

Borut Gubina¹, Jernej Šavs²

Uporabnost verižne reakcije s polimerazo v diagnostiki gonoreje

Application of Polymerase Chain Reaction in Gonorrhoea Diagnosis

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: *Neisseria gonorrhoeae* – diagnostika – mikrobiologija, polimerazna verižna reakcija – metode

Neisseria gonorrhoeae je po Gramu negativni diplokok, ki povzroča spolno prenosljivo bolezen gonorejo. Prenaša se največkrat s spolnimi odnosi med nestalnimi partnerji, z okužene matere na otroka in z enega okuženega partnerja na drugega. Diagnostika gonoreje temelji na osamitvi bakterije in nadaljnji identifikaciji, ki temelji predvsem na fermentaciji različnih sladkorjev. Serološka diagnostika ni zanesljiva, zato ponuja uporaba tehnike verižne reakcije s polimerazo pomembne prednosti.

Ugotoviti uporabnost diagnostike okužb z *N. gonorrhoeae* s komercialno dostopnim testom verižne reakcije s polimerazo COBAS AMPLICOR in njegovo zanesljivost v primerjavi s standardno diagnostično metodo.

Zbrane vzorce smo razdelili v tri skupine. Skupina A: 113 kliničnih vzorcev (seč, bris sečnice) odvzetih v Ambulanti za spolno prenosljive bolezni na Dermatovenerološki kliniki v Ljubljani (skupina z velikim tveganjem za okužbo); skupina B: vzorci seča 48 študentov medicine (skupina z majhnim tveganjem za okužbo); skupina C: 31 zamrznjenih sevov šestih različnih bakterijskih vrst iz rodu *Neisseriaceae*.

V skupini A smo ugotovili tri pozitivne bolnike z metodo verižne reakcije s polimerazo in s standardno metodo osamitve gonokokov iz kužnine. V skupini B so bili vsi vzorci negativni. V skupini C smo kot pozitivne opredelili samo tiste seve najserij, ki so pripadali vrsti *N. gonorrhoeae* – teh je bilo deset.

Z našim delom smo dokazali, da je test verižne reakcije spolimerazo COBAS AMPLICOR uporaben za diagnostiko gonoreje, saj je vsaj tako zanesljiv kot klasična diagnostika in dovolj specifičen, da razloči med *N. gonorrhoeae* in drugimi bakterijskimi vrstami v rodu *Neisseriaceae*.

ABSTRACT

KEY WORDS: *Neisseria gonorrhoeae* – diagnosis – microbiology, polymerase chain reaction – methods

Neisseria gonorrhoeae is a Gram negative diplococcus the cause of sexually transmitted disease gonorrhoea. It is transmitted through a promiscuous intercourse, from infected mother to the newborn and from one partner to another. The standard method of diagnostics of gonorrhoea is the cultivation and identification of the bacteria, which is based on selective fermentation of different sugars. As the serological diagnostics is not sufficiently reliable, the polymerase chain reaction technique carries important advantages.

¹ Borut Gubina, štud. med., Inštitut za mikrobiologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška 4, 1000 Ljubljana.

² Jernej Šavs, štud. med., Inštitut za mikrobiologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška 4, 1000 Ljubljana.

³ Delo je bilo nagrajeno s Prešernovo nagrado študentom za leto 1999.

To asses the use of the polymerase chain reaction COBAS AMPLICOR as a diagnostic method for *Neisseria gonorrhoeae* infection and its reliability in comparison with the classical method.

We divided the collected samples in three groups. Group A group of 113 clinical specimens (urine, cervical smear) from the Outpatient Clinic for Sexually Transmitted Diseases, Department of Dermatology in Ljubljana, accounted as a population with high risk of infection; group B of 48 medical students (urine rinse of urethra), presumed to be a population with low risk of infection; group C of 31 frozen samples of six different strains from the genus *Neisseriaceae* that have shown the specificity of the COBAS AMPLICOR polymerase chain reaction test.

In the group A we found three gonorrhea positive patients with the polymerase chain reaction method, as well as with the standard method of cultures and fermentation of sugars. All the results of the testing in the group B were negative. In the group C we correctly identified the 10 *N. gonorrhoeae* among the different *Neisseriaceae* strains.

With our work we proved that COBAS AMPLICOR polymerase chain reaction test is useful for diagnostic and screening purposes. It is as reliable as classical diagnostic method and enough specific to discern *N. gonorrhoeae* from other bacteria of the genus of *Neisseriaceae*.

UVOD

Neisseria gonorrhoeae (gonokok) se prenaša večinoma s spolnimi odnosi ter povzroča bolezen gonorejo ali kapavico. Kljub precejšnjemu mikrobiološkemu znanju o tej bakteriji njeno diagnostiko še vedno otežujeta vsaj dve dejstvi: da hitro propade v suhem, hladnem in oksidirajočem okolju ter da je zelo podobna drugim bakterijam iz rodu najserij.

Uvrstitev in opis

Najserije so po Gramu negativni, fakultativno anaerobni diplokokki, uredijo pa se lahko tudi v tetrade ali manjše skupke. So negibljive bakterije, ne tvorijo spor in nekatere tvorijo kapsulo. Za človeka sta večinoma patogeni le *N. gonorrhoeae* in *N. meningitidis* (meningokok), ki se morfološko praktično ne razlikujeta. Ostale najserije so lahko del normalne flore zgornjih dihal, spolovil in sečil (1).

N. gonorrhoeae v kužnini najpogosteje najdemo v polimorfonuklearnih celicah kot diplokoke, ki se med sabo stikajo z daljšo stranico. V preparatu iz kužnine se najlepše vidijo, če jih barvamo z metilenskim modrilom ali po Gramu.

Antigensko so gonokoki zelo različni in praktično ni mogoče najti dveh antigensko enakih izolatov. Zaradi tako velike raznoliko-

sti gonokokov ne razporejamo v serološke skupine in tipe.

Gonokoki so zahtevne bakterije in uspešno rastejo le na obogatenih gojiščih (čokoladnem agarju), pri 35–36°C in vlažni atmosferi s 5–10% CO₂. Kolonije gonokoka vedno proizvajajo oksidazo, vendar jih lahko od drugih najserij ločimo po fermentaciji različnih sladkorjev (2).

Klinična slika okužbe

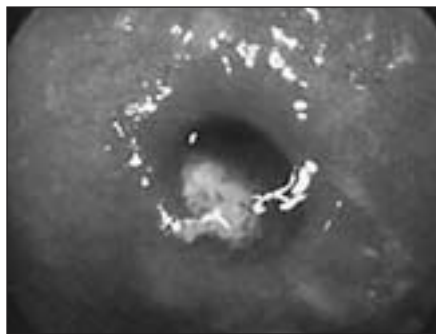
Gonoreja je izključno bolezen človeka, saj *N. gonorrhoeae* lahko raste samo v človeku. Izvor okužbe so bolniki in okužene osebe brez bolezenskih znakov. Bolezen se tipično kaže kot akutno gnojno vnetje sluznice sečnice (slika 1), pri ženski tudi materničnega vratu (slika 2). Gnojni izcedek iz zunanega ustja sečnice ali materničnega vratu je praviloma gost, rumeno-zelenkast in ga je več proti jutru. Prav tako lahko gonokok povzroči nastanek psevdoabscesa v Bartolinijevih žlezah.

Manj tipične klinične slike so lahko vnetje Cowperjevih žlez, vnetje zadnjega dela sečnice, prostatitis in epididimitis pri moškem ter pri ženski endometritis in salpingitis. Prav salpingitis pušča pri kronični okužbi zaradi neizrazitih kliničnih znakov funkcijske okvare jajcevodov in posledično neplodnost (3, 4).

Zaradi različnih spolnih stikov lahko pride do okužbe v danki in žrelu ter zaradi slabšega imunskega stanja organizma do



Slika 1. Gonokokno vnetje sečnice pri moškem. Izcedek iz zunanega ustja sečnice.



Slika 2. Gonokokni cervicitis. Izcedek iz zunanjega ustja materničnega vratu.

diseminirane okužbe in metastatskih zapletov (npr. vnetja sklepov in izpuščaje v na koži). Pri novorojenčku lahko gonokok ob nepravilni profilaksi povzroči gonokokno vnetje oči, pri mladih deklicah pa vulvovaginitis.

Pri moških se akutna okužba kaže kot uretritis z bolečinami pri mokrenju in z gnojnim izcedkom iz sečnice. Pri nezdravljenih moških se lahko razvijejo zapleti, kot so vnetje prostate in obmodka ter kronično vnetje sečnice. Prav tako so lahko asimptomatski prenašalci bakterije homoseksualni moški, pri katerih se lahko *N. gonorrhoeae* pogosto najde v rektumu ali žrelu.

Pri ženskah akutna gonokokna okužba poteka kot vnetje sluznice materničnega vratu in sečnice, z gnojnim izcedkom in bolečinami v spodnjem delu trebuha. Pomembno je vedeti, da ima opisane bolezenske znake in simptome le slaba tretjina okuženih žensk, medtem ko poteka okužba pri ostalih brez bolezenskih znakov. Taka ženska je kužna in prenaša okužbo s spolnimi odnosi.

Posebna oblika gonokokne okužbe je primarno gonokokno vnetje očesne veznice pri novorojenčkih, ki se okužijo pri prehodu skozi porodni kanal okužene matere. Zaradi preprečevanja gonokoknega konjunktivitisa v mnogih državah vsi novorojenčki dobijo antibiotične kapljice v oči neposredno po porodu (5, 6).

Patogeneza

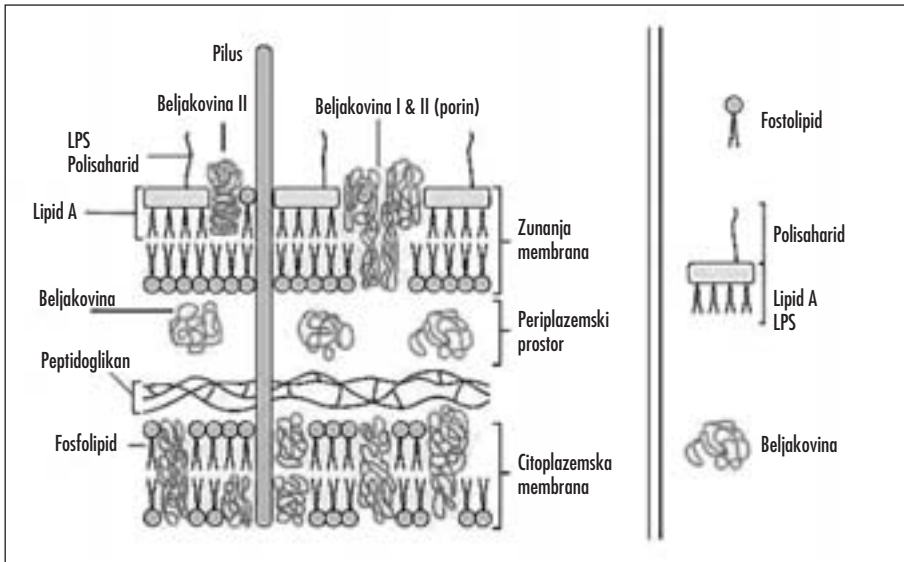
Gonokoki so eni izmed genetsko in antigen-sko najbolj raznolikih mikroorganizmov. Razvili so izjemno učinkovite mehanizme

za izmikanje imunskemu odzivu in si na ta način priborili položaj nenehnega človekovega spremljevalca. Osnova uspešnega izmikanja imunskemu odzivu je mehanizem hitrega spreminjanja beljakovin na površini gonokokov, ki so odgovorne za razvoj učinkovitega protitelesnega in celičnega imunskega odgovora. Te spremembe nastanejo pri vsakem petstotem do tisočem gonokoku, kar pomeni, da že ena sama kolonija na gojišču lahko vsebuje več sto antigeno različnih celic.

Najpomembnejši gonokokni antigeni so pilin (poznanih je okoli 100 tipov), beljakovina I ali Por (okoli 50 tipov), beljakovina II ali Opa (več kot 100 tipov) beljakovina III ali Rpm (6 tipov) ter lipooligosaharid. Pomembno vlogo v patogenizi okužb z *N. gonorrhoeae* ima tudi površinski encim proteaza IgA1, ki razgrajuje sluznična zaščitna protitelesa razreda IgA1 in na ta način zmanjšuje lokalno odpornost (7).

Pilusi

Pilin je osnovna beljakovina pilusov – laskom podobnih, nekaj mikrometrov dolgih izrastkov, ki izraščajo iz površine gonokokne celice in so podobni flagelom. So ravni tubuli, a nimajo oblike vijačnice, se ne vrtijo in nimajo kompleksnega bazalnega aparata. Pilusi so najpomembnejši virulenci dejavnik gonokokov, ki jim omogočajo pritrditev na epitelne celice sluznice in pomagajo pri vstopu v epitelno celico in prodoru skozi do bazalne membrane.



Slika 3. Shema bakterijske membrane in membranskih beljakovin *N. gonorrhoeae*.

Konec pilinske molekule, ki je zasidran v bakterijski celični membrani (slika 3), sestavljajo pretežno hidrofobne aminokisljine. Njegova sestava je močno podobna pri vseh gonokoknih sevih. Nasprotno je prosti konec pilinske molekule, proti kateremu naj bi se razvil učinkovit imunski odgovor, antigensko zelo spremenljiv, saj ni mogoče najti dveh sevov gonokokov, ki bi imela popolnoma enako sestavo tega dela pilinske molekule. Celo isti sev gonokoka v različnih obdobjih okužbe spreminja antigensko sestavo proste ga konca pilinske molekule. Razlog za to je prisotnost številnih kopij genov in psevdogenov za pilinsko molekulo v genomu gonokokov, med katerimi je samo ena različica določen čas prisotna na ekspresijskem mestu.

Pod pritiskom imunskega sistema gonokoki zelo učinkovito in hitro zamenjujejo pilinske gene na ekspresijskem mestu in se na ta način vedno učinkovito izogone uničenju s strani imunsko kompetentnih celic. Ravno zato najdemo gonokoke v kužnini večinoma znotrajcelično v nevtrofilcih.

Beljakovina I ali Por je glavna beljakovina zunanega dela gonokokne celične stene, ki je povezana z odpornostjo gonokokov na baktericidno delovanje humanega seruma. Vsak gonokokni sev izraža en sam tip belja-

kovine Por, ki ga izbere iz zaloge približno 50 različnih genov.

Beljakovina II ali Opa skupaj s pilinsko molekulo omogoča pritrditev gonokoka na epitelno celico sluznice. Vsak sev gonokokov vsebuje gene za vsaj 10 različnih beljakovin Opa in odvisno od razmer gonokok izraža na svoji površini eno, dve ali tri beljakovine tega tipa. V določenih pogojih lahko gonokok celo umakne beljakovino Opa s svoje površine, ker je ta beljakovina receptor za nevtrofilce, se na ta način bakterija izogne uničenju.

Lipooligosaharid je pomembna sestavina gonokokne celične stene, ki deluje kot endotoksin, in je odgovoren za toksičnost gonokokov. Za razliko od ostalih po Gramu negativnih bakterij imajo gonokoki relativno kratko lipopolisaharidno molekulo, ki jo zato imenujemo lipooligosaharid. Gonokoki lahko istočasno izražajo na svoji površini več različic lipooligosaharida, od katerih je najmanj ena zelo podobna sialični kislini ali N-acetilneuraminski kislini, ki je pomembna strukturna beljakovina nekaterih človeških celic.

Zaradi te podobnosti fagocitne celice ne prepoznajo kot tujke tistih gonokokov, ki izražajo sialični kislini podobne lipooligosaharide na svoji površini. Ta pojav, ki ga imenujemo molekularna mimikrija, je še

eden od učinkovitih mehanizmov gonokokov za umikanje imunskemu odzivu (7–9).

Mikrobiološka diagnostika gonoreje

Okužbo z gonokoki lahko dokažemo z neposrednimi in posrednimi metodami. Pri neposrednih določamo bakterijo samo, dele bakterije in njene izločke in izdelke. Pri posrednih metodah pa ugotavljamo imunski odziv na okužbo z določeno bakterijo.

Pri gonoreji imunski odziv za zanesljivo diagnostiko bolezni ni uporaben, zato opisujemo le neposredne diagnostične metode.

Klasična mikrobiološka diagnostika najserij je težavna v primerih, ko posamezne najserije odstopajo od standardnih značilnosti vrste in ne fermentirajo katerega od sladkorjev. Tako je lahko spremenjena najserija (*N. meningitidis*, *N. flava* ali *N. subflava*) po vseh klasičnih testih identifikacije spoznana kot *N. gonorrhoeae*.

Mikroskopski pregled neposrednega razmaza

Mikroskopski pregled je najpreprostejši in najhitrejši način diagnostike gonoreje. Bris gnoja lahko vzamemo iz sečnice, zunanega ustja materničnega vratu, žrela ali rektuma. Razmaz pobarvamo po Gramu ali z metilenskim modrilom. Metoda je lahko zelo občutljiva za dokaz bakterije, če jo izvaja izkušen zdravnik. Tako lahko pri brisih sečnice pri moških z akutno gonokokno okužbo dobimo občutljivost metode do 94,8%, ki pa je precej manjša pri pregledu brisov materničnega vratu pri ženskah z akutno gonokokno okužbo in moških, ki nimajo tipičnih bolezenskih znakov (10).

Neposredna imunofluorescenčna metoda

Neposredno lahko dokažemo gonokok tudi s protitelesi, označenimi s fluoresceinom, ki se vežejo na beljakovine na gonokokovi zunanji membrani. Občutljivost te metode je podobna kot pri barvanju z barvilom, je pa bolj specifična (100% za brise sečnice pri moškem in 98% oziroma 94% za brise sečnice oziroma materničnega vratu pri ženski) (10).

Encimsko-immunska metoda

Neposredni dokaz gonokoka se izvaja tudi z encimsko-immunsko metodo ali testom ELISA (iz angl. *Enzyme-linked immunosorbent assay*). Zaradi spremenljivosti beljakovin v troslojni zunanji gonokokovi membrani ta metoda ni povsem zanesljiva (10).

Osamitev iz kužnine in identifikacija gonokokov

Vzorec kužnine lahko prenesemo do laboratorija v transportnem mediju ali pa ga nacepimo neposredno na končno gojišče. Slednjega nato prenesemo v laboratorij v posebnih posodah, ki omogočajo potrebne pogoje za preživetje gonokokov.

Verjetnost pravilnega prepoznavanja *N. gonorrhoeae* se močno poveča, če bris s kužnino inkubiramo na selektivnih, obogatitvenih gojiščih pri temperaturi 35–36°C in atmosferi s 3–10% CO₂. Po 48–72 urah zrastejo vidne kolonije gonokokov. Te kolonije precepimo na nova gojišča in s tem dobimo čisto kulturo gonokokov, ki jo tedaj uporabimo za nadaljnje teste.

Osnovna identifikacija gonokoka temelji na naslednjih testih: testu oksidaze, testu fermentacije sladkorjev (gonokok fermentira le glukozo), barvanju s fluorescentnimi protitelesi, koaglutinaciji in aglutinaciji lecitina. Slaba stran tega postopka je dolgotrajnost izolacije in identifikacije, saj je minimalen čas za rast kolonij najserij 24 ur. Občutljivost teh postopkov je močno odvisna od stopnje vnetja, načina odvzema in transporta kužnega vzorca (10).

Molekularne metode

Najnovejše identifikacijske metode so metode hibridizacije nukleinskih kislin, med katere spada tudi verižna reakcija s polimerazo (PCR). S temi metodami lahko ugotovimo v vzorcu že zelo majhno število molekul dednega materiala, zato lahko uspešno diagnosticiramo tudi dedni material že propadlih gonokokov. Roche Diagnostics Systems (Branchburg, N. J., ZDA) je za svoj PCR-test izdala tovarniške teste, ki kažejo po do sedaj opravljenih študijah 100% občutljivost in 99% specifičnost metode (10, 11).

Nizozemci van Looveren in sodelavci so dokazali visoko razločevalno sposobnost PCR-metode za določanje različnih sevov znotraj vrste *N. gonorrhoeae* (12).

Metoda PCR temelji na pomnoževanju odsekov dednega materiala s temperaturno obstojno DNA-polimerazo. Dejstvo, da lahko iz ene verige DNA v eni uri dobimo več kot milijon kopij (slika 4), je močno vplivalo na vsa področja raziskovanja v medicini, ki temeljijo na analizi nukleinskih kislin.

Teoretične osnove verižne reakcije s polimerazo

Za pomnoževanje določenega odseka genoma potrebujemo dva začetna oligonukleotida, kratki zaporedji nukleotidov, ki se spajata z nasproti ležečima vijačnicama tarčnega odseka DNA. Po vezavi na DNA sta usmerjena tako, da poteka sinteza nove DNA v prostoru med njima. Tako omejimo pomnoževanje DNA le na željen odsek.

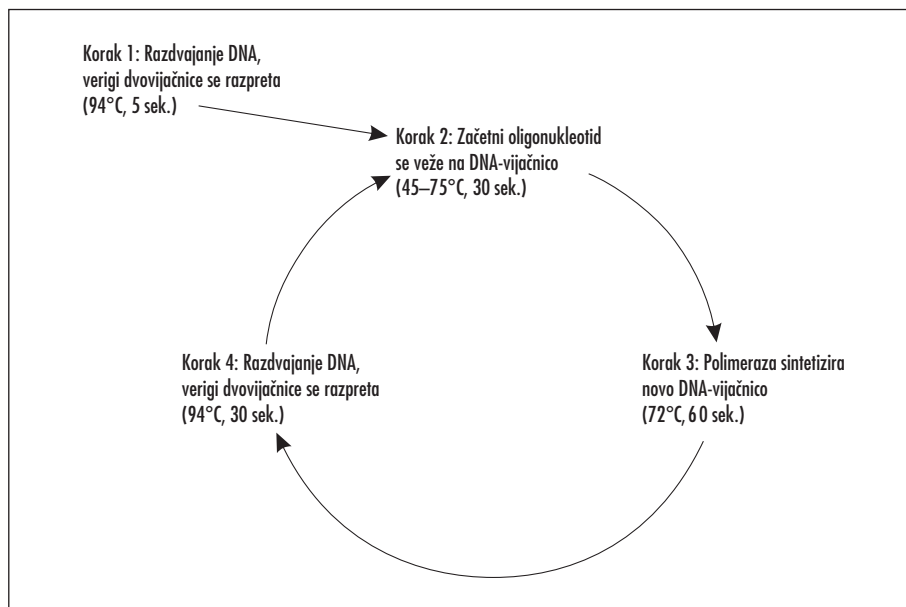
Najprej iz kliničnega vzorca izoliramo celotno DNA. Tej dodamo štiri osnovne gradnike nukleinskih kislin (deoksinukleotidtrifosfate), par začetnih oligonukleotidov, temperaturno obstojni encim DNA-polimerazo ter posebni prirejeni pufer. To izhodiščno

mešanico inkubiramo pri treh različnih temperaturah, kar imenujemo temperaturni cikel PCR.

Temperaturni cikel PCR delimo v štiri korake (slika 4):

1. Izhodiščno mešanico segrejemo na 95°C; takrat se DNA iz vzorca razdvoji in nastane dve enovijačni molekuli DNA.
2. Zmes ohladimo na primerno temperaturo med 45–75°C. Takrat se vzpostavijo vodikove vezi med začetnimi nukleotidi in verigo DNA. Za to spajanje je potrebnih 30 sekund.
3. Sledi podaljševanje začetnih oligonukleotidov oz. sinteza nove DNA-molekule od konca 5' proti 3'. Ta korak se največkrat odvija pri temperaturi 72°C in traja 2–5 minut.
4. Termostabilna DNA-polimeraza veže nukleotide do konca verige, na katero se je vezal začetni oligonukleotid. Nastane dvojna vijačnica DNA, ki je natančna kopija začetne vijačnice iz koraka 1 in je sposobna v novem ciklusu vezati enake začetne nukleotide.

Specifičnost metode je odvisna od izbire začetnega oligonukleotida. Pomnožil se bo vsak del DNA-verige, ki se nahaja med začet-



Slika 4. Temperaturni cikel v procesu verižne reakcije s polimerazo

nima oligonukleotidoma. Če je par začetnih oligonukleotidov komplementaren kakemu drugemu delu DNA v vzorcu, kot tistemu, ki ga iščemo, se bo pomnožil tudi ta del. Posledica tega je lahko lažno pozitiven rezultat in slabša specifičnost metode. Zato je zelo pomembna izbira pravilnega začetnega oligonukleotida, specifičnega le za DNA, ki jo iščemo (13, 14).

Epidemiologija

Gonokokna okužba se prenaša s spolnim stikom ali z neposrednim tesnim telesnim stikom. Kljub upadanju incidence gonoreje je to še vedno pomembna spolno prenosljiva bolezen, saj na svetu vsako leto zboli več kot 25 milijonov ljudi.

Pri nas je bila pojavnost gonoreje med drugo svetovno vojno velika, nakar je upadla in spet narasla ter dosegla svoj vrh okrog leta 1975. Od takrat naprej je le še upadala. Leta 1998 prijavljena letna pojavnost je bila 3,2/100.000 prebivalcev, a je v resnici najverjetneje večja. Temu botruje neredno prijavljanje, površna diagnostika in relativno pogosta uporaba antibiotikov (15–17).

Zdravljenje in preprečevanje okužbe

Zaradi širjenja sevov *N. gonorrhoeae*, odpornih proti penicilinu, so danes cefalosporini III. generacije zdravilo izbora za zdravljenje gonokoknih okužb (8, 10, 18). Za nezapletene gonokokne okužbe zadošča že en sam intramuskularna odmerek ceftriaksona. Alternativno lahko uporabljamo v enem odmerku tudi cefiksime, ciprofloksacin in ofloksacin. Ob sočasni okužbi z *Chlamydia trachomatis* se doda doksiciklin. Za nosečnice pride v poštev eritromicin (10, 19).

Za preprečevanje širjenja gonoreje je izrednega pomena zgodnje odkrivanje in zdravljenje boleznih, nadzor vseh bolnikovih spolnih partnerjev ter spodbujanje uporabe kondomov in zmanjševanja števila spolnih partnerjev.

NAMEN RAZISKAVE

Z raziskavami je potrjeno, da je mogoče z metodo PCR dokazati prisotnost gonokoka

v kužnini in zato so razvili standardiziran in avtomatiziran postopek dokaza genetskega bakterijskega materiala v kužninah.

Do sedaj je bilo v literaturi mogoče zaslediti le nekaj raziskav, ki bi dokazale uporabnost PCR-diagnostične metode v vsakdanji praksi in za potrebe presejalnih testov. Takih raziskav do sedaj v tem delu Evrope in v populaciji, ki ima podobne značilnosti, kot slovenska, še ni bilo izvedenih.

Namen naloge je bil ugotoviti in pokazati uporabnost postopka PCR v diagnostiki gonoreje v slovenskem prostoru. Želeli smo ugotoviti, ali je metoda PCR uporabna tudi za hitro identifikacijo gonokokov. Za ta namen smo uporabili standardizirani, avtomatizirani in komercialno dostopni PCR-test COBAS AMPLICOR.

Uporabnost PCR-testa smo preverili na treh testnih skupinah, na populaciji z domnevno visokim tveganjem za okužbo, v populaciji z domnevno nizkim tveganjem za okužbo ter na sevih različnih bakterijskih vrst iz rodu *Neisseriaceae* iz arhiva bakterijskih sevov Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani.

MATERIAL IN METODE DELA

Materiali

Zbrani material smo razvrstili v tri skupine. V skupino A smo uvrstili klinične vzorce, odvzete v skupini ljudi z domnevno velikim tveganjem za okužbo, zbrane v Ambulanti za spolno prenosljive bolezni Dermatovenerološke klinike Kliničnega centra v Ljubljani. Skupina B je predstavljala reprezentativen vzorec populacije študentov medicine, torej populacije z domnevno majhnim tveganjem za okužbo. V skupino C pa so bili uvrščeni sevi različnih bakterijskih vrst iz rodu *Neisseriaceae*.

Skupina A

Klinične vzorce smo zbirali v obdobju od maja 1998 do decembra 1998 in nabrali skupaj 113 vzorcev, od tega 51 vzorcev seča, 49 brisov sečnice in 13 brisov materničnega vratu. Vzorce so bili vzeti 54 osebam. Jemali so jih zdravniki specialisti dermatovenerologi. Za odvzem vzorcev smo se odločili, kadar so pri bolniku obstajali klinični znaki za uretritis.

Obenem smo vzeli tudi poseben bris za neposreden razmaz na objektniku, ki smo ga pobarvali z metilenskim modrilom. Pogoj za odvzem brisov je bil, da bolnik vsaj dve uri ni šel na vodo. Vzorce seča smo jemali po jemanju brisov.

Brise za klasično diagnostiko smo takoj po odvzemu nacepili na dve trdni gojišči, čokoladni agar in selektivno gojišče VCN, ter ju vložili v prenosno posodo. Vzorce za klasično diagnostiko in PCR-test smo jemali z ločenimi brisi.

Kužnino za PCR-diagnostiko, ki smo jo pošiljali v Laboratorij za molekularno mikrobiologijo Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo, smo označili le z zaporedno številko in ne z imenom bolnika ali s kliničnimi podatki. Tako v laboratoriju nismo mogli predvideti, v katerem vzorcu bi lahko bili gonokoki.

Skupina B

Za pridobitev vzorcev populacije z domnevno majhnim tveganjem smo na Medicinski fakulteti v Ljubljani zbrali naključnih 48 študentov prostovoljcev. Zbiranje smo organizirali v enem dnevu, ko je bilo na fakulteti največ študentov, in poprosili naključne prostovoljce za darovanje seča. Prostovoljecem smo razložili namen raziskave in nadaljnji potek obdelave vzorcev.

Prosili smo jih, da zberejo prvi curek seča (vsaj 4 ml) v sterilno posodico, ostali seč pa zavržejo. Vzorce smo označili le z zaporedno številko in tako ohranili anonimnost dajalcev.

Skupina C

Uporabnost testa COBAS AMPLICOR za razločevanje gonokokov od drugih vrst bakterij iz rodu *Neisseriaceae* smo ugotavljali na 31 sevih predhodno identificiranih bakterijskih vrst iz rodu najserij.

Tako smo uporabili zbirko najserij iz arhiva Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani. V njem je bilo zamrznjenih 10 sevov *N. gonorrhoeae*, 5 sevov *N. meningitidis*, 3 sevi *N. sicca*, 2 seva *N. mucosa*, 1 sev *N. lactamica* in 10 sevov *Moraxella catarrhalis*.

Bakterije smo odmrznili in jih nacepili na čokoladni agar. Ko so porasle prve kolonije,

smo jih še enkrat precepili na sveže gojišče. Iz teh kultur smo jemali vzorce za njihovo identifikacijo.

Metode dela

Dokaz gonokokov v razmazu izcedka iz sečnice

Na objektnik smo nanesti kužnino in jo fiksirali pod plamenom. Nato smo jo prelili z raztopino metilenskega modrila in barvali 3 minute. Preparat smo sprali z vodo, posušili in mikroskopirali z imerzijo pod 1000-kratno povečavo (20).

Odvzem in transport vzorcev za klasično mikrobiološko diagnostiko

S sterilnim brisom vzete vzorce kužnine iz sečnice in materničnega vratu smo nanesti na gojišča in objektno stekelce. Uporabljali smo dve vrsti gojišč.

Prvo gojišče je bil čokoladni agar, ki ga pripravljajo na Inštitutu za Mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani. Drugo gojišče je bilo že pripravljeno, in sicer selektivno – čokoladni agar z dodatkom vankomicina, kolistina in nistatina (VCN). Takoj po odvzemu smo gojišča zaprli v transportne posode GENbox, ki v eni uri povišajo koncentracijo CO₂ v posodi na 3–6%. Transportne posode smo še isti dan prenesli na Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, kjer smo nacepljena gojišča iz posod takoj prestavili v inkubator ogret, na temperaturo 36°C z atmosfero 5% CO₂ (21).

Odvzem in transport vzorcev za PCR-test

Vzorce kužnine, odvzete iz sečnice in materničnega vratu, smo jemali z brisi iz pripravljenega kompleta družbe Roche Diagnostics Systems (Branchburg, N. J., ZDA), AMPLICOR – SPB-komplet za odvzem in prenos kužnine (*STD swab specimen collection and transport kit*). Po odvzemu smo, po navodilih proizvajalca, dali bris v prenosno epruveto s prenašalnim medijem (0,13% TRIS pufer, 0,4% Na-dodecilsulfat – SDS), jo 15 sekund mešali na ročnem mešalcu, sam bris zavrgli in epruveto takoj zaprli. Vzorce smo še isti dan shranili za poznejše testiranje.

Za PCR-test smo jemali tudi vzorce urina in bolnikom razložili, da potrebujemo le prvi curek. Gonokoki se le narahlo držijo epitelijske sečnice in jih je zato največ v prvem izpirku sečnice. Vzorce, vzete za PCR-test, smo do izvedbe testov hranili pri -20°C .

Klasična diagnostika

Prinesena gojišča smo na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani inkubirali do 72 ur pri 36°C , visoki vlažnosti ter atmosferi s 5 % CO_2 . Vse kolonije, ki so imele morfološke značilnosti gonokokov (premer kolonije 1–3 mm, gladke, sivorumene barve, prosojne), smo namnožili v čisti kulturi in jih identificirali z ustreznimi testi (21).

Barvanje po Gramu

Pri barvanju po Gramu smo razmaz barvali z metilvioletnim barvilom 2 minuti, nato smo barvilo odlili, objektnik prelili z Lugolovo raztopino za 1,5 minute in jo nato odlili. Preparat smo zatem po kapljicah razbarvali s 3 % acetonskim alkoholom, ki je deloval 10 do 15 sekund. Pripravo preparata smo končali s spiranjem z navadno vodo in 30-sekundnim barvanjem s fuksinom. Na koncu smo še enkrat oprali preparat z navadno vodo, ga osušili in mikroskopirali z imerzijo pri 1000-kratni povečavi.

Pod mikroskopom vidimo *N. gonorrhoeae* kot rdeče (po Gramu negativne) diplokoke, podobne kavnemu zrnu. Ponavadi so gonokoki malenkost sploščeni in se stikajo drug z drugim vzdolž daljše osi. V mikroskopskih preparatih, ki so narejeni iz kužnine, odvzete bolnikom, ki imajo akutni gonokokni uretritis, so diplokoke v nevtrofilcih in le deloma izven njih.

Oksidazni test

Pri tem testu smo na košček filtrirnega papirja na predmetniku nakapljali nekaj kapljic oksidaznega reagenta, 1 % tetrametil p-fenilendiamina (Fluka Chemie, Buchs, Švica). S stekleno paličico smo prenesli del kolonije na filtrirni papir. Potemnitev filtrirnega papirja v času dveh minut smo imeli za pozitivno reakcijo za prisotnost oksidaze (20).

Test API NH

Test API NH je sistem desetih testnih trakov proizvajalca bioMerieux (Lyon, Francija) za dokazovanje različnih bakterijskih vrst rodu *Neisseriaceae* in *Haemophilus* ter za bakterijo *Moraxella catarrhalis*. Pri izvajanju teh testov smo se natančno držali navodil proizvajalca.

Več bakterijskih kolonij ene bakterijske vrste, ki smo jo testirali, smo vmešali v ampulo z 2 ml 0,85 % NaCl. V dobljeni bakterijski suspenziji smo najprej umerili kvantitativno vsebnost bakterij, saj je bila za nadaljnji test zahtevana potrebna gostota bakterij (0,5 po McFarlandu). Suspenzijo smo nato nanašali v epruvetke na testnih trakovih apiNH:

- po 50 μl v epruvetke 1–7 (od PEN do URE),
- po 150 μl v epruvetke 8–10 (od LIP/ProA do $\beta\text{GAL/IND}$).

V prvih sedem epruvetk smo do vrha nalili mineralno olje in jih skupaj z ostalimi tremi 2 uri inkubirali v aerobnih pogojih. V epruvetki 8 in 9 je bilo po inkubaciji treba dodati še kapljico reagenta ZYM B, v epruvetko 10 pa reagent JAMES. Rezultate teh testov smo tolmačili po navodilih proizvajalca.

Tabela 1 prikazuje številko testnega traku, njegovo oznako in reakcijo, ki poteka na traku. S testi 2–5 ugotavljamo fermentacijo različnih sladkorjev, s testom 10b pa prisotnost ali odsotnost indola, ki je razpadni produkt triptofana. Testi 8a–10a predstavljajo reakcijo pred dodatkom reagenta ZYM B in JAMES, testi 8b–10b pa po dodatku le-teh.

Tabela 1. Biokemični testi za razločevanje različnih vrst bakterij v rodu *Neisseriaceae*.

TEST	REAKCIJA
1 PEN	Penicilinoza
2 GLU	Glukoza
3 FRU	Fruktoza
4 MAL	Maltoza
5 SAC	Saharaza
6 ODC	Ornitin-dekarboksilaza
7 URE	Ureaza
8a LIP	Lipaza
9a PAL	Alkalna fosfataza
10a βGAL	Betagalaktosidaza
8b ProA	Prolinarilamidaza
9b GGT	Gamaglutariltransferaza
10b IND	Indol

Tabela 2. Razlikovanje različnih najserij s testom fermentacije sladkorjev.

	Glukoza	Maltoza	Saharaza	Fruktoza
<i>N. gonorrhoeae</i>	+	-	-	-
<i>N. meningitidis</i>	+	+	-	-
<i>M. catarrhalis</i>	-	-	-	-
<i>N. sicca</i>	+	+	+	-
<i>N. perflava</i>	+	+	+	+
<i>N. flava</i>	+	+	-	-
<i>N. subflava</i>	+	+	-	-
<i>N. flavescens</i>	-	-	-	-

N. gonorrhoeae spoznamo, ker ima pozitivna le testa 2 in 8b, vsi ostali testi pa so negativni. Ob gonokoku, ki je odporen za penicilin, je pozitiven tudi test 1, kar pomeni, da gonokok izdeluje penicilinazo.

V tabeli 2 so prikazani različni izvidi pri testu določene kolonije najserij na fermentacije različnih sladkorjev. Očitno je, da je razlika med fermentacijskimi sposobnostmi gonokoka in treh drugih najserij v enem samem sladkorju.

Verižna reakcija s polimerazo COBAS AMPLICOR

Avtomatizacija korakov tehnike PCR je močno olajšala in pospešila izvedbo te metode. Ena izmed naprav, ki omogočajo avtomatizacijo, je COBAS AMPLICOR (22).

Vzorke urina in brise kužnin smo za nadaljnjo obdelavo s COBAS AMPLICOR pripravili drugače.

Priprava vzorcev seča

V dvomililitrsko epruvetko iz polipropilena smo najprej dali 500 µl CT/NG dilucijskega pufrja ter dodali 500 µl urina. To smo temeljito premešali na ročnem mešalniku in inkubirali 15 min pri temperaturi 37°C. Zmes smo nato centrifugirali 5 minut pri 12.500 obratih ter odličili supernatant. S tem smo odstranili odvečne sestavine seča.

Dodali smo 250 µl CT/NG pufrja za lizo, dobro premešali na ročnem mešalniku in inkubirali 15 minut na sobni temperaturi. Zmes smo ponovno centrifugirali 10 minut pri 12.500 obratih. Odvzeli smo 50 µl supernatanta in ga prenesli v epruvete A, ki so prilagojene za nadaljnjo obdelavo v COBAS AMPLICOR termalnem inkubatorju (23).

Ostanek zmesi smo shranili pri 2-8°C do 7 dni za primer ponovnega testiranja. Ostanek urina smo zamrzili pri -20°C, če bi bilo potrebno ponovno testiranje.

Priprava brisov kužnine

V ambulantni smo brise kužnine, vzete za test s PCR, vmešali v prenosne pufre v posebnih transportnih epruvetah proizvajalca družbe Roche Diagnostics Systems (Branchburg, N. J., ZDA), AMPLICOR SPB-komplet za odvzem in prenos kužnine (STD swab specimen collection and transport kit).

V te epruvete smo nato v molekularnem laboratoriju dodali 1 ml CT/NG-razredčila za vzorce, temeljito premešali na ročnem mešalniku in inkubirali pri sobni temperaturi 10 minut. Tako pripravljene zmesi smo odvzeli 50 µl in jih prenesli v epruvete A za nadaljnje testiranje. Ostanek zmesi smo shranili pri 2-8°C do 4 dni, za primer ponovnega testiranja (23).

Potek testa COBAS AMPLICOR

V epruvete A smo dodali po 50 µl zmesi, pripravljene po zgoraj opisanih navodilih, in mešanico za pomnoževanje DNA (master mix). Ta vsebuje vse potrebno za nadaljnjo izvedbo PCR: tris HCl-raztopino, EDTA, KCl, glicerol, Na-azid, N-uracilglikozilazo, deoksiribonukleotide, termostabilno DNA-polimerazo in začetne oligonukleotide.

Epruvete smo vstavili v termalni inkubator na za to določena mesta in sledili navodilom proizvajalca. Za večjo varnost, zanesljivost rezultatov ter ugotovitev kontaminacije smo uporabili na vsakih 10 vzorcev tudi 1 pozitivno in 1 negativno kontrolo.

Naprava je sama odčitala vrednosti ekstinkcije po treh urah. Za negativni rezultat se šteje, če je izmerjena ekstinkcija manjša od +0,2, in za pozitiven, če je večja od +1,00. Meritev, ki dajo rezultat v vmesnem, sivem območju, ne moremo šteti za diagnostično zanesljive.

REZULTATI

Skupina A

V Ambulanti za spolno prenosljive bolezni Dermatovenerološke klinike KC Ljubljana smo vsem bolnikom, katerih napotna diagnoza je bila urethritis, odvzeli kužnino za preiskavo. Material smo odvzeli tudi bolnikom, ki so imeli znake drugih spolno prenosljivih bolezni in simptome uretritisa.

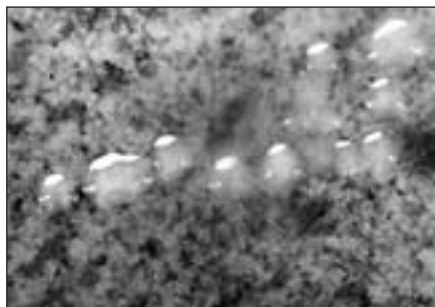
V času poteka študije smo 54 bolnikom odvzeli skupaj 113 različnih kliničnih materialov (tabela 3). Vzporedno z jemanjem brisov in pred jemanjem seča smo naredili razmaz kužnine in ga pobarvali z metilenskim modrilom.

Tabela 3. Odvzeti klinični vzorci.

Kužnina	Število vzetih vzorcev
Prvi curek seča	51
Bris sečnice	49
Bris materničnega vratu	13
Skupaj	113

V skupini A smo s klasično metodo kulture in identifikacije pri treh bolnikih izolirali *N. gonorrhoeae*. Prav tako smo pri vsakem od teh treh bolnikov iz kužnin ugotovili prisotnost gonokokov s PCR-metodo.

Prvi pozitiven bolnik je bil 45-letni moški z napotno diagnozo akutnega uretritisa z gnojnim izcedkom in s tveganim spolnim stikom v anamnezi. Pri razmazu brisa, pobarvanega z metilenskim modrilom, smo opazili značilne diplokoke v nevtrofilcih. Pri njem smo imeli za PCR-test le vzorec urina. Ekstinkcija vzorca v PCR-testu je bila večja od +4,00, kar pomeni, da je bil ugotovljen v urinu dedni material gonokoka. Pri njem smo osamili iz brisa uretre *N. gonorrhoeae* (slika 5).



Slika 5. Kultura *N. gonorrhoeae* na čokoladnem agarju.

Drugi pozitiven bolnik je bil 30-letni moški z napotno diagnozo akutnega uretritisa, pri katerem smo že v obarvanem razmazu z metilenskim modrilom ugotovili značilne diplokoke v nevtrofilcih v gnoju. Pri njem smo gonokok dokazali tudi v vzorcu urina in v brisu sečnice s PCR-metodo (ekstinkcija je bila več kot +4,00) in ga osamili iz brisa sečnice s klasično metodo.

Tretji bolnik je bil 34-letni moški, z napotno diagnozo specifičnega uretritisa in s tveganim spolnim stikom na potovanju v anamnezi. Pri tem bolniku je bil značilen obilen izcedek iz sečnice. Po obarvanju razmaza na objektniku z metilenskim modrilom smo opazili značilne diplokoke znotrajcelično in v sluzi. Tudi tukaj smo dobili vzorec urina in bris sečnice za PCR-test. Iz obeh kužnin je test pokazal ekstinkcijo več kot +4,00, kar pomeni, da je bil v kužnini prisoten genom gonokoka. Iz drugega brisa sečnice smo osamili bakterijo *N. gonorrhoeae* s klasično metodo.

Pri ostalih bolnikih, pri katerih z nobeno uporabljeno diagnostično metodo nismo ugotovili prisotnosti *N. gonorrhoeae*, že dermatovenerolog na kliničnem pregledu ni posumil na gonorejo. To je podkrepil tudi razmaz, obarvan z metilenskim modrilom na objektniku, v katerem nismo našli značilnih bakterijskih celic.

Skupina B

V tej skupini smo testirali 48 vzorcev urina s PCR-metodo, ki je pokazala, da v vzorcih ni bilo prisotnega genoma bakterije *N. gonorrhoeae*. Pri vseh vzorcih je bila vrednost ekstinkcije manjša od +0,2.

Skupina C

Iz zmrzjenih vzorcev iz arhiva smo s testom PCR na genom *N. gonorrhoeae* dobili naslednje rezultate, prikazane v tabeli 4.

Tabela 4. Rezultati testa verižne reakcije s polimerazo za *N. gonorrhoeae* na vzorcih iz arhiva bakterijskih sevov Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani.

Ime vrste	Skupno število vzorcev	Pozitivni rezultati (E* > +1,00)	Negativni rezultati (E* < +0,2)
<i>N. gonorrhoeae</i>	10	10	0
<i>N. meningitidis</i>	5	0	5
<i>N. sicca</i>	3	0	3
<i>N. mucosa</i>	2	0	2
<i>N. lactamica</i>	1	0	1
<i>M. catarrhalis</i>	10	0	10
Skupaj	31	10	21

* E pomeni ekstinkcijo zmerjeno s termalnim inkubatorskim sistemom COBAS AMPLICOR.

RAZPRAVA

V naši raziskavi smo 54 bolnikom odvzeli 113 kliničnih vzorcev in pri treh osebah v osmih kužninah (v 5 brisih sečnice in 3 vzorcih seča) dokazali gonokoke. Tem bolnikom smo že na pregledu pri dermatovenerologu postavili diagnozo gonoreje, ki smo jo potem potrdili še s klasično in PCR-diagnostiko.

V skupini B smo pregledovali le seč, saj smo predvidevali, da v tej populaciji ne bo okuženih z gonorejo. Če bi jemali tudi brise sečnice, bi odvzem vzorcev težko izvedli, saj je postopek jemanja brisov zamuden in predvsem neprijeten. Obenem bi po nepotrebnem povečali stroške, ki bi nastali z uporabo klasične bakteriološke diagnostike.

Molekularna diagnostika se je izkazala za zelo uporabno in bi jo bilo smiselno uporabiti v vsakdanji diagnostiki. Predvsem zato, ker se z istim testom lahko ugotavlja tudi prisotnost *Chlamydia trachomatis*, sčasoma pa bo proizvajalec dodal testu še možnost diagnostike nekaterih drugih spolno prenosljivih bolezni. Tako bo obstajal test, ki bo v urinu istočasno odkrival najbolj pogoste patogene genitourinarnega trakta iz enega samega vzorca za sprejemljivo ceno. Prednosti takega testiranja so zelo uporabne v ambulantah za spolno prenosljive bolezni (24).

Pozitivne lastnosti testa PCR

PCR-test se je izkazal kot zelo primeren za diagnostiko gonoreje, saj ima precej boljših lastnosti kot klasična metoda kultivacije in identifikacije.

Vzorec za ta test se lažje odvzame, saj je odvzem vzorca urina neinvaziven. Pri odvzemu urina pri ženskah se tako izognemo ginekološkemu pregledu, kar pregled počeni in omogoči odvzem kužnine tudi v splošni ambulanti.

Transport kužnine do laboratorija je enostaven, v plastični epruveti, ter nezahteven, saj ga ni treba inkubirati pri določeni temperaturi in v določeni atmosferi. Do testiranja lahko material počaka v zamrzovalniku ter ga ostane po testu dovolj za ponovno testiranje.

Metoda je zelo uporabna tudi zato, ker v enem postopku združi dokaz in identifikacijo gonokoka. Natančno razloči med gonokoki in drugimi vrstami najserij, ki odstopajo od standardnih lastnosti bakterijske vrste in jih ni moč s klasično metodo kultivacije in identifikacije razločiti od gonokokov.

Ta sposobnost testa je posebej uporabna pri razločevanju gonokoka in bakterij *N. meningitidis*, *N. flava* in *N. subflava*, ki so izgubile sposobnost fermentacije maltoze. Prvi je nujno patogen, druge tri pa se lahko nahajajo tudi v normalni flori genitourinarne poti. Teh bakterijskih sevov se s klasično diagnostiko ne da ločiti od gonokokov in pride lahko do lažno pozitivnih rezultatov.

Odkrivanje genetskega materiala gonokokov je uporabno tudi v primerih, ko klinična slika gonoreje ni jasna, na primer pri sekundarnih zapletih gonokokne okužbe, kot je metastatski artritis. Tedaj lahko iz sklepne tekočine hitro in enostavno ugotovimo prisotnost gonokoka.

Test PCR je zelo uporaben tudi kot presejalni test v določenih skupinah ljudi (npr. naborniki), saj je enostavno zbrati večje število vzorcev urina in jih s tem testom v kratkem času pregledati.

Že sedaj lahko s PCR-testom COBAS AMPLICOR vzporedno ugotavljamo prisotnost dveh bakterij v vzorcu, *N. gonorrhoeae* in *C. trachomatis*. To pomeni, da iz enega vzorca kužnine dobimo zanesljiv podatek o prisotnosti ali odsotnosti dveh pogostih povzročiteljev spolno prenosljivih bolezni za isto

ceno. Tako lahko to metodo uporabimo za presejalne teste v populaciji z nizkim tveganjem za okužbo (25).

Negativne lastnosti testa PCR

Ena pozitivnih lastnosti PCR-testa je obenem tudi njegova pomanjkljivost. S tem ko se naloga identifikacije bakterije prenese iz bakteriološkega laboratorija v molekularni, se preskoči tudi bakteriološko spremljanje evolucije gonokoka.

Potrebno je sprotno ugotavljanje pojava odpornosti na antibiotike in temu primerno svetovanje klinične uporabe antibiotikov. Molekularna analiza prav tako ne more spremljati fizioloških in morfoloških sprememb bakterije.

Obenem lahko pride do lažno pozitivnih rezultatov zaradi izjemne natančnosti testa. Genetski material gonokokov se lahko odkrije tudi pri bolniku, ki se je že prej ustrezno zdravil in pri katerem je bil odvzet klinični material, ki je vseboval DNA že mrtvih gonokokov.

ZAKLJUČKI

Test COBAS AMPLICOR je uporaben v vsakodnevni diagnostiki gonoreje. Ravno tako je uporaben kot presejalni test za širšo populacijo.

Vzorec seča testiran s testom PCR, je diagnostično enakovreden brisu sečnice, testiranim s klasično mikrobiološko diagnostiko, istočasno pa ga je mogoče mnogo bolj enostavno in hitreje odvzeti.

Jemanje vzorcev seča je diagnostično enakovredno jemanju brisov sečnice pri diagnostiki s testom PCR.

Jemanje prvega curka urina kot kužnine je neinvazivna in najenostavnejša metoda pridobitve kliničnega materiala za diagnostiko gonoreje. Tak način jemanja vzorcev omogoči tudi pregled večjih skupin ljudi in epidemiološke študije.

Uporabnost testa PCR je predvsem v enostavnem načinu odvzema kužnine, preprostem prenosu kužnine do molekularnega laboratorija ter hitrem, zanesljivem in zmogljivem testiranju.

ZAHVALA

Za pomoč pri izvedbi naloge sva dolžna zahvalo najinemu mentorju doc. dr. Mariu Poljaku, dr. med., za voljo in pogum pri zamišljanju in popravljanju najinega dela in vztrajanju pri delu z nama. Gotovo je, da brez njegovih zamisli in moči, da nama prenese čudež pisanja strokovnih besedil, ta naloga ne bi ugledala luči sveta.

Ravno tako gre zahvala somentorjema as. mag. Marku Potočniku, dr. med., dr. stom., za pomoč in družbo pri nabiranju vzorcev in asist. dr. Katji Seme, dr. med., za pomoč pri pisanju besedila naloge.

Zahvalila bi se rada tudi laborantom v molekularnem in v bakteriološkem laboratoriju za pomoč in nasvete pri izvedbi diagnostičnih postopkov, prof. dr. Mariji Gubini, dr. med., za moralno podporo in nasvete pri pisanju naloge.

Zahvala gre tudi prostovoljcem, ki so sodelovali v raziskavi, in osebju ambulate I. na Dermatovenerološki kliniki KC Ljubljana.

LITERATURA

1. Iglewski BH, Clark VL. The bacteria: molecular basis of bacterial pathogenesis. London: Acad Pr; 1990. pp. 125–9.
2. Greenwood D, Slack RCB, Peutherer JF. Medical microbiology: a guide to microbial infections: pathogenesis, immunity, laboratory diagnosis and control. New York: Churchill Livingstone; 1995. pp. 293–303.
3. Betetto M, Fettich J. Mala dermatovenerologija. Ljubljana: Mihelač; 1993. pp. 297–303.
4. Handsfield HH. Color atlas and synopsis of sexually transmitted diseases. New York: McGraw-Hill; 1992. pp. 10–23.
5. Stražar K. Pregled antimikrobne rezistence pri gonokokih [Raziskovalna naloga]. Ljubljana: Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani; 1994.
6. Kovač J. Študij občutljivosti *Neisseriae gonorrhoeae* za penicilin [Raziskovalna naloga]. Ljubljana: Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani; 1990.
7. Joklik WK, Willet HP, Amos DB, Wilfert CH. Zinsser microbiology. Norwalk: Appleton; 1998. pp. 384–91.
8. Skinner FA, Walker PD, Smith H. Gonorrhoea. Epidemiology and pathogenesis. FEMS symposium No. 2. London: Acad Pr; 1977.
9. Newhall WJ, Jones RB. *Neisseria gonorrhoeae*. In: Kohler RB. Antigen detection to diagnose bacterial infections. Vol II. Boca Raton: CRC Pr; 1986. pp. 67–75.

10. Jephcott AE. Microbiological diagnosis of gonorrhoea. *Genitourin Med* 1997; 73: 245–52.
11. Jungkind D, DiRenzo S, Beavis KG, Silverman NS. Evaluation of automated COBAS AMPLICOR PCR system for detection of several infectious agents and its impact on laboratory management. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 2778–83.
12. Looveren van M, Ison CA, Ieve M, Vandamme P, Martin IM, Vermeulen K, et al. Evaluation of the discriminatory power of typing methods for *Neisseria gonorrhoeae*. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 2183–8.
13. Farrell DJ. Evaluation of AMPLICOR *Neisseria gonorrhoeae* PCR using cppB nested PCR and 16S rRNA PCR. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 386–90.
14. Poljak M, Avšič-Županc T, Seme K. Verižna reakcija s polimerazo – nova raziskovalna in diagnostična metoda v virologiji. *Med Razgl* 1994; 33: 379–400.
15. Wistreich GA. Microbiology laboratory: fundamentals and applications. New Jersey: Prentice Hall; 1997. pp. 655–7.
16. Potočnik M. Sifilis in gonoreja danes. *Zdrav Vestn* 1995; 64: 207–10.
17. Kraigher A, Hočevar-Grom A, Klavs I, et al. Epidemiološko spremljanje nalezljivih bolezní v Sloveniji v letu 1998. *Zdrav Vestn* 1999; 68: 40–1.
18. Reese RE, Betts RF. A practical approach to infectious diseases. Boston: Little; 1991. pp. 394.
19. Anon. Morbidity and mortality weekly report. CDC 1993; 14: 56–7.
20. Andlovic A, Avšič-Zupanc T, Gubina M, et al. Praktikum mikrobiologije in imunologije. Ljubljana: Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo; 1999. pp. 23–126.
21. Anon. OXOID: Selective microbiology for the clinical laboratory. Hampshire: Unipath Ltd; 1991. pp. 35–8.
22. DiDomenico N, Link H, Knobel R, Caratsch T, Wescheler W, Loewy GZ, Rosenstraus M. COBAS AMPLICOR: fully automated RNA and DNA amplification and detection system for routine diagnostic PCR. *Clin Chem* 1996; 42: 1915–23.
23. Anon. COBAS AMPLICOR training manual. Ontario: Roche Diagnostic Systems; 1996. pp. 15–20/36.
24. Crotchfelt KA, Welsch LE, DeBonville D, Rosenstraus M, Quinn TC. Detection of *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* in genitourinary specimens from men and women by coamplification PCR assay. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 1536–40.
25. Bassiri M, Mardh PA, Domeika M. Multiplex AMPLICOR PCR screening for *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in women attending non-sexually transmitted disease clinics. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 2556–60.

Prispelo 26. 10. 2000