0915650021

E-mail: vale.durek@gmail.com

OBRAZOVANJE

1998. - 2006. Osnovna škola Retkovec, Zagreb

2006. – 2010. Gimnazija Tituša Brezovačkog, Zagreb

2010. – 2013. Preddiplomski stručni studij medicinsko-laboratorijske dijagnostike na Zdravstvenom veleučilištu u Zagrebu

2014. – 2015. Odrađen pripravnički staž u Klinici za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“, Zagreb

2015. - Položen stručni ispit za prvostupnika medicinsko-laboratorijske dijagnostike pri Ministarstvu zdravstva Republike Hrvatske u Zagrebu

2021. – Diplomski sveučilišni studij forenzike, Forenzična kemija i molekularna biologija, Sveučilišni odjel za forenzične znanosti, Sveučilište u Splitu

OSTALO

2016. – zaposlena u Odjelu za laboratorijsku hematologiju i koagulaciju, Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku, Klinički bolnički centar Zagreb

2023. – Glavni inženjer Odjela za laboratorijsku hematologiju i koagulaciju, Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku, Klinički bolnički centar Zagreb

2023. – delegat skupštine Hrvatske komore zdravstvenih radnika, Strukovni razred za medicinsko-laboratorijsku djelatnost

Aktivno sudjelovanje na više domaćih znanstvenih skupova s međunarodnim sudjelovanjem.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

Sveučilišni odjel za forenzične znanosti

Izjava o akademskoj čestitosti

Ja, Valentina Đurek, izjavljujem da je moj diplomski rad pod naslovom

„Usporedba učestalosti infekcije bakterijama *Chlamydia trachomatis* i *Neisseria gonorrhoeae* iz različitih bioloških uzoraka muškaraca“

rezultat mojega vlastitog rada, da se temelji na mojim istraživanjima te da se oslanja na izvore i radove navedene u bilješkama i popisu literature. Nijedan dio ovoga rada nije napisan na nedopušten način, odnosno nije prepisan bez citiranja i ne krši ničija autorska prava.

Izjavljujem da nijedan dio ovoga rada nije iskorišten u nijednom drugom radu pri bilo kojoj drugoj visokoškolskoj, znanstvenoj, obrazovnoj ili inoj ustanovi.

Sadržaj mojega rada u potpunosti odgovara sadržaju obranjenoga i nakon obrane uređenoga rada.

Split, 20.09.2024.

Potpis studenta/studentice:

