Usporedba zastupljenosti uzročnika uretritisa detektiranih u mokraći pacijenata šireg područja grada Zagreba

Jurčević, Jakov

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:657391

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**



Repository / Repozitorij:

Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository







SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Jakov Jurčević

Usporedba zastupljenosti uzročnika uretritisa detektiranih u mokraći pacijenata šireg područja grada Zagreba

DIPLOMSKI RAD



Zagreb, 2018.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Zavodu za medicinsku mikrobiologiju i parazitologiju Medicinskog fakulteta i Službi za kliničku mikrobiologiju Nastavnog zavoda za javno zdravstvo "Dr. Andrija Štampar" u Zagrebu, pod vodstvom prof. dr. sc. Jasmine Vraneš i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2017./2018.

Popis i objašnjenje korištenih kratica:

eng. engleski

lat. latinski

BHSB – beta hemolitički streptokok grupe B ili *Streptococcus agalactiae*

DNA – eng. *deoxyribonucleic acid*, deoksiribonukleinska kiselina

ECDC – Europski centar za kontrolu bolesti

NGU – negonokokni uretritis

MSM – muškarci koji imaju spolne odnose s muškarcima

NAAT – eng. *nucleic acid amplification test,* test amplifikacije nukleinske kiseline

SAD - Sjedinjenje Američke Države

SPI – spolno prenosive infekcije

RNA – eng. *ribonucleic acid*, ribonukleinska kiselina

PCR – eng. *polymerase chain reaction*, reakcija lančanom reakcijom polimerazom

PMN - polimorfonukleari

PMU – prvi mlaz urina

POC testovi - eng. *point of care*, testovi koji se izvode uz pacijenta, na mjestu pružanja zdravstvene skrbi

HIV – eng. *human immunodeficiency virus*, virus ljudske imunodeficijencije

SADRŽAJ

1.SAŽETAK

2.SUMMARY

3. UVOD *1*

3.1. ETIOLOGIJA **2**

3.2. EPIDEMIOLOGIJA **6**

3.3. METODE I DIJAGNOSTIKA **8**

3.4. LIJEČENJE I PREVENCIJA **13**

4. HIPOTEZA *16*

5. CILJEVI RADA *17*

6. MATERIJALI I METODE *18*

7. REZULTATI *20*

8. RASPRAVA *27*

9. ZAKLJUČCI *31*

10. ZAHVALE *32*

11. LITERATURA *33*

12. ŽIVOTOPIS *46*

1. SAŽETAK

Cilj istraživanja bila je detekcija spolno-prenosivih (SP) patogena u sedimentu prvog mlaza urina uzetog umjesto obriska uretre u 822 muškaraca. Uzorci su obojani i kultivirani, te upotrijebljeni u multipleks PCR testu. Uretritis je utvrđen u svega 72/822 (8,76%) pacijenata detekcijom signifikantnog broja polimorfonuklearnih leukocita u uzorcima, a etiološka dijagnoza postavljena u njih 68 od 72. Najčešći uzročnik uretritisa bila je *Chlamydia trachomatis* (47,22%), a zatim *Mycoplasma genitalium* (12,50%) i *Neisseria gonorrhoeae* (9,72%). U pacijenata s negonokoknim uretritisom dominantni uzročnik bila je *C. trachomatis,* dok je *M. genitalium* utvrđena kao drugi uzročnik negonokoknog uretritisa. Mikrobiološka analiza je najčešće tražena zbog probira ili kontrole (340/41,36%) te u pacijenata s kroničnim prostatitisom (105/12,77%). SP patogeni detektirani su značajno češće u pacijenata s uretritisom nego u pacijenata iz ostalih dijagnostičkih skupina ($p<0,01$), ali nije bilo statistički značajne razlike u detekciji *U. urealyticum* između dijagnostičkih skupina ($p>0,05$).

Ključne riječi: uretritis, molekularna dijagnostika, multipleks PCR

2. SUMMARY

Title: Comparison of the representation of urethritis-causing pathogens in the urine of patients from the wider metropolitan area of Zagreb

The aim of study was detection of sexually transmitted (ST) pathogens in sediment of first-void urine of 822 men, collected instead of urethral swab. Samples were stained, cultivated and used in multiplex PCR test. Urethritis was confirmed in only 72/822 (8,76%) patients by detecting a significant number of polymorphonuclear leukocytes in the samples, and etiologic diagnosis was established in 68/72 men with urethritis. The most common cause of urethritis was *Chlamydia trachomatis* (47,22%), followed by *Mycoplasma genitalium* (12,50%) and *Neisseria gonorrhoeae* (9,72%). In patients with nongonococcal urethritis dominant cause was *C. trachomatis*, whereas *M. genitalium* was found as second most common NGU pathogen. Microbiological analysis was required the most frequently for screening and control purposes (340/41,36%) and in patients with chronic prostatitis (105/12,77%). ST pathogens were detected more frequently in patients with urethritis than in patients from other diagnostic groups ($p<0.01$), while *U. urealyticum* was detected without statistically significant difference among diagnostic groups ($p>0.05$).

Keywords: urethritis, molecular diagnostics, multiplex PC

3. UVOD

Uretritis ili upala uretre može nastati djelovanjem više čimbenika, no većinom je riječ o infekciji stečenoj spolnim kontaktom. Klinička slika varira od asimptomatske do one u kojoj su dominantne tegobe disurija, iscjedak, te neugoda i bol u području uretre. Dijagnoza uretritisa se tradicionalno potvrđuje nalazom polimorfonukleara (PMN) u obriscima anterioronog dijela uretre. Suvremenija dijagnostika podrazumijevaja analizu neagresivno prikupljenog uzorka prvog mlaza urina. Uretritis se etiološki kategorizira kao gonokokni, ukoliko je izolirana *Neisseria gonorrhoeae,* ili negonokokni (NGU), ukoliko bakterija *N. gonorrhoeae* nije izolirana u uzorku. Mnogo je nepoznanica vezanih uz uspješnost dijagnostike negonokoknog uretritisa, te se kod korištenja tradicionalnih metoda javljaju nedosljednosti vezane uz analizu obrisaka uretre i brojanje polimorfonukleara pogotovo u uzoraka pacijenata u kojih upala nije izražena[1,2]. Također, u mnogih muškaraca etiološka dijagnoza ostaje nerazjašnjena upotrebom klasičnih mikrobioloških metoda kultivacije, te se ne izolira i potvrdi uzročnik[3-13].

Identifikacija etiološkog uzročnika uretritisa utječe na izbor antimikrobne terapije, prevenciju komplikacija bolesti, mogućnost interhumanog prijenosa infekcije te suradljivost pacijenata[14]. Mikrobiološka dijagnostika temeljena na metodi kultivacije podrazumijeva uzimanje višestrukih obrisaka uretre, neposrednu pohranu uzoraka u adekvatne transportne podloge te inokulaciju na specifična hraništa. Kultivacija ovisno o traženom mikroorganizmu traje između 72 sata i nekoliko tjedana, a osjetljivost metode varira od 50-85%[15-17]. Uvođenjem standardiziranih i klinički validiranih molekularnih testova u dijagnostiku uretritisa omogućena je detekcija spolno-prenosivih uzročnika iz neagresivno prikupljenih uzoraka i uzoraka prikupljenih samo-uzorkovanjem, stoga je

dosadašnja analiza obrisaka uretre zamijenjena analizom sedimenta prvog mlaza urina (PMU)[16-18].

Primjena konvencionalne lančane reakcije polimerazom (PCR) ili PCR-a u realnom vremenu (eng. *real time* PCR) omogućava identifikaciju jednog, dva ili više uzročnika u jednom aktu i kratkom vremenu, a komercijalno dostupni testovi su visoke analitičke osjetljivosti i specifičnosti[19]. Danas se testovi utemeljeni na umnožavanju nukleinskih kiselina (NAAT, eng. *nucleic acid amlification tests*) smatraju novim zlatnim standardom u dijagnostici uretritisa.

3.1. ETIOLOGIJA

Uzrok uretritisa najčešće je infektivne prirode, iako uretritis može biti može biti izazvan neinfektivnim etiološkim čimbenicima, npr. mehaničkim ili kemijskim. U simptomatskih pacijenata javlja se mukopurulentna sekrecija, dizurične tegobe te nelagoda i bol duž mokraćne cijevi. Najčešći uzroci negonokoknog uretritisa po prevalenciji u Europskoj populaciji su *Clamydia trachomatis* (11-50%), *Mycoplasma. genitalium* (6-50%), *Ureaplasma urealyticum* (5-26%), *Trichomonas vaginalis* (1-20%), adenovirusi (2-4%) i *Herpes simplex virus* (2-3%)[20].

Klamidija i *M. genitalium* češće se nalaze u mlađih pacijenata, onih koji kao tegobe navode iscjedak i disuriju te u heteroseksualnih muškaraca. Rijetko se oba uzročnika detektiraju u istog pacijenta [3,21]. *C. trachomatis* i *M. genitalium* su rjeđi u populaciji muškaraca koji imaju spolne odnose s muškarcima (MSM) nego u heteroseksualnih muškaraca[22]. *M. genitalium* je povezana također s nastankom balanopostitisa. *C.*

trachomatis se povezuje sa pojavom *balanitis circinate*[23,24]. Ove dvije bakterije rijetko pronalaze u istog pojedinca s NGU, a učestalost takvih koinfekcija je do 10%[3,25].

U 30-80% slučajeva NGU uzrok nisu *C. trachomatis* i *M. genitalium,* dok infekcija s parazitom *T. vaginalis* ovisi o prevaleciji uzročnika u nekom geografskom području[26-32].

Postoje uvjerljivi dokazi da *U. urealyticum* može uzrokovati uretris u nekih muškaraca, u čemu značajnu ulogu ima imunološki odgovor pojedinca[26]. Detekcijom same ureaplazme čak i korištenjem suvremenih metoda (NAAT) ne možemo razlikovati asimptomatsku infekciju od mogućeg uzročnika uretritisa, iako broj mikroorganizama veći od 1000/ml prvog mlaza urina ima pozitivnu prediktivnu ulogu u razvoju NGU[31,32].

Mogući razlog za to je što ranije studije nisu razlikovale *U. urealyticum* od srodne vrste *U. parvum* što je još uvijek slučaj ako se koristi isključivo kultivacija kao metoda dijagnostike. *U. parvum* češće se detektira u kontrolama nego u slučajevima uretrisa što otežava prosuđivanje važnosti detekcije ureaplazmi u uzorku i njihovog značenja kao stvarnog uzročnika negonokoknog uretritisa.[26] Postoje značajni dokazi da uzročnici bakterijskih vaginoza mogu također uzrokovati NGU.[28-30]

Adenovirusi i *herpes simplex* virusi tipa 1 i 2 uzrokuju 2-4% simptomatskih uretrisa i mogu također biti povezani s konjuktivitisom. [8,33,34]

Neisseria meningitidis, *Haemophilus sp*., *Candida sp*, i anomalije uretera poput uretralne strikture rijetki su uzroci manjeg broja slučajeva simptomatskih uretritisa, iako zanimljivi zbog osobitosti etiologije, kliničke slike i izbora terapije[35,36].

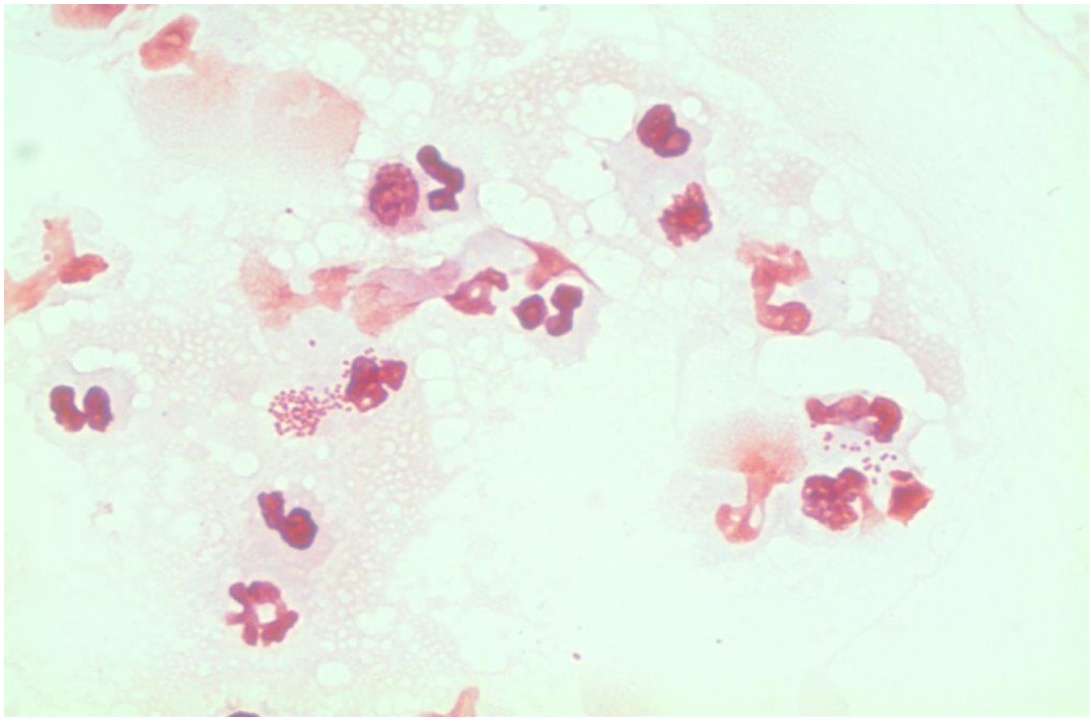
Važno je napomenuti da ukoliko se pronađu diplokoki u razmazu obriska uretera, a NAAT je negativan na *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis* mora biti uzeta u obzir kao mogući etiološki uzročnik. *N. meningitidis* se ne može prepoznati pomoću konvencionalnih testova

amplifikacije nukleinskih kiselina na spolno prenosive infekcije (SPI) jer se njima specifično detektira *N. gonorrhoeae,* tako da je upotrebom isključivo molekularnih metoda detekcije moguće previdjeti meningogokni urethritis kao dijagnozu. Nepoznat je uzrok idiopatskih uretritisa i uretritisa u kojima nije izoliran uzročnik, i iako se pretpostavlja da su takvi slučajevi neinfektivne prirode, a trenutno nemamo alate kojima bismo mogli diferencirati neinfektivne od vjerojatno infektivnih slučajeva[37]. Asimptomatski uretritisi bez vidljivog iscjetka vjerojatno imaju drugačiju etiologiju od simptomatskih uretritisa, što također potvrđuju rjeđi nalazi *C. trachomatis* i *M. genitalium*[4,5,7,38].

Postoje opisi slučajeva infektivnih uretritisa uzrokovanih bakterijom *Streptococcus agalactiae* (BHSB), čija je dijagnoza postavljena nakon mikrobiološke analize obriska uretre i izolacije uzročnika iz uretralnog iscjetka. Primjerice, u istraživanju Chowdhurya i Pareeka dijagnoza BHSB uretritisa je potvrđena pozitivnim kliničkim odgovorom na terapiju penicilinom. Kultivacija na *C. trachomatis* je u ovom slučaju bila negativna, a nisu niti bila pronađena antitijela na klamidije. Obzirom da su mikoplazme zbog neposjedovanja stanične stijenke bakterije intrinzično rezistentne na penicilinske antibiotike, zaključeno je da su one nisu mogući uzrok infekcije[39].

Gonokokni uretritis uzrokovan je bakterijom *Naisseria gonorrhoeae*. *N. gonorrhoeae* infekcija druga je najučestalija spolno prenosiva infekcija. Bakterija *N. gonorrhoeae*, poznata i kao gonokok, je gram-negativni diplokok koji uzrokuje cijeli niz zaraznih kliničkih entiteta, uključujući uretritis. Većina uretralnih infekcija navedenim uzročnikom prezentira se u muškaraca simptomima koje ih navode da potraže liječničku pomoć prije nego se razviju ozbiljnije komplikacije, ali nedovoljno brzo da bi se spriječio prijenos na drugu osobu. Kod

žena se infekcija obično ne prezentira obilnim iscjetkom, pa ju je moguće previdjeti, što za posljedicu



Slika 1. Gram-negativni intracelularni diplokoki u sedimentu PMU s >9 PMN/velikom vidnom polju - jaka upalna reakcija (ljubaznošću dr. Jasne Knežević).

ima učestalije komplikacije. U žena infekcija s *N. gonorrhoeae* može uzrokovati nastanak ožiljaka i proliferaciju vezivnog tkiva u jajovodima što može dovesti do neplodnosti ili ektopične trudnoće. U razvijenom svijetu infekcija s *N. gonorrhoeae* važan je javnozdravstveni problem, a u prilog tome govori procijenjenih 700.000 novih slučajeva godišnje u SAD-u i 350.000 slučajeva u Europi[40,41].

3.2. EPIDEMIOLOGIJA

Uretritisi, kao i ostale spolno-prenosive bolesti golem su javnozdravstveni problem. Prevalencija spolno-prenosivih bolesti raste čak i u razvijenom svijetu, posebice se to odnosi na nove slučajeve HIV/AIDS-a. Prema zaključcima summit-a Svjetske zdravstvene organizacije 2012. godine, zabilježeno je 340 milijuna novih slučajeva sifilisa, gonoreje, klamidijaze i trihomonijaze u populaciji od 15 do 49 godina[42]. Od toga je 500.000 novih slučajeva HPV infekcije, od čega se 80% odnosi na zemlje u razvoju[43].

Veliki udio SPB su asimptomatske ili supkliničke što znači da su često nedijagnosticirane. Ohrabrujuće je da se mnoge SPB mogu prevenirati upotrebom probira, posebno u skupinama visokog rizika. Bakterija *C. trahomatis* najčešće je prijavljen uzročnik STD u Europi. Prema dostupnim podacima europskog Centra za kontrolu bolesti (ECDC) broj prijavljenih klamidijskih bolesti je sa 191.000 slučajeva 2004. godine porastao na gotovo 350.000 slučajeva 2013. godine, najugroženija skupina su osobe između 15 i 24 godina, a u gotovo 90% radi se o heteroseksualnom prijenosu infekcije[44]. Porast u broju prijavljenih slučajeva pripisuje se molekularnim metodama dijagnostike, uvođenjem probira u nekim zemljama kao i poboljšanjima u sustavima praćenja, no i dalje ostaje pretpostavka da je stvarna incidencija veća, što se pripisuje asimptomatskom tijeku bolesti u dijela inficiranih. Kao uzročnik NGU bakterija *C. trachomatis* detektira se u 11-50% slučajeva[45].

Bakterija *N. gonorrhoeae* drugi je po učestalosti uzročnik STD u Europi, s gotovo 53.000 prijavljenih novih slučajeva infekcije u 2013. godini. Opažene su značajne zemljopisne razlike u distribuciji gonoreje, s višom incidencijom zabilježenom u skandinavskim i baltičkim zemljama u odnosu na zemlje centralne i istočne Europe. Iste

godine se Hrvatska, uz Cipar i Luksemburg svrstala u zemlje s najmanjim brojem prijavljenih gonokoknih infekcija (≤1 slučaj/100.000 stanovnika)[44].

Gonokokna infekcija tri puta se češće detektira u muškaraca, u kojih je asimptomatski tijek bolesti iznimno rijedak (<10%), a osobito su ugrožene osobe od 20-34 godina.[46,44] Ovaj Gram-negativan diplokok se kao uzročnik uretritisa detektira u 5-20% pacijenata.[47] Bakterija *N. gonorrhoeae* iznimno je na vanjske uvjete osjetljiv mikroorganizam, pa na osjetljivost metode kultivacije utječe prikupljanje, transport i pohrana uzorka[48]. Molekularne metode detekcije ovog patogena su visoke osjetljivosti (>96%) u simptomatskih i asimptomatskih pacijenata, u muškaraca na osjetljivost testa ne utječe vrsta uzorka, a detekcija ne zahtjeva prisutnost vijabilnog uzročnika[46]. Prema preporuci Svjetske zdravstvene organizacije paralelno s molekularnim testovima treba i kultivirati uzročnika za potrebe izrade testa osjetljivosti zbog globalno proširenog problema rezistencije sojeva na brojne skupine antimikrobnih lijekova[49].

U muškaraca se *T. vaginalis* infekcija prezentira simptomima uretritisa, epididimitisa ili prostatitisa, no u 70-85% pacijenata simptomi infekcije su odsutni, te neprepoznata asimptomatska infekcija može trajati i godinama.[50] Protozoa *T. vaginalis* se kao uzročnik NGU nalazi u do 20% pacijenata.[45] U Americi se kao uzročnik uretritisa detektira u 2-13% pacijenata s najvećom prevalencijom u afroameričkoj populaciji, no u Europi ovaj parazit rijedak je uzročnik uretritisa.[50,51] Dijagnostičke mogućnosti detekcije *T. vaginalis* infekcije su nativni mikroskopski preparat ili kultivacija u specijalnim hranjivim podlogama no osjetljivost ovih metoda je svega 50-65%.[50,52] Klinički validirani komercijalno dostupni PCR testovi nova su dijagnostička mogućnost u detekciji ovog parazita, uz mogućnost korištenja neinvazivnih uzoraka poput PMU, a visoke su osjetljivosti i specifičnosti (95-100%), te su prema važećim europskim smjernicama obrade pacijenata s NGU preporučeni

u populaciji u kojoj je zabilježeno >2% simptomatskih infekcija u žena.[45,50] Obzirom da je u Hrvatskoj upotrebom nevalidiranog *in house* testa utvrđena *T. vaginalis* infekcija u 8,2% pacijenata sa simptomima uretritisa, sve pacijente s uretritisom treba i dalje testirati i na trihomonadnu infekciju.[53]

Detekcija genitalnih mikoplazmi u uzorcima iz urogenitalnog sustava vrlo je česta, no budući da se *M. hominis* i *U. urealyticum/parvum* mogu naći kao dio normalne mikroflore sluznica urogenitalnog sustava i žena i muškaraca, nalaz ovih bakterija treba interpretirati s oprezom.

3.3. METODE I DIJAGNOSTIKA

Dijagnoza uretritisa potvrđuje se objektivnim dokazom upale mokraćne cijevi što uključuje prisutnost iscjetka pri kliničkom pregledu ili mikroskopsku detekciju značajnog broja PMN leukocita u preparatu obriska uretre (>4 PMN/1000x povećanje) ili preparatu sedimenta PMU (>9 PMN/1000x povećanje), obojenim metilenskim modrilom ili po Gramu.[15,45] Osim procjene broja PMN mikroskopski preprat omogućuje i prikaz mikroorganizama. Prisutnost Gram-negativnih diplokoka u preparatu obriska uretre dovoljan je dokaz gonokokne infekcije uretre, jer su osjetljivost i specifičnost ove metode u simptomatskih muškaraca oko 98%.[47] Ne-gonokokni uretritis (NGU) utvrđuje se na temelju mikroskopije i detekcije PMN leukocita bez prisustva mikroorganizama.

Muškarci koji se prezentiraju uretralnim simptomima trebaju se klinički pregledati zbog ingvinalne limfadenopatije, ulceracija ili uretralnog iscjetka. Uretru bi trebalo nježno ispalpirati od korijena penisa do uretralnog otvora. Bilo kakav iscjedak trebao bi biti laboratorijski testiran. Trenutno, uretritis se dijagnosticira po barem jednom od sljedećih

kriterija; prisutnost uretralnog iscjetka, pozitivan test na leukocitnu esterazu u uzorku prvog mlaza urina, ili 10 ili više leukocita u vidnom polju[54]. Ukoliko iscjedak nije prisutan, uzorak prvog mlaza urina trebao bi biti testiran da bi se vidjeli postoji li piurija, te bi trebala slijediti molekularna dijagnostika. Također se preporuča palpacija skrotuma zbog mogućnosti epididimitisa ili orhitisa. Digitorektalni pregled se preporuča za pregled prostate, pogotovo kod starijih pacijenata ili kod pacijenata koji se žale na rektalnu bol. Ukoliko se pacijent žali na specifične simptome ili postoji lokalna upala, može se klinički pregledati orofarinks ili anus[55,56].

Ako sumnjamo na urinarnu infekciju zbog specifične anamneze kao što je hematurija, nokturija, disurija ili urgencija, treba se analizirati uzorak srednjeg mlaza urina i liječenje bi se trebalo usmjeriti u smjeru urinarne infekcije. Na nju također možemo posumnjati tijekom kliničkog pregleda ako ne postoji nikakav iscjedak iz uretre ili po laboratorijskim nalazima po prisutnosti nitrita u urinu[57].

Uretritis ili faktori rizika za spolnu infekciju mogu upućivati na koinfekciju i drugu spolno prenosivu bolest. Zbog toga se rade krvni testovi na sifilis, HIV i hepatitis. Ponekad je moguće da svi konvencionalni testovi budu negativni, ali pacijenti svejedno dobro reagiraju na antibiotsku terapiju. To upućuje na mogućnosti lažno negativnih nalaza, ili na nepoznatog uzročnika[58].

Dijagnostički testovi za uretritise i ostale spolno prenosive bolesti su od višestruke koristi. Osim pomoći u dijagnostici tipičnih slučajeva, mogu nam pomoći dijagnosticirati atipične slučajeve, asimptomatske i višestruke infekcije. Metode dijagnostike moraju ispuniti kriterije specifičnosti, pristupačnosti, točnosti, učinkovitosti i lakoće provedbe.

Rezultati moraju biti brzi, cjenovno učinkoviti i pouzdani. I ono što je najvažnije, rezultati trebaju biti što manje ovisni o tehnikama prikupljanja uzorka[59].

Laboratorijska dijagnostika uretritisa uključuje:

- Direktnu mikroskopiju
- Kulturu/izolaciju mikroorganizama
- Detekciju antigena
- Serologiju za detekciju antitijela
- Testove koji pronalaze metabolite mikroorganizama
- Molekularne metode dijagnostike

Uobičajeni dijagnostički postupci imaju nekoliko nedostataka; poput dugog čekanja rezultata te manje osjetljivosti i specifičnosti. Tehnološki napredne i modernije metode dijagnostičke mikrobiologije nude značajno veću brzinu, specifičnost i osjetljivost. One su posebno korisne za detekciju mikroorganizama koji se teško kultiviraju ili se ne mogu uopće kultivirati. Ove tehnologije i novi pristup u dijagnostici omogućavaju nam učinkovitiji pristup kontroli spolno-prenosivih bolesti, što se direktno odražava na zdravstvenu skrb pacijenata. Povećana automatizacija i standardizacija takvih metoda ima za posljedicu smanjenje ljudske pogreške. Osim direktnih dijagnostičkih uloga, ovakve metode uključuju nedijagnostičke namjene, poput probira za skupine visokog rizika, nadzora i kontrole liječenja, istraživanja uzroka različitih epidemija, detekcija uzoraka rezistencije za terapiju, te imaju važnu ulogu pri istraživanjima i kontroli kvalitete rada laboratorija[60].

Testovi nukleinskih kiselina su tehnike koje otkrivaju specifične sekvence DNK ili RNK mikroorganizma koji je povezan s uretritisom. U grubo se ti testovi mogu podijeliti u tri skupine testova koji se koriste u molekularnoj dijagnostici[61]:

- Tehnike hibridizacije
- Tehnike amplifikacije
- Testovi koji se koriste u epidemiološkim istraživanjima.

Molekularne tehnike koje se upotrebljavaju u dijagnostici uretritisa su detekcija mikroorganizama koji se teško uzgajaju ili se uopće ne mogu kultivirati, identifikacija mikroorganizama nakon kultivacije (klasična bakteriologija i virologija), te brza identifikacija iz kliničkih uzoraka testovima koji su danas visoke osjetljivosti i specifičnosti a mogu se jednostavno izvesti uz pacijenta (molekularni POC testovi, eng. *point of care*). Molekularne metode također koristimo kako bismo bolje razumjeli epidemiologiju ili patofiziologiju uretritisa te za poboljšanje osjetljivosti i specifičnosti seroloških eseja upotrebom rekombinantnih antigena i proteina[62].

Tehnike rekombinacije nukleinskih kiselina oslanjaju se na osjetljivost i specifičnost hibridizacijskih reakcija vezanja između proba i ciljnih nukleinskih kiselina. DNK ili RNK mikroorganizama u kliničkim uzorcima su ciljne nukleinske kiseline, dok su probe komplementarne nukleinske kiseline koje su vezane s nekim kemijskim, fluorescentnim ili radionuklidskim bojama. Tehnike amplifikacije koriste se kako bi se umnožili i dobili veći broj ciljnih lanaca nukleinskih kiselina. Također, metode molekularne dijagnostike koristie se kako bi se usporedile nukleinske kiseline u uzorku i nukleinske kiseline u epidemiološkim bazama.

Osnovni koraci koje uključuje molekularna dijagnostika su prikupljanje uzorka, ekstrakcija i purifikacija nukleinskih kiselina u uzorku, amplifikacija ili hibridizacija, i detekcija završnog produkta primjerenim metodama.

PCR ili lančana reakcija polimerazom tehnika je kojom se umnožavaju nukleinske kiseline iz uzorka. Klasična metoda RT-PCR (eng. *reverse transcriptase - polymerase chain reaction*) je semikvantitativna, stoga je potreba za preciznijom kvantifikacijom mRNK dovela do razvoja nove tehnike nazvane PCR u realnom vremenu (eng. *real time PCR*). Real time PCR je pouzdana i precizna metoda za kvantifikaciju specifičnih molekula DNK.

Za reakciju su potrebne vrlo male količine nukleinske kiseline što omogućava upotrebu ove metode u slučajevima kada na raspolaganju imamo vrlo malo uzorka. Produkti lančane reakcije polimerazom obilježeni fluorescencijskom bojom kontinuirano se analiziraju. Fluorescencijska boja (najčešće se koristi SYBR Green I) vezana je uz prigušivač (eng. *Q-quencher*), a emitira fluorescenciju tek nakon razdvajanja od njega, tj. vezanjem za dvolančanu (novonastalu) DNK.

Dakle, mjerenjem fluorescencije mjerimo nastalu DNK jer količina fluorescencije razmjerna je količini PCR proizvoda. Nakon završene reakcije PCR, aparat se može programirati da načini krivulju taljenja, u kojoj se mjeri fluorescencija u odnosu na temperaturu. Tako real-time PCR određuje i točku taljenja (eng. *melting point*) novonastalog proizvoda, kada se dva lanca DNA odvoje i fluorescencija naglo prestaje. Ovim provjeravamo specifičnost produkta, jer svi produkti za specifičan par početnica (eng. *primera*) moraju imati istu krivulju taljenja (eng. *melting curve*).

Danas se u praksi sve više koristi Taqman kemija u reakciji real-time PCR-a. Metoda se zasniva na korištenju neobilježenih specifičnih početnih oligonukleotida te specifične obilježene probe. Ova metoda koristi se kako u analizi ekspresije gena tako i u SNP analizi

u kojoj se koriste dvije specifične i različito obilježene probe. Real-time PCR koristi se za apsolutnu ili relativnu kvantifikaciju DNA/RNA[63].

Apsolutnom kvantifikacijom možemo precizno odrediti broj kopija u nekom uzorku uspoređujući fluorescenciju s standardnom krivuljom. Relativnom pak kvantifikacijom možemo analizirati relativne promjene u količini transkripta. Prednosti real-time PCR metode su izrazita brzina detekcija, veća osjetljivost i specifičnost, prikaz kvantitativnih podataka i automatska izolacija nukleinskih kiselina[63].

3.4. LIJEČENJE I PREVENCIJA

Pacijentima kojima smo potvrdili dijagnozu uretritisa preporuča se dvojna antibiotska terapija za uzročnike *N. gonorrhoeae* i *C. trahomatis.*[54]. Kombinacija jedne doze 1g azitromicina oralno ili 100 mg doksiciklina dva puta dnevno tijekom sedam dana u kombinaciji sa 400 mg cefeksima ili 125 mg intramuskularno apliciranog ceftriaksona je primarni tretman uretritisa. Zbog rezistencije na fluorokinolone oni se više ne propisuju kao empirijska terapija uretritisa[54].

U muškaraca s uretralnim simptomima ali bez objektivnih znakova ili rezultata pretraga, u pravilu liječenje se odlaže do dolaska rezultata. Iznimke su pacijenti koji imaju visok rizik od spolno prenosivih infekcija a za koje se procjeni da postoji mogućnost da se ne vrate na kontrolu i po specifičnu terapiju[64].

Pacijenti koji imaju simptome perzistentnog ili rekurentnog uretritisa predstavljaju izazov u liječenju zbog izostanka simultane terapije partnera, reinfekcija od strane novog partnera ili neliječene infekcije uzrokovane mikroorganizmima *Mycoplasma*, *Ureaplasma*,

Trichomonas, HSV, *Enterobacteriaceae*, ili adenovirusima. Također, uzrok može biti neki rezistentni uzročnik ili uretritis može imati neinfektivni uzrok[64].

Azitromicin je lijek izbora kod uretritisa uzrokovanih mikoplazmom, uraplazmom, ali ne i kod uretritisa izazvanog trihomonasom, HSV-om ili adenovirusima.[65] Azitromicin, zbog svog protuupalnog učinka, može biti učinkovit kod pacijenata čiji su nalazi negativni na navedene uzročnike, što potvrđuje jedna japanska studija koja navodi čak 85% izlječenja kod pacijenata u kojih etiologija infekcije nije mogla biti utvrđena upotrebom uobičajenih metoda mikrobiološke dijagnostike[58].

Značajan je porast incidencije mikoplazmatske rezistencije na azitromicin, za koju se preporuča dulja antibiotska terapije ili neki drugi alternativni izbor terapije, ovisno o slučaju i kliničkoj prezentaciji[66]. U područjima s visokom prevalencijom trihomonijaze, preporučuje se terapija metronidazolom ili tinidazolom koji se primjenjuje aditivno uobičajenoj terapiji.[55]

Na posljetku, ako isključimo sve mogućnosti infekcije, pacijentima se preporučuje koristiti blage sapune bez mirisa i iritansa, lubrikante i ostale neutralne proizvode za njegu kože, dok se izbjegavaju spermicidi i nastoji se spriječiti trauma penisa[67]. Također se preporuča povećan unos vode i prehrana u skladu s onom u drugim upalnim urogenitalnim bolestima. Pacijentima kod kojih je uretritis posljedica neke spolno prenosive infekcije preporuča se apstinencija tijekom tjedan dana od početka terapije. Edukacija pacijenata bi trebala ići u smjeru osvještavanja i smanjivanju rizičnih faktora vezanih uz spolno prenosive bolesti[68].

Nema dokaza da probir muškaraca na klamidiju i gonoreju dovodi do smanjene incidencije tih infekcija u žena, tako da se probir svih muškaraca ne preporuča[69]. Preporučuje se godišnji probir u muškaraca koji imaju spolne odnose s muškarcima. To uključuje uretrali obrisak ili NAAT testove na gonoreju i klamidijsku infekciju iz prvog mlaza urina kod

muškaraca koji su imali insertivni spolni odnos u prošloj godini te testiranje na rektalni oblik gonoreje i klamidijalne infekcije muškaraca koji su imali receptivni spolni odnos tijekom zadnjih godinu dana[70]. Probir također uključuje obrisak ždrijela na gonoreju kod muškaraca koji su imali oralni spolni odnos. Probir na faringealnu klamidijalnu infekciju se ne preporučuje.

Postoje dokazi da je intaktni uretralni endotel izrazito važna barijera kod infekcija HIV-om. Oštećenje tog epitela može pospješiti prijenos patogena koji se šire kontaktom s krvlju, uključujući HIV. Muškarci s uretritisom zaraženi HIV-om imaju viši HIV RNA titar u spermi od HIV-pozitivnih muškaraca koji nemaju uretritis[71]. Također, liječenje uretritisa dovodi do smanjenja ekspresije HIV-1 u spermi[72].

4. HIPOTEZA

Očekuje se da će najčešći uzročnik uretritisa biti *C. trachomatis* i da će detekcija ove bakterije biti posebno česta u mlađih od 25 godina, te da se nalaz uro-genitalnih mikoplazmi (*U. urealyticum/parvum* i *M. hominis*) izuzev vrste *M. genitalium* nće moći povezati s etiologijom uretritisa, budući su ove bakterije često detektiraju na genitalnim sluznicama zdravih žena i muškaraca.

5. CILJEVI RADA

Opći cilj:

Utvrđivanje etiologije uretritisa upotrebom multipleks PCR testa i klasičnih uzgojnih mikrobioloških metoda iz neagresivno prikupljenog uzorka prvog mlaza urina pacijenata u kojih je tijekom rutinskog dijagnostičkog postupka zatražena mikrobiološka dijagnostika u Nastavnom zavodu za javno zdravstvo „Dr. Andrija Štampar“ tijekom jedne godine.

Specijalni ciljevi:

1. Utvrditi zastupljenost bakterija *C. trachomatis* i *M. genitalium* u pacijenata s dokazanim uretritisom u pacijenata s jakim upalnim odgovorom (>9 PMN u uzorku sedimenta PMU), te pacijenata sa slabijim upalnim odgovorom (>4 PMN u uzorku sedimenta PMU),

2. Utvrditi postoji li razlika u učestalosti detekcije *U. urealyticum/parvum* i *M. hominis* u pacijenata s dokazanim uretritisom i pacijenata u kojih uretritis nije dokazan a koji su upućeni na mikrobiološku obradu iz drugih razloga (sterilitet, kronični prostatitis, epididimitis, kontrola/probir itd).

6. MATERIJALI I METODE

Za istraživanje su korišteni rezultati rutinske obrade pacijenata upućenih na mikrobiološku obradu u Nastavni zavod za javno zdravstvo „Dr. Andrija Štampar“ u Zagrebu (Referentni centar za dijagnostiku spolno prenosivih infekcija MZRH) u razdoblju od 1. studenog 2016. do 01. studenog 2017. godine.

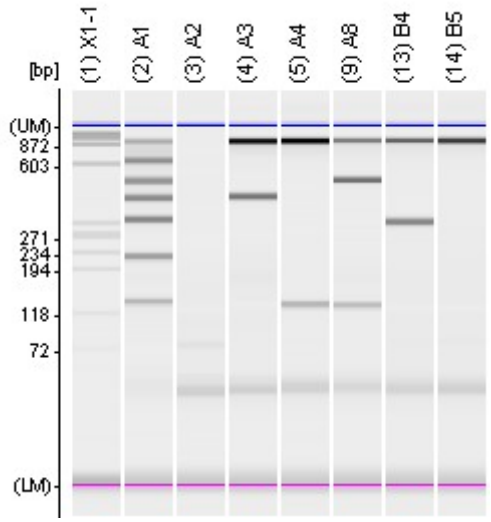
Bolesnici i uzorci: Pacijenti su pri prijemu izmokrili 10-15 ml PMU u prethodno označenu, graduiranu polipropilensku sterilnu posudicu s čepom na navoj, uz uvjet da prethodno nisu mokrili najmanje dva sata. Prigodom uzorkovanja pacijentima su uzeti i osnovni anamnestički podaci: postoje li simptomi i koji, ili je riječ o probiru/kontroli, spadaju li u skupinu s rizičnim spolnim ponašanjem za spolno-prenosive bolesti.

Metode klasične mikrobiološke dijagnostike: Uzorak je odmah dostavljen u laboratorij te podijeljen u dva alikvota. Za metodu kultivacije jedan alikvot centrifugiran je na 3000 okretaja/min. kroz 10 minuta pri temperaturi +22°C, supernatant odbačen, a sediment izdvojen. Uzorak je zasijan kalibriranom bakteriološkom ušicom od 10 µl na čokoladni (Oxoid, UK) i Sabouroud (Oxoid, UK) agar, a 200 µl uzorka pohranjeno je u bujon za uzgoj genitalnih mikoplazmi (Mycoplasma R1, Biomerieux, Francuska). Čokoladni agar inkubiran je 24/48 sata na +35°C u atmosferi s 5% CO_2, Sabouroud agar 24/48 sata na +35°C u aerobnoj atmosferi, a bujon pohranjen na +4°C za eventualne potrebe kasnije kultivacije i izrade testa osjetljivosti. Učinjen je i preparat obojen po Gramu koji je mikroskopiran na svjetlosnom mikroskopu (Leica, Njemačka) na velikom povećanju (1000x, Slika 1).

Metode molekularne mikrobiološke dijagnostike: Drugi alikvot sedimenta PMU je upotrijebljen za izvođenje multiplex konvencionalnog PCR testa Seeplex® STD6 ACE

Detection Test (Seegene, Korea) na šest STD patogena (*Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* i *Trichomonas vaginalis*) sukladno uputama proizvođača. Detekcija umnoženog PCR produkta učinjena je metodom mikročip elekroforeze (MultiNA, Shimazu, Japan), na virtualnom gelu (Slika 2).

Statistička obrada: Podaci su statistički obrađeni χ^2 testom, a statistički značajna smatrana je vrijednost $p<0,05$.



Slika 2. Utvrđivanje etiologije uretritisa upotrebom mikro-čip elektroforeze te primjer mogućnost detekcije višestruke infekcije upotrebom Seegene STD6 multiplex PCR testa – uzorak br. 9.

(1) marker; (2) pozitivna kontrola = 981 bp/interna PCR kontrola, 647 bp/*T. vaginalis*, 502 bp/*M. hominis*, 410 bp/*M. genitalium*, 315 bp/*C. trachomatis*, 214 bp/*N. gonorrhoeae*, 130 bp/*U. urealyticum*; (3) negativna kontrola; (4) *M. genitalium* positivni uzorak; (5) *U. urealyticum* pozitivni uzorak; (9) i *M. hominis* i *U. urealyticum* pozitivni uzorak (13) *C. trachomatis* pozitivni uzorak; (14) negativni uzorak.

7. REZULTATI

U razdoblju od jedne godine ukupno je analizirano 822 uzorka sedimenta PMU prikupljenih u muškaraca u dobi od 18-76 godina (33,6±10,9). Dijagnoza uretritisa potvrđena je u svega 72/822 (8,8%) pacijenata detekcijom signifikantnog broja PMN-a u uzorcima. Etiološka dijagnoza postavljena je u čak 69/72 muškaraca s dokazanim uretritisom.

Tablica 1. Zastupljenost kliničkih entiteta u pacijenata upućenih na mikrobiološku obradu u istraživanom razdoblju.

Klinički entitet	**Broj pacijenata (%)**
SPI probir/kontrolni pregled	340 (41,36%)
Sindrom kroničnog prostatitisa	105 (12,77%)
Uretritis	72 (8,76%)
Infekcije mokraćnog sustava/uretralni sindrom	68 (8,27%)
Drugi poremećaji mokraćno-spolnog sustava	54 (6,57%)
Obrada neplodnosti parova	51 (6,20%)
Kondilomi	49 (5,96%)
Orhitis i epididimitis	43 (5,23%)
Balanopostitis	34 (4,14%)
Sy. Reiter	6 (0,73%)
Ukupno	822 (100,00%)

Mikrobiološka obrada uretre najčešće je tražena zbog probira ili kontrole/nadzora STI i to u 340 (41,3%) pacijenata, te zbog kroničnog prostatitisa u 105 (12,8%) pacijenata (Tablica 1). Drugi razlozi zbog čega je pretraga tražena bili su: neplodnost parova (6,2%), dizuričke smetnje zbog infekcije mokraćnog sustava (8,3%), kondilomi (5,9%), balanopostitis (4,1%), orhitis/epididimitis (5,2%), drugi poremećaji mokraćnog sustava (6,5%) i Reiterov sindrom (0,7%).

Pacijenata mlađih od 25 godina bilo je 157/822 (19%), što sa petnaest pacijenata iz MSM populacije i šest biseksualnih pacijenata čini 21,6% pacijenata obuhvaćenih ovim istraživanjem (178/822) za koje je utvrđeno da se ubrajaju u osobe s visokim rizikom za SPI.

Najčešći uzročnik uretritisa bila je *C. trachomatis* koja je detektirana značajno češće u pacijenata mlađih od 25 godina (Tablica 2, $p<0,01$).

Tablica 2. Detekcija bakterije *C. trachomatis* u ovisnosti o dobi pacijenata uključenih u istraživanje.

Dob pacijenata (godine)	***Chlamydia trachomatis***	
	DA	NE
≥25	31	634
≤24	14	143

Tablica 3 prikazuje udio utvrđenih uzročnika uretritisa u skupini s jakim upalnim odgovorom i najvišu zastupljenost bakterije *C. trachomatis* koja je u ovoj skupini od 44 muškarca s dokazanim uretritisom detektirana 19 puta.

Tablica 3. Učestalost detekcije bakterija u skupini muškaraca s uretritisom i jakim upalnim odgovorom (>9 PMN).

Uzročnik uretritisa	Učestalost detekcije (n)
Chlamydia trachomatis	19
Neisseria gonorrhoeae	6
Mycoplasma genitalium	6
Ureaplasma urealyticum/parvum	5
BHSB	2
Haemophilus influenzae	2
Neisseria meningitidis	2
Escherichia coli	2
Mycoplasma hominis	1
Proteus mirabilis	1
Ukupno	46

U ovoj skupini u dva pacijenta nije utvrđena etiologija, dok je u četiri pacijenta utvrđena koinfekcija (*N. gonorrhoeae* i *C. trachomatis* u dva pacijenta, a *C. trachomatis* i *M. genitalium* te *C. trachomatis* i *U. urealyticum* u po jednog pacijenta.

Tablica 4 prikazuje udio utvrđenih uzročnika uretritisa u skupini sa slabijim upalnim odgovorom i najvišu zastupljenost bakterije *C. trachomatis* koja je u ovoj skupini od 28 muškarca s dokazanim uretritisom detektirana 15 puta.

Tablica 4. Učestalost detekcije bakterija u skupini muškaraca s uretritisom i slabijim upalnim odgovorom (5-9 PMN).

Uzročnik	Učestalost detekcije (n)
Chlamydia trachomatis	15
BHSB	6
Ureaplasma urealyticum/parvum	4
Mycoplasma genitalium	3
Neisseria gonorrhoeae	1
Mycoplasma hominis	1
Escherichia coli	1
Ukupno	31

U ovoj skupini u jednog pacijenta nije utvrđena etiologija, dok je u tri pacijenta utvrđena koinfekcija, jer su uz *C. trachomatis* detektirane i uro-genitalne mikoplazme.

Nije bilo statistički značajne razlike u detekciji *U. urealyticum* između skupine pacijenata s uretritisom i ostalih ispitanika u kojih uretritis nije dokazan (Tablica 5, $p>0,05$), za razliku od statistički značajno češće detekcije bakterije *C. trachomatis* u pacijenata s dokazanim uretritisom (Tablica 6, $p<0,05$).

Tablica 5. Zastupljenost bakterije *U. urealyticum* u uzorcima pacijenata uretritisom i pacijenata u kojih uretritis nije dokazan.

Uretritis		***Ureaplasma urealyticum***	
		DA	**NE**
5-9 PMN	**DA**	4	24
	NE	62	732
>10 PMN	**DA**	5	39
	NE	61	717

Tablica 6. Zastupljenost bakterije *C. trachomatis* u uzorcima pacijenata uretritisom i pacijenata u kojih uretritis nije dokazan.

Uretritis		***Chlamydia trachomatis***	
		DA	**NE**
5-9 PMN	**DA**	15	13
	NE	30	764
>10 PMN	**DA**	19	25
	NE	26	752

T. vaginalis je detektiran samo u jednom uzorku, u pacijenta u kojeg uretritis nije dokazan, sa simptomima kroničnog prostatitisa. U četiri pacijenta u kojiih je mikroskopski potvrđen uretritis detekcijom signifikantnog broja PMN u sedimentu PMU, kao uzročnik izolirane su gram-negativne štapićaste bakterije (enterobakterije) u monokulturi, uz prethodno isključenu moguću prisutnost drugih uzročnika molekularnim testom, od kojih su se dva pacijenta deklarirala kao pripadnici SMS skupine.

Tablica 7 pokazuje statistički značajno veću zastupljenost pacijenata mlađih od 25 godina u skupinama pacijenata s dokazanim uretritisom, za razliku od pacijenata starih 25 godina i više, koji su činili veliku većinu pacijenata u kojih uretritis nije utvrđen ($p<0,01$).

Tablica 7. Zastupljenost pacijenata mlađih od 25 godina u pacijenata s dokazanim uretritisom i pacijenata u kojih uretritis nije dokazan.

URETRITIS		**Dob (godine)**	
		≥25	**≤24**
5-9 PMN	**DA**	16	12
	NE	649	145
>10 PMN	**DA**	32	12
	NE	633	145

8. RASPRAVA

Uzročnici uretritisa najčešće su spolno-prenosivi patogeni, no uretritis može biti i neinfektivne etiologije izazvan mehaničkim ili kemijskim čimbenicima[15]. Vrlo rijetko uretritis može izazvati i kandida, te enterobakterije - koje se kao rijetke uzročnike uretritisa povezuje s insertivnim analnim spolnim odnosom. U simptomatskih pacijenata javlja se mukopurulentna sekrecija, dizurične tegobe i/ili nelagoda u mokraćnoj cijevi, no moguće su i asimptomatske infekcije. Dijagnoza uretritisa potvrđuje se objektivnim dokazom upale mokraćne cijevi što uključuje prisutnost iscjetka pri pregledu ili mikroskopsku detekciju značajnog broja PMN leukocita u preparatu obriska uretre ili preparatu sedimenta PMU[15,19]. Osim procjene broja PMN mikroskopski preprat omogućuje i prikaz mikroorganizama. Prisutnost Gram-negativnih diplokoka u preparatu obriska uretre dovoljan je dokaz gonokokne infekcije uretre, jer su osjetljivost i specifičnost ove metode u simptomatskih muškaraca oko 98%.[47] Ne-gonokokni uretritis (NGU) utvrđuje se na temelju mikroskopije i detekcije PMN leukocita bez prisustva mikroorganizama.

Cilj ovog istraživanja bila je detekcija spolno-prenosivih (SP) patogena i polimorfonuklearnih leukocita (PMN) u sedimentu prvog mlaza urina, koji je preferirani neagresivno prikupljeni uzorak umjesto višestrukih obrisaka uretre. Mikroskopskom detekcijom značajnog broja PMN leukocita u uzorcima dijagnoza uretritisa potvrđena je u svega 72/822 (8,8%) pacijenata koji su u razdoblju u kojem je istraživanje provedeno bili upućeni na mikrobiološku dijagnostiku s različitim uputnim dijagnozama – od uretritisa do neplodnosti. Prema trenutno važećim europskim smjernicama, u muškaraca s uretritisom, te akutnim epididimo-orhitisom u muškaraca mlađih od 40 godina i pripadnika MSM populacije, preporučena je detekcija bakterija *N. gonorrhoeae, C. trachomatis* i *M. genitalium* testovima

umnažanja nukleinskih kiselina iz prvog mlaza urina[45-46,73]. Drugu dijagnostičku skupinu za mikrobiološku obradu uzoraka na spolno-prenosive patogene čine pacijenti bez simptoma STI. Asimptomatskim pacijentima testiranje se preporuča ukoliko se radi o spolno aktivnim osobama u rizičnim skupinama (osobe mlađe od 25 godina, MSM, velik broj spolnih partnera), osobama sa potvrđenom drugom STI ili u spolnom kontaktu sa takvim partnerom, tijekom dijagnostičke obrade neplodnosti parova ili reaktivnog artritisa, tijekom konzultacija o kontracepciji ili trudnoći, u zatvorenika, kao dio forenzičke obrade spolnog zlostavljanja te roditeljima novorođenčeta sa neonatalnom pneumonijom ili konjuktivitisom[74]. U ovom istraživanju utvrđeno je da je mikrobiološka obrada u analiziranom razdoblju tražena u većine asimptomatskih pacijenata zbog STI probira ili kontrole provedene terapije, obrade neplodnosti parova ili ranije dijagnosticirane STI partnera.

Bakterija *C. trahomatis* najčešće je prijavljen uzročnik STD u Europi. Kao uzročnik NGU bakterija *C. trachomatis* detektira se u 11-50% slučajeva[45]. U ovom istraživanju prevalencija klamidijske infekcije bila je 5,47% (45/822). Bakterija C. trachomatis je kao uzročnik uretritisa detektirana u 47,22% (34/72) pacijenata s mikroskopski potvrđenim uretritisom, od kojih je 38,24% bilo mlađih od 25 godina. U prevalencijskim ili *case-control* istraživanjima detekcije uzročnika molekularnim metodama u pacijenata sa mikroskopski dokazanim uretritisom zabilježena učestalost *C. trachomatis* je primjerice bila 14,7% u Velikoj Britaniji[75], 20% u Iranu[76] i Francuskoj[9], 22,5% u Švedskoj[4], odnosno 32% u Australiji[22] te 37% u afroameričkh pacijenata u New Orleansu[77]. Viša učestalost zabilježena u ovom istraživanju može se prije svega objasniti malim brojem pacijenata s uretritisom obuhvaćenim ovim istraživanjem (svega 72/822), a tek potom različitom analitičkom osjetljivošću upotrijebljenih molekularnih testova, količinom i brzinom obrade uzorka te različitim pristupom u izolaciji nukleinske kiseline. U cilju utvrđivanja stvarne prevalencije *C. trachomatis* infekcije u

pacijenata s uretritisom u zagrebačkom području neophodno je istražiti više pacijenata, a budući da je pokazano da je svega desetak posto od ukupno zaprimljenih uzoraka povezano s uretritisom, potrebno je istražiti dvogodišnje razdoblje kako bi se mogla prikazati točnije učestalost pojedinih patogena na uzorku od oko 200 pacijenata s dokazanim uretritisom. U tijeku je i provođenje probira na *C. trachomatis* i *M. genitalium* u studentskoj populaciji Grada Zagreba iz neagresivno prikupljenih uzoraka (PMU i obrisak rodnice prikupljen samo-uzorkovanjem), kojim je planiran obuhvat od 2000 ispitanika dobi od 18-25 godina, a čiji rezultati će po prvi put pokazati prevalenciju *M genitalium* infekcije u studentskoj populaciji u Hrvatskoj, te utvrditi postoji li razlika u prevalenciji *C. trachomatis* infekcije u zagrebačkih studenata u odnosu na mlade iste dobi u Hrvatskoj, obzirom da je u mladih u Hrvatskoj 2010. zabilježena visoka prevalencija od 7,3% *C. trachomatis* infekcije u mladića te u 5,3% djevojaka od 18-25 godina.[78]

U Hrvatskoj je incidencija gonokoknih infekcija izazvanih rezistentnim sojevima niska, te nije zabilježena u razdoblju ovog istraživanja, gdje je gonokni uretritis otkriven 9,72%. pacijenata. Slična prevalencija gonokokne infekcije od oko 10% u muškaraca zabilježena je u drugim europskim zemljama poput Francuske nakon analize obrisaka uretre[9], te u pacijenata iz Rumunjske nakon analize PMU.[79]

U ovom istraživanju *T. vaginalis* nije detektiran niti u jednom uzorku PMU u pacijenata s dokazanim uretritisom, a istovjetni rezultati zabilježeni su i u istraživanju u Rumunjskoj i Francuskoj[9,79]. Dijagnostičke mogućnosti detekcije *T. vaginalis* infekcije su nativni mikroskopski preparat ili kultivacija u specijalnim hranjivim podlogama no osjetljivost ovih metoda je svega 50-65%.[50,52] Klinički validirani komercijalno dostupni PCR testovi nova su dijagnostička mogućnost u detekciji ovog parazita, uz mogućnost korištenja neinvazivnih uzoraka poput PMU, a visoke su osjetljivosti i specifičnosti (95-100%), te su prema važećim

europskim smjernicama obrade pacijenata s NGU preporučeni u populaciji u kojoj je zabilježeno >2% simptomatskih infekcija u žena[45,50]. Premda se u Hrvatskoj kao i u ostalim europskim zemljama bilježi niska prevalencija trihomonadne infekcije, koja je posebice rijetka u skupini do 40 godina života, obzirom da je u nedavnoj studiji provedenoj u Hrvatskoj upotrebom nevalidiranog *in house* testa utvrđena *T. vaginalis* infekcija u 8,2% pacijenata sa simptomima uretritisa, sve pacijente s uretritisom treba i dalje testirati i na trihomonadnu infekciju, ali je potrebna upotreba klinički validiranih testova[53].

Detekcija genitalnih mikoplazmi u uzorcima iz urogenitalnog sustava vrlo je česta, no budući da se *M. hominis* i *U. urealyticum* mogu naći kao dio normalne mikroflore sluznica urogenitalnog sustava i žena i muškaraca, nalaz ovih bakterija treba interpretirati s oprezom. U ovom istraživanju stoga nije bilo statistički značajne razlike u detekciji ureaplazmi u pacijenata s dokazanim uretritisom i pacijenata iz ostalih dijagnostičkih skupina. Nasuprot tome, detekcija *M. genitalium* drži se jednako značajnim nalazom kao i detekcija *C. trachomatis*, u pacijenata oba spola[80,81]. U ovom istraživanju *M. genitalium* detektirana je s nižom učestalošću nego je očekivano, što je u skladu s već postojećim istraživanjima provedenim u Hrvatskoj, no ti se nalazi mogu razumjeti uzme li se u obzir visoki udio testiranih u kojih infekcija nije dokazana[82,83].

Iz rezultata ovog istraživanja vidljivo je da je dominantni uzročnik uretritisa u muškaraca zagrebačke regije bakterija *C. trachomatis.* Spolno prenosivi patogeni detektirani su značajno češće u pacijenata s uretritisom nego u pacijenata iz ostalih dijagnostičkih skupina od kojih su dvije trećine bili pacijenti bez ikakvih simptoma infekcije, ali nije bilo statistički značajne razlike u detekciji *U. urealyticum* između skupine pacijenata s uretritisom i pacijenata iz ostalih dijagnostičkih skupina.

9. ZAKLJUČCI

1. Utvrđeno je da je najčešći uzročnik uretritisa u pacijenata s jakim upalnim jakim upalnim odgovorom (>9 PMN u uzorku sedimenta PMU), te pacijenata sa slabijim upalnim odgovorom (>4 PMN u uzorku sedimenta PMU) bakterija *C. trachomatis,*

2. Bakterija *M. genitalium* utvrđena je kao drugi uzročnik po učestalosti NGU u pacijenata s dokazanim uretritisom,

3. Utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika u učestalosti detekcije *U. urealyticum/parvum* i *M. hominis* u pacijenata s dokazanim uretritisom i pacijenata u kojih uretritis nije dokazan, te se detekcija ovih bakterija ne može jasno povezati s etiologijom uretritisa kao što je slučaj kod detekcije bakterija *C. trachomatis* i *M. genitalium*,

4. *C. trahomatis* statistički je značajno češće utvrđena u pacijenata mlađih od 25 godina, koji se ubrajaju u rizičnu skupinu za infekciju ovom bakterijom,

5. Parazit *T. vaginalis* detektiran je u svega jednog pacijenta u kojeg uretritis nije dokazan, u pacijenta koji je upućen na mikrobiološku obradu zbog kroničnog prostatitisa, što potvrđuje nisku incidenciju infekcije ovim parazitom u hrvatskoj populaciji.

10. ZAHVALE

Zahvaljujem se svojoj mentorici, prof. dr. sc. Jasmini Vraneš, voditeljici Službe za kliničku mikrobiologiju i pročelnici Katedre za medicinsku mikrobiologiju i parazitologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, na iznimnoj pomoći, potpori i savjetima pri izradi ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem svojoj obitelji i prijateljima na svoj podršci kroz cijeli studij medicine.

11. LITERATURA

1. Smith R, Copas AJ, Prince M, George B, Walker AS, Sadiq ST. Poor sensitivity and consistency of microscopy in the diagnosis of low grade non-gonococcal urethritis. Sex Transm Infect. 2003; 79: 487-90.

2. Willcox JR, Adler MW, Belsey EM. Observer variation in the interpretation of Gram-stained urethral smears: implications for the diagnosis of non-specific urethritis. Br J Vener Dis. 1981; 57: 134-6.

3. Wetmore CMP, Manhart LEP, Lowens MSP, et al. Demographic, behavioral, and clinical characteristics of men with nongonococcal urethritis differ by etiology: A case-comparison study. J Sex Transm Dis. 2011; 38: 180-6.

4. Falk L, Fredlund H, Jensen JS. Symptomatic urethritis is more prevalent in men infected with *Mycoplasma genitalium* than with *Chlamydia trachomatis*. Sex Transm Infect. 2004; 80: 289-93.

5. Leung A, Eastick K, Haddon L, Horn K, Ahuja D, Horner P. *Mycoplasma genitalium* is associated with symptomatic urethritis. Int J STD AIDS. 2006; 17: 285- 8.

6. Sena AC, Lensing S, Rompalo A, i sur. *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium*, and *Trichomonas vaginalis* infections in men with nongonococcal urethritis: predictors and persistence after therapy. J Infect Dis. 2012; 206: 357-65

7. Horner PJ, Thomas B, Gilroy CB, Egger M, Taylor-Robinson D. Do all men attending departments of genitourinary medicine need to be screened for non-gonococcal urethritis? Int J STD AIDS. 2002; 13: 667-73

8. Bradshaw CS, Tabrizi SN, Read TRH, et al. Etiologies of nongonococcal urethritis: Bacteria, viruses, and the association with orogenital exposure. The J Infect Dis. 2006; 193: 336-45.

9. Dupin N, Bijaoui G, Schwarzinger M, et al. Detection and quantification of *Mycoplasma genitalium* in male patients with urethritis. Clin Infect Dis. 2003; 37: 602-5.

10. Geisler WMM, Yu S, Hook EW, III. Chlamydial and gonococcal infection in men without polymorphonuclear leukocytes on Gram stain: Implications for diagnostic approach and management. Sex Transm Dis. 2005; 32: 630-4.

11. Horner P, Thomas B, Gilroy CB, Egger M, Taylor-Robinson D. Role of *Mycoplasma genitalium* and *Ureaplasma urealyticum* in acute and chronic nongonococcal urethritis. Clin Infect Dis. 2001; 32: 995-1003.

12. Marrazzo JM, Whittington WL, Celum CL, i sur.. Urine-based screening for *Chlamydia trachomatis* in men attending sexually transmitted disease clinics. Sex Transm Dis. 2001; 28: 219-25

13. Manhart LE, Gillespie CW, Lowens MS, i sur. Standard treatment regimens for nongonococcal urethritis have similar but declining cure rates: A randomized controlled trial. Clin Infect Dis. 2013; 56: 934-42.

14. Workowski KA, Bolan GA. Centers for Disease Control and Prevention - Sexually transmitted diseases treatment guidelines. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2015;64:1-137.

15. Augenbrawn MH, McCormick WM. Urethritis. U: Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ, ur. Principles and practice of infectious diseases. Philadelphia: Saunders, 2015; 1349-1357

16. Meyer T. Diagnostic procedures to detect *Chlamydia trachomatis* infections. Microorganisms. 2016; 4: 25. doi:10.3390/microorganisms4030025 Dostupno online: http://www.mdpi.com/2076-2607/4/3/25 (pristupljeno 25.05.2018.).

17. Geraats-Peters CWM, Brouwers M, Schneeberger PM, i sur. Specific and sensitive detection of *Neisseria gonorrhoeae* in clinical specimens by real-time PCR. J Clin Microbiol. 2005;43:5653-9.

18. Lunny C, Taylor D, Hoang L, i sur. Self-collected versus clinician-collected sampling for chlamydia and gonorrhea screening: A systemic review and meta-analysis. PLoS ONE. 2015;10. Dostupno online: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132776 (pristupljeno 25.05.2018).

19. Chen YC, Unemo M. Principles of molecular tests for the diagnosis of sexually transmitted infections. U: Unemo R, ur. Laboratory diagnosis of sexually transmitted infections, including human immunodeficiency virus. Geneva, Swicharland: WHO 2013;183-198.

20. Horner PJ, Lars Falk KB, van der Meijden W, Moi H. 2016 European guideline on the management of non-gonococcal urethritis. Int J STD AIDS. 2016; 27;11; 928–937.

21. Gaydos C, Maldeis NE, Hardick A, Hardick J, Quinn TC. *Mycoplasma genitalium* compared to chlamydia, gonorrhoea and trichomonas as an aetiological agent of urethritis in men attending STD clinics. Sex Transm Infect. 2009; 85: 438-40.

22. Rane VS, Fairley CK, Weerakoon A, i sur. Characteristics of acute nongonococcal urethritis in men differ by sexual preference. J Clin Microbiol. 2014; 52: 2971-6.

23. Horner PJ, Taylor-Robinson D. Association of *Mycoplasma genitalium* with balanoposthitis in men with non-gonococcal urethritis. Sex Transm Infect. 2010; 87:3.

24. Edwards S. Balanitis and balanoposthitis: a review. Genitourin Med. 1996; 72:155-9.

25. Gaydos C, Maldeis NE, Hardick A, Hardick J, Quinn TC. *Mycoplasma genitalium* compared to chlamydia, gonorrhoea and trichomonas as an aetiological agent of urethritis in men attending STD clinics. Sex Transm Infect 2009; 85: 438-40.

26. Zhang N, Wang R, Li X, Liu X, Tang Z, Liu Y. Are *Ureaplasma spp*. a cause of nongonococcal urethritis? A systematic review and meta-analysis. PLoS One. 2014; 9: e113771.

27. Wetmore CM, Manhart LE, Lowens MS, et al. *Ureaplasma urealyticum* is associated with nongonococcal urethritis among men with fewer lifetime sexual partners: A case-control study. J Infect Dis. 2011; 204: 1274-82.

28. Hawkins DA, Fontaine EA, Thomas BJ, Boustouller YL, Taylor-Robinson D. The enigma of non-gonococcal urethritis: role for *Bacteroides ureolyticus*. Genitourin Med. 1988; 64: 10-3.

29. Manhart LE, Khosropour CM, Liu C, et al. Bacterial vaginosis-associated bacteria in men: association of *Leptotrichia/Sneathia spp*. with nongonococcal urethritis. Sex Transm Dis. 2013; 40: 944-9.

30. Keane FE, Thomas BJ, Whitaker L, Renton A, Taylor-Robinson D. An association between non-gonococcal urethritis and bacterial vaginosis and the implications for patients and their sexual partners. Genitourin Med. 1997; 73: 373-7.

31. Shimada Y, Ito S, Mizutani K, et al. Bacterial loads of *Ureaplasma urealyticum* contribute to development of urethritis in men. Int J STD AIDS 2014; 25: 294-8.

32. Frolund M. Bacterial aetiologies and characterization of the urethral microbiome in men with idiopathic urethritis using molecular biology methods. Copenhagen: University of Copenhagen, PhD Thesis; 2014.

33. Tabrizi SN, Ling AE, Bradshaw CS, Fairley CK, Garland SM. Human adenoviruses types associated with non-gonococcal urethritis. Sex Health. 2007; 4: 41-4.

34. Tonsberg E, Hartgill U. The urethral smear as a tool in diagnosing adenovirus-induced urethritis. Int J STD AIDS. 2014; 25: 1047-9.

35. Shahmanesh M. Problems with non-gonococcal urethritis. Int J STD AIDS. 1994; 5: 390-9.

36. Berntsson M, Lowhagen GB, Bergstrom T, i sur. Viral and bacterial aetiologies of male urethritis: findings of a high prevalence of Epstein-Barr virus. Int J STD AIDS. 2010; 21: 191-4.

37. Horner P. The etiology of acute nongonococcal urethritis - The enigma of idiopathic urethritis? Sex Transm Dis. 2011; 38: 187-9.

38. Janier M, Lassau F, Casin I, et al. Male urethritis with and without discharge: a clinical and microbiological study. Sex Transm Dis. 1995; 22: 244-52.

39. Chowdhury MN, and Pareek SS. Urethritis caused by group B streptococci: a case report. Br J Vener Dis. 1984 Feb; 60: 56–57.

40. CDC - Sexually transmitted diseases surveillance, 2008. Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services, CDC; 2009.

41. Weinstock H, Berman S, Cates W, Jr. Sex transmitted diseases among american youth: incidence and prevalence estimates, 2000. Perspect Sex Reprod Health. 2004;36:6–10.

42. World Health Organization. Global incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted infections. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2012.

43. World Health Organization. Global strategy for the prevention and control of sexually transmitted infections, 2006-2015. Geneva Switzerland: World Health Organization, 2007.

44. European Centre for disease prevention and control. Sexually transmitted infection in Europe 2013. Stockholm, Sweden: European Centre for Prevention and Control, 2015.

45. Horner PJ, Blee K, Falk L, van der Meijden W, Moi H. 2016 European guideline on the management of non-gonococcal urethritis. Int J STD AIDS. 2016;27:928-37.

46. Bignell C, Unemo M. European STI Guidelines Editorial Board. 2012 European guideline on the diagnosis and treatment of gonorrhoea in adults. Int J STD AIDS. 2013;24:85-92.

47. Bachmann LH, Manhart LE, Martin DH, i sur. Advances in the understanding and treatment of male urethritis. Clin Infect Dis. 2015;61(Suppl 8):S763-9.

48. Papp JR, Schachter J, Gaydos CA, Van Der Pol B. Centers for disease control. Recommendations for the laboratory-based detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* — 2014. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2014;63:1-19.

49. WHO Guidelines for the treatment of Neisseria gonorrhoeae. Geneva, Switzerland: World Health Organisation, 2016.

50. Hakenberg, OW, Harke N, Wagenlehner F. Urethritis in men and women. Eur Urol (Suppl.) 2017; 16:144 – 148.

51. Ng A, Ross JD. *Trichomonas vaginalis* infection: How significant is it in men presenting with recurrent or persistent symptoms of urethritis? Int J STD AIDS. 2016; 27:63-5.

52. Tsai, CC, Li CC. Nonchlamydial nongonococcal urethritis in men. Urological Science. 2013; 24:73 -77.

53. Sviben M, Mlinarić Missoni E, Meštrović T, Vojnović G, Mlinarić Galinović G. Epidemiology and laboratory characteristics of *Trichomonas vaginalis* infection in Croatian man with and without urethritis syndrome: A case-control study. BMJ Sex Transm Infect. 2015;91:360. Dostupno online: http://sti.bmj.com/content/91/5/360 (pristupljeno 26.05.2018.)

54. Centers for Disease Control and Prevention. Sexually transmitted diseases treatment guidelines 2006: diseases characterized by urethritis and cervicitis. Dostupno online: http://www.cdc.gov/STD/treatment/2006/urethritis-and- cervicitis.html (pristupljeno 26.05.2018.)

55. Schwebke JR, Hook EW III. High rates of *Trichomonas vaginalis* among men attending a sexually transmitted diseases clinic: implications for screening and urethritis management. J Infect Dis. 2003;188: 465-468.

56. Leung A, Taylor S, Smith A, Spender R, Horner P. Urinary tract infection in patients with acute non-gonococcal urethritis. Int J STD AIDS. 2002;13:801-804.

57. Shahmanesh M, Moi H, Lassau F, Janier M, for IUSTI/WHO. 2009 European guideline on the management of male non-gonococcal urethritis. Int J STD AIDS. 2009;20:458-464.

58. Maeda S, Yasuda M, Ito S, Seike K, Ito S, Deguchi T. Azithromycin treatment for nongonococcal urethritis negative for *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma parvum*, and *Ureaplasma urealyticum*. Int J Urol. 2009;16:215-216.

59. Kuypers J, Gaydos CA, Peeling RW. Principles of laboratory diagnosis of STIs. In: Holmes KK, ur. Sexually transmitted diseases. 4th izd. New York: McGraw-Hill Medical; 2008: 937–58.

60. Mahlen SD. Applications of molecular diagnostics. U: Mahon CR, Lehman DC, Manuselis G, ur. Text book of diagnostic microbiology. 3. izd. St. Louis, Missouri: Elsevier Publishers; 2007.

61. Kiechle FL. What is molecular diagnostics? Dostupno online: http://www.gomolecular.com/discover/what_is_molecular_diagnostics.html (pristupljeno 26.05.2018.).

62. Quinn TC. Recent advances in diagnosis of Sex Transm Dis. Sex Transm Dis. 1994;21:S19–27.

63. Muralidhar S. Molecular methods in the laboratory diagnosis of sexually transmitted infections. Indian J Sex Transm Dis. 2015;36:9-17.

64. Brill JR. Diagnosis and treatment of urethritis in men. Am Fam Physician. 2010;81:873-878.

65. Jernberg E, Moghaddam A, Moi H. Azithromycin and moxifloxacin for microbiological cure of *Mycoplasma genitalium* infection: an open study. Int J STD AIDS. 2008;19:676-679.

66. Jensen JS, Bradshaw CS, Tabrizi SN, Fairley CK, Hamasuna R. Azithromycin treatment failure in *Mycoplasma genitalium*-positive patients with nongonococcal urethritis is associated with induced macrolide resistance. Clin Infect Dis. 2008;47:1546-1553.

67. Terris MK, Cherukuri SV, Hathaway CA. Urethral syndrome. http://emedicine.medscape.com/article/451683 (pristupljeno 26.05.2018.)

68. Interstitial Cystitis Network. INC special report: DIET. Understanding diet and IC. http://www.ic-network.com/handbook/diet.html (pristupljeno 26.05.2018.).

69. U.S. Preventive Services Task Force. Screening for gonorrhea: recommendation statement. Ann Fam Med. 2005;3:263-267. Dostupno online: http://www.ahrq.gov/clinic/uspstf05/gonorrhea/gonrs.html (pristupljeno 26.05.2018.).

70. Centers for Disease Control and Prevention. Sexually transmitted diseases treatment guidelines 2006. Special populations: MSM. Dostupno online: http://www.cdc.gov/std/treatment/2006/specialpops.htm#specialpops4 (pristupljeno 26.05.2018.).

71. Sadiq ST, Taylor S, Copas AJ, I sur. The effects of urethritis on seminal plasma HIV-1 RNA loads in homosexual men not receiving antiretroviral therapy. Sex Transm Infect. 2005;81:120-123.

72. Cohen MS, Hoffman IF, Royce RA, i sur., for the AIDSCAP Malawi Research Group. Reduction of concentration of HIV-1 in semen after treatment of urethritis: implications for prevention of sexual transmis- sion of HIV-1. Lancet. 1997;349:1868-1873.

73. Lanjouw E, Ouburg S, de Vries HJ, Stary A, Radcliffe K, Unemo M. 2015 European guideline on the management of *Chlamydia trachomatis* infections. Int J STD AIDS. 2016;27:333-48.

74. de Barbeyrac B, Skov-Jensen J. Sex Transm Infect. U: Cornaglia G, Courcol R, Herrmann JL, Kahlmeter G, Pelgue-Lafeulle H, Vila J, ur. European manual of clinical microbiology. Paris: Société Française de Microbiologie – SFM, 2012;181-95.

75. Marcus JP, Nori AV, Witney AA, Lopeman RC, Butcher PD, Sadiq ST. High prevalence of antibiotic-resistant *Mycoplasma genitalium* in nongonococcal urethritis: The need for routine testing and the inadequacy of current treatment options. Clin Infect Dis. 2014;58: 631-7.

76. Yeganeh O, Jeddi-Tehrani M, Yaghmaie F, i sur. A survey on the prevalence of *Chlamydia trachomatis* and *Mycoplasma genitalium* infections in symptomatic and asymptomatic men referring to urology clinic of Labbafinejad Hospital, Tehran, Iran. Iran Red Crescent Med J. 2013; 15:340-4.

77. Mena L, Wang X, Mroczkowski TF, Martin DH. *Mycoplasma genitalium* infections in asymptomatic men and men with urethritis attending a sexually transmitted diseases clinic in New Orleans. Clin Infect Dis. 2002;35:1167-73.

78. Božičević I, Grgić I, Židovec-Lepej S, i sur. Urine-based testing for *Chlamydia trachomatis* among young adults in a population-based survey in Croatia: Feasibility and prevalence. BMC Public Health. 2011;11:230. Dostupno online: http://www.biomedcentral.com/1471-2458/11/230 (pristupljeno 26.05.2018.).

79. Vica ML, Junie LM, Grad AI, Tataru A, Matei HV. Distribution of Sex Transm Dis in a group of symptomatic male patients using urine samples and PCR technique. Rev Romana Med Lab. 2015;23:323-31.

80. Ljubin-Sternak S, Marijan T, Vraneš J. Mycoplasma genitalium – uzročnik spolno prenosivih bolesti kojeg se ne smije zanemariti. Infekt Glasn. 2014;34:183-7.

81. Ljubin-Sternak S, Meštrović T. *Chlamydia trachomatis* and genital mycoplasmas: pathogens with an impact on human reproductive health. J Pathog. 2014. Dostupno online: http://dx.doi.org/10.1155/2014/183167 (pristupljeno 26.05.2018.).

82. Plecko V, Zele-Starcevic L, Tripkovic V, i sur. Unusually low prevalence of *Mycoplasma genitalium* in urine samples from infertile men and healthy controls: a prevalence study. BMJ Open. 2014; 4e005372. Doi: 10.1134/bmjOpen-2014-005372. Dostupno online: http://bmjopen.bmj.com/content/4/8/e005372 (pristupljeno 26.05.2018.)

83. Ljubin-Sternak S, Meštrović T, Kolarić B, Jarža-Davila N, Marijan T, Vraneš J. Assessing the need for routine screening for Mycoplasma genitalium in the low-risk female population: A prevalence and co-infection study on women from Croatia. Int J Prev Med. 2017;8. www.ijpvmjournal.net Ahead of print Doi: 10.4103/ijpvm.IJPVM_309_16

12. ŽIVOTOPIS

Rođen sam 27.02.1993. godine u Osijeku. Završio sam Osnovnu školu Višnjevac u Osijeku 2007. godine. Nakon toga upisujem Isusovačku klasičnu gimnaziju s pravom javnosti u Osijeku koju završavam 2011. Medicinski fakultet u Zagrebu upisao sam ak. god. 2011./2012. Radio sam kao demonstrator na Katedri za Fiziku Medicinskog fakulteta u Zagrebu. Bio sam član sekcije za Kirurgiju i CroMSIC-a. Praksu iz kirurgije odradio sam u SAD-u na Heart and Vascular Institute, Memorial Hermann Hospital, Texas Medical Center, u Houstonu 2017. godine.