



**6. BANIČEVI DNEVI:
OKUŽBE SPOLOVIL IN SPOLNO
PRENOSLJIVE BOLEZNI**

6. Baničevi dnevi: Okužbe spolovil in spolno prenosljive bolezni

- 5 Epidemiologija spolno prenesenih okužb v Sloveniji / Epidemiology of Sexually Transmitted Infections in Slovenia – Irena Klavs, Tanja Kustec
- 19 Spolno vedenje Slovencev: rezultati nacionalne presečne raziskave / Sexual Behaviour of Slovenians: the Results of a National Survey – Irena Klavs
- 29 Sodoben pristop k diagnostični obravnavi bolnikov s spolno prenosljivo okužbo v vsakodnevni klinični praksi: smo v Sloveniji na pravi poti? / A Modern Approach to Diagnostic Management of Sexually Transmitted Infections under Daily Clinical Conditions: Experiences from Slovenia – Mojca Matičič
- 41 Pregled metod za ugotavljanje urogenitalnih okužb z bakterijo *Chlamydia trachomatis* in prikaz obsega testiranja v slovenskih mikrobioloških laboratorijih v obdobju 2009–2013 / An Overview of Methods Suitable for Diagnosis of Urogenital *Chlamydia trachomatis* Infection and the Assessment of *Chlamydia trachomatis* Detection in Slovenian Microbiological Laboratories in the Period 2009–2013 – Andrej Golle, Darja Keše, Irena Klavs, Petra Deželak, Barbara Zdolšek, Iztok Štrumbelj, Anamarija Juriševič-Dodič, Mateja Ravnik, Jerneja Fišer, Ljudmila Sarjanovič, Cimerman Mojca
- 53 Uporabnost metode multipleks PCR za molekularno diagnostiko spolno prenosljivih okužb / The use of Multiplex PCR for Molecular Diagnostic of Sexually Transmitted Infections – Darja Duh, Mojca Cimerman, Andrej Golle
- 61 Odpornost gonokokov proti antibiotikom v Sloveniji, 2006–2013 / Antimicrobial Resistance of Gonococci in Slovenia, 2006–2013 – Samo Jeverica, Urša Dolinar, Andrej Golle, Andrej Rojnik, Vinko Božanič, Martina Kavčič, Helena Ribič, Iztok Štrumbelj, Marko Potočnik, Tomi Bremec, Andreja Murnik Rauh, Boštjan Mlakar, Miha Lobnik, Irena Klavs, Tanja Kustec, Mojca Matičič
- 69 Klinični pomen bakterije *Gardnerella vaginalis*, izolirane iz genitalnih vzorcev / The Clinical Significance of Bacteria *Gardnerella vaginalis* Isolated from the Genital Specimens – Irena Grmek Košnik, Urška Dermota, Helena Ribič, Martina Kavčič, Ljudmila Sarjanovič, Andrej Golle
- 75 Osamitev bakterije *Streptococcus agalactiae* pri bolnicah s simptomi vnetja nožnice / Isolation of *Streptococcus agalactiae* from Women Diagnosed with Vaginitis – Andrej Golle, Slavica Lorenčič Robnik, Sarah Dobnik, Iztok Takač
- 83 Urogenitalne mikoplazme pregledno in prikaz primera izvengitalne okužbe z bakterijo *Mycoplasma hominis* – A Review of Urogenital Mycoplasmas and a Case Report of an Extragenital *Mycoplasma hominis* Infection – Darja Keše, Slavica Lorenčič Robnik, Nina Gorišek Miksić, Rok Kogoj, Gorazd Košir
- 93 Kliničen pomen ureaplazem pri osebah z okužbo spodnjega urogenitalnega trakta: rezultati slovenske raziskave – Clinical Role of Ureaplasmas in Persons with Lower Urogenital Tract Infection: the Results of the Slovenian Study – Maruška Marovt, Darja Keše, Tadeja Kotar, Nina Kmet, Mojca Matičič
- 99 *Trichomonas vaginalis*: zapostavljen povzročitelj spolno prenosljivih bolezni? / *Trichomonas vaginalis*: a Neglected Sexually Transmitted Pathogen? – Miha Skvarč, Mojca Matičič, Barbara Šoba

- 109 Glive in vnetje nožnice / Yeast Infection of the Vagina – Andraž Dovnik, Andrej Golle, Dušan Novak, Darja Arko, Iztok Takač
- 115 Prostatitis kot spolno prenosljiva bolezen: pristop k diagnostiki in zdravljenju / Prostatitis as a Sexually Transmitted Disease: an Approach to Diagnosis and Treatment – Jerneja Videčnik Zorman, Mojca Matičič, Samo Jeverica, Tomaž Smrkolj
- 123 Diagnostika in epidemiologija genitalnih okužb, povzročenih z virusom herpesa simpleksa 1 in 2 / Diagnosis and Epidemiology of Herpes simplex 1 and 2 Genital Infections – Miroslav Petrovec, Urška Glinšek Biškup, Tina Uršič
- 133 Okužbe anogenitalnega predela z virusom varičela zoster / Varicella-zoster Virus in the Anogenital Region – Darja Duh, Simona Senegačnik, Andrej Golle, Mojca Cimerman
- 139 Diagnostika okužbe s HIV in virološko spremljanje bolnikov v letu 2014 / Laboratory Diagnosis of HIV Infection and Virological Monitoring of Patients in 2014 – Mario Poljak, Maja M. Lunar
- 147 Molekularna epidemiologija okužbe s HIV v Sloveniji / Molecular Epidemiology of HIV Infection in Slovenia – Maja M. Lunar, Jana Mlakar, Ana B. Abecasis, Anne-Mieke Vandamme, Janez Tomažič, Primož Karner, Tomaž Vovko, Blaž Pečavar, Gabriele Volčanšek, Mario Poljak
- 153 Zdravljenje okužbe s humanim virusom imunske pomanjkljivosti v letu 2014 / Treatment of Human Immunodeficiency Virus Infection in 2014 – Tomaž Vovko, Janez Tomažič
- 159 Sifilis – pregled diagnostike / Syphilis Diagnostics: An Overview – Marko Potočnik, Saša Simčič
- 169 Mikrobiološka diagnostika nevrosifilisa v Sloveniji / Microbiological Diagnostics of Neurosyphilis in Slovenia – Helena Blasizzo, Saša Simčič, Andreja Saje, Marko Potočnik, Janez Tomažič
- 177 Okužbe z virusi hepatitisa pri slovenskih s HIV okuženih bolnikih / Hepatitis Virus Infections Among Patients with HIV Infection in Slovenia – Mateja Škamperle, Katja Seme, Kristina Fujs Komloš, Janez Tomažič, Mojca Matičič, Maja M. Lunar, Mario Poljak
- 183 Pregled raziskav človeških papilomavirusov v Sloveniji 2012–2014 / A Review of Human Papillomavirus Research in Slovenia: 2012–2014 – Mario Poljak, Boštjan J. Kocjan, Polona J. Maver Vodičar, Katja Seme, Kristina Fujs Komloš, Mateja M. Jelen, Lea Hošnjak, Anja Oštrbenk
- 201 Odkrivanje in opredeljevanje novih papilomavirusov in pregled v Sloveniji odkritih genotipov / Identification and Characterisation of Novel Papillomaviruses in Slovenia – Boštjan J. Kocjan, Mario Poljak
- 213 Benigne in maligne novotvorbe ženskih spolovil, povezane z okužbo s človeškimi papilomavirusi / Benign and Malignant Lesions of the Female Genital Tract caused by Human Papillomavirus Infection – Nina Jančar
- 221 S človeškim papilomavirusom povezane benigne in maligne spremembe moškega spolovila in zadnjika / Human Papillomavirus-Related Benign and Malignant Conditions of Male Genitals and Anus – Vesna Tlaker Žunter, Pavle Košorok, Matic Bunič, Nina Sojar Košorok
- 227 Razporeditev genotipov pri s človeškim papilomavirusom povezanih benignih in malignih novotvorbah v Sloveniji / Genotype Distribution in Human Papillomavirus-Related Benign and Malignant Tumours in Slovenia – Kristina Fujs Komloš, Boštjan J. Kocjan, Polona J. Maver Vodičar, Lea Hošnjak, Nina Gale, Boštjan Luzar, Nina Jančar, Mario Poljak
- 235 Molekularna epidemiologija izbranih klinično pomembnih genotipov človeških papilomavirusov / Molecular Epidemiology of Selected Clinically Important Human Papillomavirus Genotypes – Mateja M. Jelen, Boštjan J. Kocjan, Polona J. Maver Vodičar, Lea Hošnjak, Nina Jančar, Mario Poljak
- 243 Kdaj in zakaj uporabljamo HPV test? / When and Why Are We Using the HPV Test? – Mario Poljak, Anja Oštrbenk
- 249 Državni presejalni program za raka materničnega vratu ZORA: zgodba o uspehu / National Cervical Cancer Screening Program ZORA: A Story of Success – Maja Primic Žakelj, Urška Ivanuš
- 257 Cepljenje proti okužbam s človeškim papilomavirusom / Vaccination Against HPV Infections – Veronika Učakar, Marta Grgič Vitek

Predgovor

Letošnje dvodnevno strokovno srečanje Sekcije za klinično mikrobiologijo in bolnišnične okužbe je že 6. po vrsti poimenovano po prof. dr. Stanku Baniču, enem od utemeljitev moderne slovenske medicinske mikrobiologije, neutrudnem raziskovalcu in učitelju številnih generacij slovenskih zdravnikov in mikrobiologov. Tokratno srečanje smo posvetili obravnavi okužb spolovil in okužb, ki se prenašajo s spolnimi odnosi. Ker slednje v Sloveniji predstavljajo veliko breme, smo uvodna predavanja posvetili epidemiološki situaciji spolno prenosljivih okužb v Sloveniji. Za ustrezno zdravljenje in preprečevanje zapletov je bistvena pravočasna spoznava in zdravljenje spolno prenosljivih okužb. Pomemben del naših predavanj smo tako namenili seznanjanju s sodobno diagnostiko spolno prenosljivih okužb in okužb spolovil.

Posebej smo predstavili redke oz. spregledane okužbe, kot so okužbe z bakterijo *Treponema pallidum* in parazitom *Trichomonas vaginalis*. Zanimiv sklop prispevkov obravnava okužbe spolovil, za katere menimo, da se ne prenašajo spolno. Pogosto gre tukaj za težave, ki so povezane s spremembo normalne bakterijske flore nožnice in predstavljajo pomemben dejavnik obolenosti pri ženskah.

Med virusnimi spolno prenosljivimi okužbami bomo obravnavali okužbe z virusi iz skupine človeških papilomavirusov, herpesvirusov in okužbe z virusom HIV. Širši sklop predavanj smo namenili najpogostejši spolno prenosljivi okužbi, to je okužbi s človeškimi papilomavirusi. Te okužbe so pogosto povezane z nastankom benignih in malignih novotvorb. Kot pri nekaterih drugih spolno prenosljivih okužbah so tudi tu znani ukrepi, s katerimi lahko okužbo zgodaj prepoznamo in z ustreznim ukrepanjem preprečimo nastanek zapletov. To smo prikazali na primeru državnega presejalnega programa za raka materničnega vratu ZORA.

Organizatorji 6. Baničevih dnevov upamo in želimo, da bodo na srečanju predstavljeni prispevki udeležencem v spodbudo za razpravo, bralcu, ki se srečuje s problematiko okužb spolovil in spolno prenosljivih bolezni, pa koristen vir informacij.

Osebno in v imenu organizatorjev srečanja – Sekcije za klinično mikrobiologijo in bolnišnične okužbe Slovenskega zdravniškega društva in Nacionalnega laboratorija za zdravje, okolje in hrano – se zahvaljujem avtorjem strokovnih prispevkov za sodelovanje, recenzentom za njihovo strokovno in natančno delo ter sodelavcem Medicinskih razgledov za pripravo zbornika. Zahvaljujem se tudi vsem sponzorjem, ki so finančno podprli izvedbo srečanja in izdajo zbornika.

Andrej Golle

Irena Klavs¹, Tanja Kustec²

Epidemiologija spolno prenesenih okužb v Sloveniji

Epidemiology of Sexually Transmitted Infections in Slovenia

Financiranje:

Epidemiološko spremljanje okužbe s HIV in drugih spolno prenesenih okužb v Sloveniji koordinira Nacionalni inštitut za javno zdravje (NIJZ), ki ga financira Ministrstvo za zdravje (MZ) in Zavod za zdravstveno zavarovanje Slovenije (ZZZS). Nacionalna raziskava »Življenjski slog, stališča, zdravje in spolnost« je bila izvedena s sredstvi NIJZ ob sofinanciranju MZ, Ministrstva za visoko šolstvo, znanost in tehnologijo, Slovenske agencije za raziskovanje in razvoj, Mestne občine Ljubljana, ZZZS, Merc & Dohme Idea Inc., Roche Diagnostics, Krke in Leka. Merc & Dohme Idea Inc., Roche Diagnostics, Krka in Lek niso imeli nobenega vpliva na pripravo protokola raziskave, analize zbranih podatkov in pripravo objav. Nacionalna raziskava »Opozorilno epidemiološko spremljanje okužb s humanimi virusi papiloma (HPV) med ženskami, vključenimi v Državni program ZORA« je bila izvedena s sredstvi NIJZ in Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani ob sofinanciranju Abbott Molecular, Swedish Cancer Society in Swedish Research Council. Abbott Molecular ni sodeloval pri načrtovanju in izvedbi raziskave niti pri analizah in interpretaciji rezultatov ter pripravi člankov.

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: HIV, spolno prenesene okužbe, epidemiološko spremljanje, spolno vedenje, presečna raziskava, Slovenija

IZHODIŠČA. Želeli smo predstaviti rezultate epidemiološkega spremljanja okužbe s HIV in drugih spolno prenesenih okužb (SPO) in povzeti rezultate dveh nacionalnih raziskav. **METODE.** Epidemiološko spremljanje okužbe s HIV in drugih SPO temelji na prijavi prepoznanih primerov in spremljanju spreminjanja prevalece okužbe s HIV ter izbranih vedenjskih kazalnikov v nekaterih skupinah. V verjetnostnem vzorcu prebivalcev smo zbrali podatke o spolnem vedenju in vzorce urina za določitev pogostosti klamidijske okužbe. V priložnostnem vzorcu žensk smo zbrali brise materničnega vratu in vzorce krvi za določitev pogostosti okužbe s humanimi papilomskimi virusi (HPV). **REZULTATI.** V obdobju zadnjih desetih let (2004–2013) so se letne prijavne incidence (/100.000 prebivalcev) diagnoz okužbe s HIV, klamidijske okužbe, gonoreje, zgodnjega sifilisa in genitalnih bradavic gibale med 1,2 in 2,7; 6,6 in 26,8; 1,2 in 3,0; 0,7 in 3,8 ter 6,0 in 22,6. S HIV je predvidoma okužena manj kot 1 oseba/1.000 prebivalcev.

¹ Izr. prof. dr. Irena Klavs, dr. med., Center za nalezljive bolezni, Nacionalni inštitut za javno zdravje, Trubarjeva ulica 2, 1000 Ljubljana; irena.klavs@nijz.si

² Tanja Kustec, uni. dipl. soc., Center za nalezljive bolezni, Nacionalni inštitut za javno zdravje, Trubarjeva ulica 2, 1000 Ljubljana

S klamidijsko okužbo je bilo leta 2001 okuženih 1,6 % žensk in 3,0 % moških. S HPV je bila v življenju okužena več kot polovica žensk. Moški, ki imajo spolne odnose z moškimi (MSM), imajo nesorazmerno visoko breme okužb s HIV, gonoreje in sifilisa. Spolno vedenje Slovencev je relativno nizko tvegano. V obdobju zadnjih desetih let ni prišlo do izrazitega povečanja tvegane vedenja med MSM in injicirajočimi uživalci drog. ZAKLJUČKI. Okužba s HIV in druge SPO v Sloveniji predstavljajo relativno veliko breme. Epidemiološko spremljanje bi lahko izboljšali z laboratorijskim epidemiološkim spremljanjem in dopolnili s pogostejšimi nacionalnimi presečnimi raziskavami. Poučno preprečevanje in obvladovanje okužbe s HIV in drugih SPO v okviru promocije spolnega in reproduktivnega zdravja je pomembna javnozdravstvena prednost.

ABSTRACT

KEY WORDS: HIV, sexually transmitted infections, surveillance, sexual behaviour, cross-sectional study, Slovenia

BACKGROUND. Our objective was to present HIV and other sexually transmitted infections (STI) surveillance results as well as the results of two national surveys. METHODS. HIV and other STI surveillance is based on notification of diagnosed cases and monitoring of changes of HIV prevalence and selected behavioural indicators in certain groups. In a probability sample of the general population, we collected data on sexual behaviour and urine specimens to estimate the prevalence of chlamydial infection. In a convenience sample of women, we collected cervical smear specimens and blood specimens to estimate the prevalence of infections with human papillomaviruses (HPV). RESULTS. During the last ten years (2004–2013), annually reported incidence rates (/100.000 population) of diagnosed cases of HIV, chlamydia, gonorrhoea, early syphilis and genital warts ranged between 1.2–2.7, 6.6–26.8, 1.2–3.0, 0.7–3.8 and 6.0–22.6, respectively. There is less than one HIV infected individual/1,000 population. In 2001, chlamydial infection was present in 1.6 % of women and 3.0 % of men. More than half of women were already infected with HPV. Men who have sex with men (MSM) have a disproportionately high burden of HIV, gonorrhoea and syphilis infection. Sexual behaviour of Slovenians is of a relatively low risk. During the last ten years, there was no drastic increase in high-risk sexual behaviour among MSM and injecting drug users. CONCLUSIONS. HIV and other STI represent a relatively high burden. Surveillance could be improved with laboratory surveillance and supplemented with more frequent national surveys. Informed prevention and control of HIV and STI within sexual and reproductive health promotion is an important public health priority.

IZHODIŠČA

Zanesljivi podatki o pogostosti okužbe s HIV in drugih spolno prenesenih okužb (SPO), spreminjanju njihove pogostosti in dejavnih tveganja so pomembni za poučeno oblikovanje slovenske politike in strategije promocije spolnega in repro-

duktivnega zdravja. Na Nacionalnem inštitutu za javno zdravje (NIJZ) koordiniramo epidemiološko spremljanje okužbe s HIV in drugih SPO. Za dober vpogled v spolno vedenje prebivalcev Slovenije in resnično pogostost dveh SPO, okužbe z bakterijo *Chlamydia trachomatis* (klami-

dijske okužbe) in okužbe s humanimi papilomskimi virusi (HPV) smo izvedli dve nacionalni presečni raziskavi.

Rezultate epidemiološkega spremljanja okužbe s HIV in nekaterih SPO (okužba z bakterijo *C. trachomatis*, gonoreja, sifilis, genitalne bradavice) redno objavljamo na spletnih straneh NIJZ v obliki letnih poročil in občasno tudi v medicinskih revijah (1-4). Številne rezultate iz obeh nacionalnih presečnih raziskav smo objavili v medicinskih revijah (5-14).

V prispevku so na kratko povzete metode epidemiološkega spremljanja okužbe s HIV in izbranih SPO v Sloveniji in najpomembnejši rezultati. Povzeti so tudi najpomembnejši rezultati obeh omenjenih nacionalnih presečnih raziskav.

METODE

Epidemiološko spremljanje

Epidemiološko spremljanje okužbe s HIV in SPO poteka v skladu z Zakonom o nalezljivih boleznih, Zakonom o podatkovnih zbirkah v zdravstvu, s predpisi Evropske skupnosti (angl. *European Union, EU*) ter strokovnimi smernicami mednarodnih organizacij, predvsem Evropskega centra za preprečevanje in obvladovanje bolezni (angl. *European Centre for Disease Prevention and Control, ECDC*) in Svetovne zdravstvene organizacije (angl. *World Health Organisation, WHO*) (15-21). Temelji na (1-3, 22-26):

- rednem zbiranju, analiziranju in interpretiranju podatkov o prepoznanih primerih okužbe s HIV in drugih SPO,
- zbiranju podatkov o obsegu diagnostičnega testiranja na okužbo s HIV in bakterijo *C. trachomatis*,
- spremljanju spreminjanja deleža okuženih s HIV s ponavljanjem presečnih raziskav in nevezanim anonimnim testiranjem v priložnostnih vzorcih štirih skupin (moških, ki imajo spolne odnose z moškimi (MSM), bolnikov s SPO, injicirajočih uživalcev prepoveda-

nih drog (IUD) in nosečnic) in

- spremljanju kazalnikov tveganih vedenj s ponavljanjem presečnih raziskav v majhnih priložnostnih vzorcih dveh skupin z visoko tveganim vedenjem (MSM in IUD).

Podatke o prijavljenih primerih okužbe s HIV in drugih SPO posredujemo ECDC, WHO in drugim mednarodnim deležnikom (24-26).

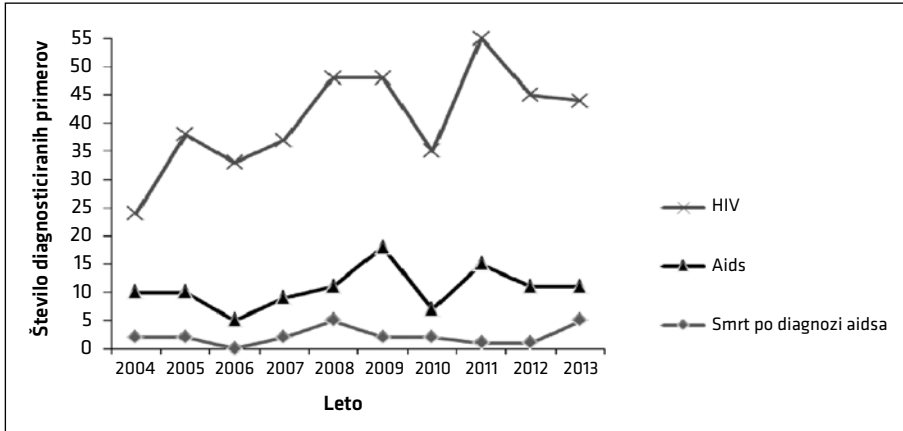
Nacionalni raziskavi

Objavili smo podrobne metode obeh nacionalnih presečnih raziskav »Življenjski slog, stališča, zdravje in spolnost« in »Opozorilno epidemiološko spremljanje okužb s humanimi virusi papiloma (HPV) med ženskami, vključenimi v Državni program ZORA« (12-14, 27-31). Na kratko, v prvi smo v verjetnostnem vzorcu slovenskega prebivalstva v starosti 18-49 let zbirali podatke o spolnem vedenju s kombinacijo anketiranja in anonimnega samoizpolnjevanja vprašalnikov z bolj občutljivimi vprašanji. Vse sodelujoče smo tudi prosili za prvi curek urina za testiranje na klamidijsko okužbo. V drugi smo v velikem priložnostnem vzorcu žensk, presejanih na raka materničnega vratu, zbirali brise materničnega vratu za testiranje na okužbo z nekaterimi genotipi HPV in vzorce krvi za testiranje na protitelesa proti nekaterim genotipom HPV. Za izvedbo obeh raziskav smo pridobili soglasje Komisije za medicinsko etiko pri Ministrstvu za zdravje.

REZULTATI

Epidemiološko spremljanje

Podrobni rezultati epidemiološkega spremljanja okužbe s HIV so objavljeni (1). V obdobju zadnjih desetih let (2004-2013) se je letna prijavna incidenca novih diagnoz okužbe s HIV gibala med 12,0/1.000.000 prebivalcev in 26,8/1.000.000 prebivalcev (slika 1).

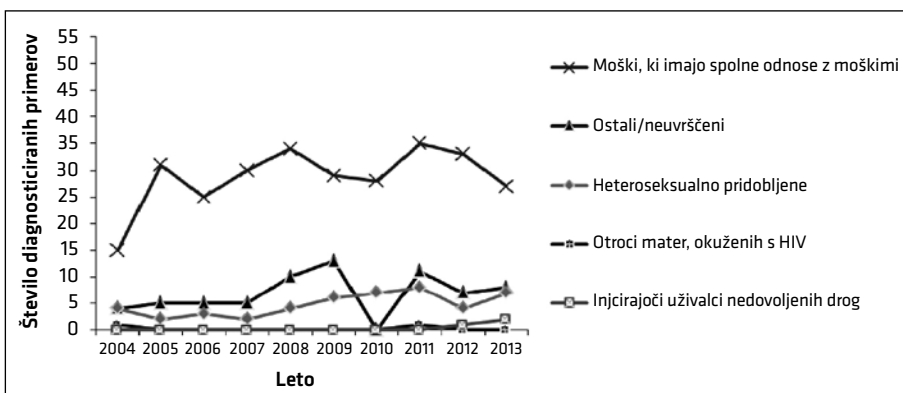


Slika 1. Diagnosticirani primeri okužbe s HIV, aidsa in smrti po diagnozi aidsa, Slovenija, 2004–2013.

Povečano število prijavljenih diagnoz okužbe s HIV po letu 2004 je bilo predvsem posledica porasta primerov med MSM (slika 2).

V obdobju zadnjih desetih let (2004–2013) se je število diagnostičnih testiranj na okužbo s HIV gibalo med 1,1/100 prebivalcev in 1,9/100 prebivalcev, kar so relativno nizke stopnje diagnostičnega testiranja. Zaradi visokega deleža (preko 50 %) poznih diagnoz okužbe s HIV (ko bi okuženi že morali biti zdravljeni), predvsem med MSM, zamujamo številne priložnosti za uspešnejše zgodnje zdravljenje in preprečevanje novih okužb.

Tabela 1 prikazuje podatke iz leta 2013, zbrane zbrane z nezanim anonimnim testiranjem za namene epidemiološkega spremljanja okužbe s HIV. Čeprav število okuženih s HIV narašča, je predvidoma okužena še vedno manj kot ena oseba na 1.000 prebivalcev, saj delež okuženih nosečnic, ki v grobem odraža delež okuženega splošnega prebivalstva v rodni starosti, ostaja relativno nizek. MSM so najbolj prizadeta skupina. Delež okuženih je relativno visok tudi med bolniki s SPO, med katerimi je visok delež MSM. Med IUD se intenzivno širjenje okužbe s HIV še ni začelo.



Slika 2. Diagnosticirani primeri okužbe s HIV glede kategorij izpostavljenosti po letih, Slovenija, 2004–2013.

Tabela 1. Delež okuženih med injicirajočimi uživalci nedovoljenih drog, moškimi, ki imajo spolne odnose z moškimi, pacienti s spolno prenesenimi okužbami in nosečnicami, Slovenija, 2004–2013. IUD – injicirajoči uživalci drog, MSM – moški, ki imajo spolne odnose z moškimi, SPO – pacienti s spolno prenesenimi okužbami.

	Leto	Število mest	Število testiranih		Število okuženih s HIV		Odstotek okuženih s HIV	
			Moških	Žensk	Moških	Žensk	Moških	Žensk
IUD	2004	3	173	59	0	0	0 %	0 %
	2005	3	137	57	0	0	0 %	0 %
	2006	3	125	35	0	0	0 %	0 %
	2007	3	130	44	0	0	0 %	0 %
	2008	3	142	34	0	0	0 %	0 %
	2009	3	127	32	0	0	0 %	0 %
	2010	4	179	74	1	0	0,6 %	0 %
	2011	4	136	50	1	0	0,7 %	0 %
	2012	4	132	41	1	0	0,8 %	0 %
2013	3	84	30	0	0	0 %	0 %	
MSM	2004	1	79	-	2	-	2,5 %	-
	2005	1	82	-	3	-	3,7 %	-
	2006	1	94	-	2	-	2,1 %	-
	2007	1	124	-	3	-	2,4 %	-
	2008	1	137	-	3	-	2,2 %	-
	2009	1	117	-	1	-	0,9 %	-
	2010	1	114	-	3	-	2,6 %	-
	2011	1	105	-	8	-	7,6 %	-
	2012	1	106	-	4	-	3,8 %	-
2013	1	111	-	5	-	4,5 %	-	
Bolniki s SPO	2004	7	328	148	5	0	1,5 %	0 %
	2005	7	403	170	1	1	0,2 %	0,6 %
	2006	7	420	211	10	0	2,4 %	0 %
	2007	7	484	257	11	0	2,3 %	0 %
	2008	7	677	264	23	2	3,4 %	0,8 %
	2009	6	422	185	13	0	3,1 %	0 %
	2010	7	525	199	9	0	1,7 %	0 %
	2011	7	434	198	9	0	2,1 %	0 %
	2012	8	646	300	7	0	1,1 %	0 %
	2013	7	598	219	6	0	1,0 %	0 %
Nosečnice	2005	8	-	8.008	-	1	-	0,01 %
	2007	8	-	8.963	-	0	-	0 %
	2009	6	-	8.072	-	1	-	0,01 %
	2011	7	-	7.231	-	2	-	0,03 %
	2013	7	-	9.574	-	0	-	0 %

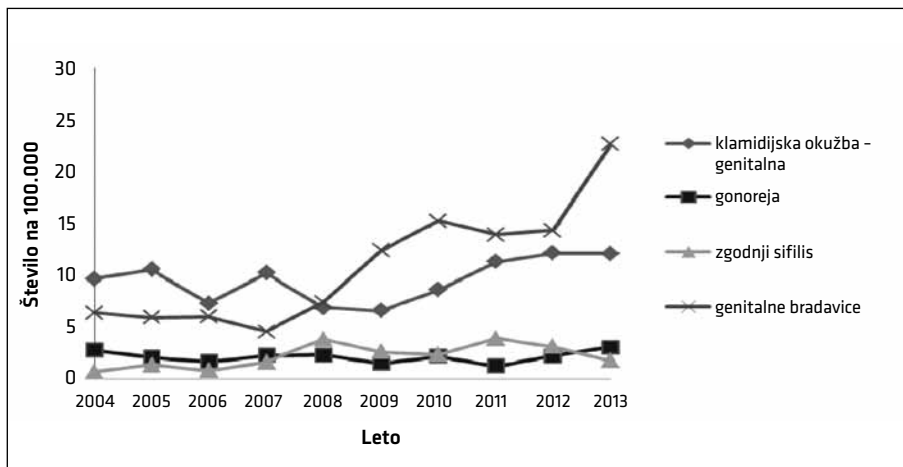
Podrobni rezultati epidemiološkega spremljanja okužb z bakterijo *C. trachomatis*, gonoreje, sifilisa in genitalnih bradavic so objavljeni (2). Iz poročil laboratorijev o številu opravljenih testiranj in prijav SPO lahko razberemo, da se je v obdobju zadnjih desetih let (2004–2013) letna prijavna incidenca (/100.000 prebivalcev) diagnosticiranih klamidijskih okužb gibala med 6,6 in 12,1, gonoreje med 1,2 in 3,0, zgodnjega sifilisa med 0,7 in 3,8 in genitalnih bradavic med 6,0 in 22,6 (slika 3). Prijavne incidence vseh teh okužb in genitalnih bradavic podcenjujejo njihovo pogostost, kar je predvsem posledica majhnega obsega diagnostičnega testiranja in nedoslednosti pri prijavljanju.

Najpogosteje prijavljena spolno prenesena bakterijska okužba je klamidijska okužba. V Sloveniji naredimo zelo malo laboratorijskih preiskav na klamidijske okužbe. Stopnja testiranja se je v obdobju

2003–2012 gibala med 151 in 416/100.000 prebivalcev. Številne klamidijske okužbe zato niso prepoznane in tako zamujamo priložnosti za zdravljenje in preprečevanje poznih posledic, predvsem posledic za reproduktivno zdravje žensk (2).

Breme gonoreje in sifilisa je nesorazmerno visoko med MSM. V obdobju zadnjih desetih let (2004–2013) sta se deleža primerov gonoreje in zgodnjega sifilisa med MSM med vsemi prijavljenimi primeri pri moških gibala med eno petino in dvema tretjinama.

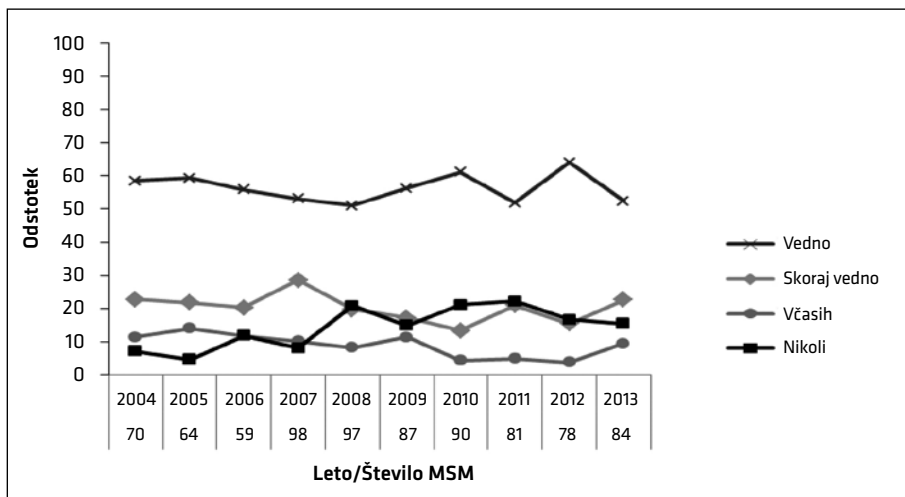
Najpogosteje prijavljena spolno prenesena virusna okužba so genitalne bradavice, ki jih povzročajo okužbe z neokogenimi (nizkorizičnimi) HPV, predvsem genotipa HPV6 in HPV11. Porast prijavljenih primerov genitalnih bradavic po letu 2009 je bil verjetno posledica večje ozaveščenosti laične in strokovne javnosti ob uvedbi cepljenja proti HPV.



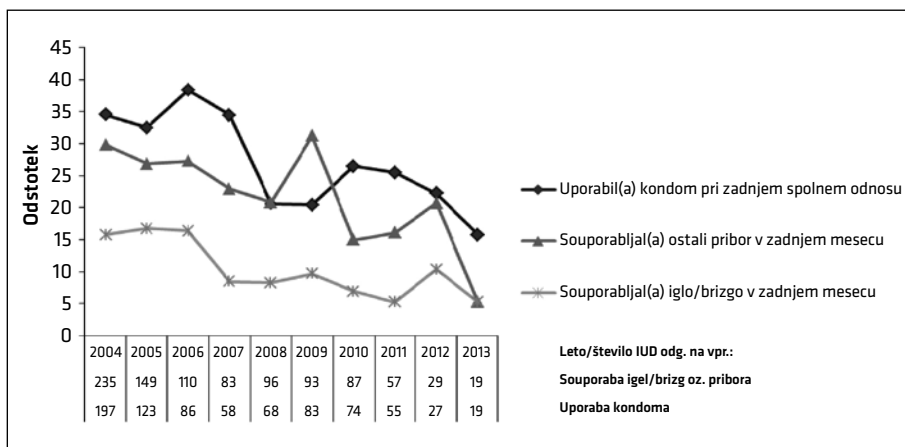
Slika 3. Prijavne incidence spolno prenesene klamidijske okužbe, genitalnih bradavic, gonoreje in zgodnjega sifilisa, Slovenija, 2004–2013.

Rezultati spremljanja izbranih kazalnikov tveganega vedenja v dveh skupinah z višje tveganim vedenjem za okužbo s HIV in druge SPO, MSM in IUD, so objavljeni (1, 2). V obdobju zadnjih desetih

let (2004–2013) ni prišlo do izrazitega povečanja tveganega spolnega vedenja med MSM (slika 4). Tvegano vedenje v zvezi z injiciranjem prepovedanih drog je relativno omejeno (slika 5).



Slika 4. Uporaba kondoma med moškimi, ki imajo spolne odnose z moškimi, pri analnih spolnih odnosih v preteklem letu, priložnostni vzorec, Ljubljana, Slovenija, 2004–2013. Število MSM – število moških, ki so v preteklem letu imeli analne spolne odnose z moškimi in so odgovorili na vprašanja o uporabi kondoma.



Slika 5. Izbrani kazalniki tveganega vedenja med injicirajočimi uživalci drog, ki so prvič zaprosili za pomoč v mreži centrov za preprečevanje in zdravljenje odvisnosti od prepovedanih drog, Slovenija, 2004–2013.

Rezultati raziskave »Življenjski slog, stališča, zdravje in spolnost«

Zanesljive ocene o pogostosti klamidijske okužbe smo dobili z raziskavo »Življenjski slog, stališča, zdravje in spolnost«, ki je bila izvedena leta 2000 (5). Okuženih je bilo 1,6 % žensk in 3,0 % moških, največ v starostni skupini 20–24 let (tabela 2).

Med 18–24 let starimi osebami je bil delež okuženih s spolno preneseno klamidijsko okužbo višji med tistimi, ki so imeli prvi heteroseksualni spolni odnos pred 16. letom starosti, v preteklem letu nezaščitene spolne odnose vsaj z enim heteroseksualnim partnerjem ali vsaj eno sočasno heteroseksualno spolno razmerje

Tabela 2. Delež okuženih s spolno preneseno okužbo z bakterijo *Chlamydia trachomatis* med 18–49 let starimi prebivalci, Slovenija, 2000. IZ – interval zaupanja, NUŠ – neuteženo število, UŠ – uteženo število.

Starost	Ženske				Moški			
	Prevalenca		Baze		Prevalenca		Baze	
	%	(p vrednost ^a)	NUŠ	UŠ	%	(p vrednost ^a)	NUŠ	UŠ
		95 % IZ				95 % IZ		
(0,29)				< 0,01				
18-19	1,5	0,2 – 10,0	65	43	2,8	0,7 – 10,8	75	45
20-24	5,1	2,7 – 9,4	200	110	4,6	2,3 – 9,0	177	115
25-29	1,0	0,1 – 6,7	97	105	4,6	1,7 – 11,8	90	109
30-49	0,9	0,3 – 2,4	402	459	2,2	1,1 – 4,5	341	462
Skupaj	1,6	1,0 – 2,7	764	718	3,0	1,9 – 4,6	683	730

^a Test statistično značilne povezanosti.

(vsaj dva partnerja sočasno) in najmanj pet heteroseksualnih spolnih partnerjev v življenju. Vendar je bila povezanost statistično značilna le za najmanj pet heteroseksualnih spolnih partnerjev v življenju (razmerje obetov, prilagojeno na starost in spol 3,0 ($p = 0,01$)) (tabela 3).

Z raziskavo smo pridobili tudi prve zanesljive ocene o spolnem vedenju prebivalcev Slovenije starih od 18 do 49 let (6, 8, 11, 32). Med moškimi, rojenimi po zgodnjih 1960-tih letih in ženskami, rojenimi po zgodnjih 1970-tih letih je bila mediana starosti ob prvem heteroseksualnem

Tabela 3. Povezanost spolno prenesene okužbe z bakterijo *Chlamydia trachomatis* med 18–24 let starimi prebivalci z izbranimi dejavniki tveganja, Slovenija, 2000. IZ – interval zaupanja. NUŠ – neuteženo število. UŠ – uteženo število. RO – razmerje obetov.

Dejavniki tveganja		CT prevalenca ^a		Baze		RO	(p vrednost)	Prilagojeno ^b	(p vrednost)
		%	95 % IZ	NUŠ	UŠ				
Prvi heteroseksualni spolni odnos pred 16. letom starosti	Ne	3,6	2,1–6,2	436	263	1	(0,28)	1	(0,69)
	Da	6,4	2,7–14,4	81	50	1,8	0,6–5,3	1,3	0,4–4,0
1+ heteroseksualnih spolnih partnerjev brez 100 % uporabe kondoma v zadnjem letu ^c	Ne	2,7	0,7–10,1	77	48	1	(0,27)	1	(0,43)
	Da	5,9	3,7–9,5	321	193	2,3	0,5–10,5	1,9	0,4–10,1
Sočasno spolno razmerje v zadnjih letih	Ne	3,8	2,3–6,3	467	282	1	(0,28)	1	(0,84)
	Da	7,5	2,4–21,3	40	25	2,0	0,6–7,5	1,2	0,3–5,1
5+ heteroseksualnih spolnih partnerjev v življenju	Ne	2,8	1,5–5,0	374	225	1	(0,01)	1	(0,01)
	Da	7,8	4,2–13,9	137	84	3,0	1,3–7,0	3,0	1,3–6,9

^a Prevalenca spolno prenesene okužbe z bakterijo *Chlamydia trachomatis*.

^b Prilagojeno na 5+ heteroseksualnih spolnih partnerjev v življenju, starost (18–19, 20–24 let) in spol.

^c Najmanj en heteroseksualni spolni partner, s katerim ni bil uporabljen kondom v 100 % vaginalnih in/ali analnih spolnih odnosih.

spolnem odnosu 17 let. Uporabo kondoma ob prvem heteroseksualnem spolnem odnosu je navedlo 23,6 % vseh moških in 21,3 % žensk, med tistimi, ki so imeli prvi heteroseksualni spolni odnos v obdobju 1995–1999, pa že 71,7 % moških in 63,8 % žensk. Za obdobje zadnjih petih let so moški in ženske najpogosteje poročali o enem heteroseksualnem partnerju (Mediana in aritmetična sredina znašata 3,2 in 1,5). O vzporednih partnerskih zvezah je poročalo 24,4 % moških in 8,2 % žensk, o heteroseksualnem seksu s tujci 12,6 % moških in 12,2 % žensk, 4,8 % žensk je poročalo, da jih je moški prisilil v spolni odnos, 2,6 % moških, da so plačali ženski za seks in 0,6 % moških, da so imeli spolne odnose z moškimi. V zadnjem letu je 22,7 % moških in 9,5 % žensk poročalo o vsaj enem novem heteroseksualnem partnerju. Povprečno število spolnih odnosov v preteklih štirih tednih je bilo 6,1 za moške in 6,0 za ženske. Dosledna in občasna uporaba kondoma je bila bolj pogosta pri moških z več spolnimi partnerkami in tistih, ki niso bili poročeni oziroma niso živeli skupaj s partnerko. Rezultati kažejo na relativno manj tvegano spolno vedenje Slovencev.

Rezultati raziskave »Opozorilno epidemiološko spremljanje okužb s HPV med ženskami, vključenimi v Državni program ZORA«

Zanesljive ocene o bremenu okužb s HPV med Slovenkami smo dobili z nacionalno presečno raziskavo »Opozorilno epidemiološko spremljanje okužb s humanimi virusi papiloma (HPV) med ženskami, vključenimi v Državni program ZORA«. Prevalenca okužb materničnega vratu z vsaj enim od 12 onkogenih oziroma visokorizičnih HPV (vr-HPV) je bila 12,2 %, najvišja med starimi 20–24 let (25,0 %). Glede na izvid citološke preiskave brisa materničnega vratu pa je bila prevalenca okužb najnižja med ženskami z nor-

malnim izvidom citološke preiskave brisa materničnega vratu (10,0 %) in najvišja med ženskami s ploščatocelično intraepitelijsko lezijo visoke stopnje (83,7 %) (12). Okužbo materničnega vratu z vsaj enim izmed obeh cepilnih vr-HPV genotipov (HPV16, HPV18) je imelo 4,4 % in z vsaj enim izmed 25 ne-visokorizičnih HPV (ne-vr-HPV) 10,0 % žensk (12, 14). Protitelesa proti vsaj enemu od 11 vr-HPV je imelo 59,2 % in vsaj enemu izmed 4 ne-vr-HPV 33,1 % žensk (13). Okužbo materničnega vratu (prisotnost DNK) in/ali protitelesa proti vsaj enemu od 4 cepilnih genotipov HPV (HPV6, HPV11, HPV16 in HPV18) je imelo 44,7 % žensk.

RAZPRAVA

Okužba s HIV in druge SPO v Sloveniji predstavljajo relativno veliko breme.

Preprečevanje in obvladovanje okužbe s HIV in drugih SPO v okviru promocije spolnega in reproduktivnega zdravja je pomembna javnozdravstvena prednost. S programi promocije spolnega in reproduktivnega zdravja moramo doseči vse prebivalce, predvsem pa mlade. Za preprečevanje spolnega prenosa je predvsem pomembno spodbujati odgovorno in varno spolno vedenje, vključno s promocijo uporabe kondoma. Ker je breme okužbe s HIV in nekaterih drugih SPO, predvsem gonoreje in sifilisa, v Sloveniji največje med MSM, je promocija odgovorne in varne spolnosti s promocijo uporabe kondoma med MSM zelo pomembna.

Javnozdravstveni pristop k obvladovanju SPO vključuje tudi promocijo takojšnjega iskanja zdravstvene pomoči. Bolnikom z znaki SPO in težavami zaradi njih bi morali poleg oskrbe v primarnem zdravstvenem varstvu omogočiti tudi možnost dostopa do specialističnega zdravljenja na sekundarni ravni brez napotitve. Za MSM bi bilo smiselno organizirati posebno specialistično obravnavo SPO.

Podatki o okužbi s HIV in drugih SPO, ki jih zbiramo na NIJZ na podlagi zakonsko obvezne prijave, podcenjujejo njihovo pogostost. To je posledica tega, da del okužb s HIV in SPO (npr. klamidijska okužba) poteka brez bolezenskih znakov in težav in tako okuženi ne išče zdravstvene oskrbe, da del okužb, ki je prepoznan, ni etiološko razjasnjen (npr. izcedek iz sečnice pri moškem) in da zdravniki številnih prepoznanih SPO ne prijavijo. Na primer, samo 35,8 % primerov klamidijskih okužb, ki so jih v obdobju od 2007 do 2010 prepoznali na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani, je bilo prijavljenih NIJZ.

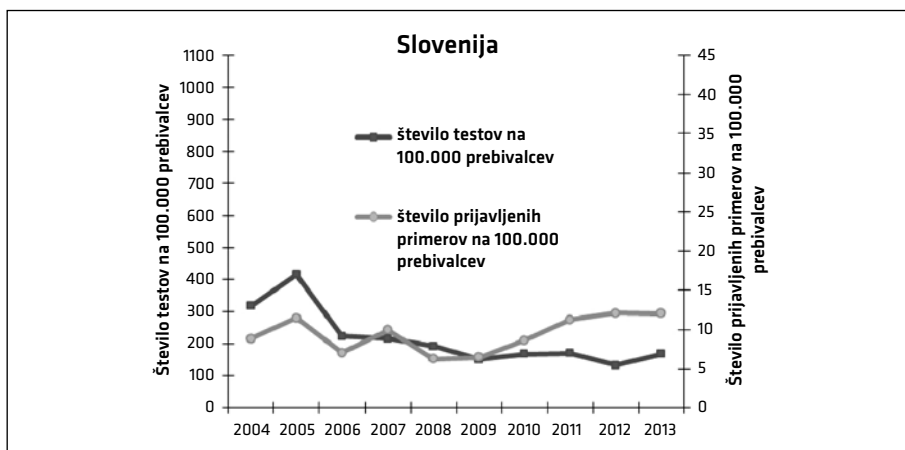
Tudi sledenje spreminjanja prijave incidence nekaterih SPO v času je relativno nezanesljivo, saj lahko že sprememba prakse nekaj zdravnikov glede obsega testiranja pomembno vpliva na spremembo nacionalnih trendov v prijavi incidence. Slika 6 prikazuje spreminjanje stopnje testiranja na klamidijsko okužbo in prijave incidence spolno prenesene klamidijske okužbe v Sloveniji in v zdravstveni regiji Nova Gorica za obdobje zadnjih deset let, podatke smo črpali iz poročil laboratorijev o številu opravljenih testiranj in prijav SPO.

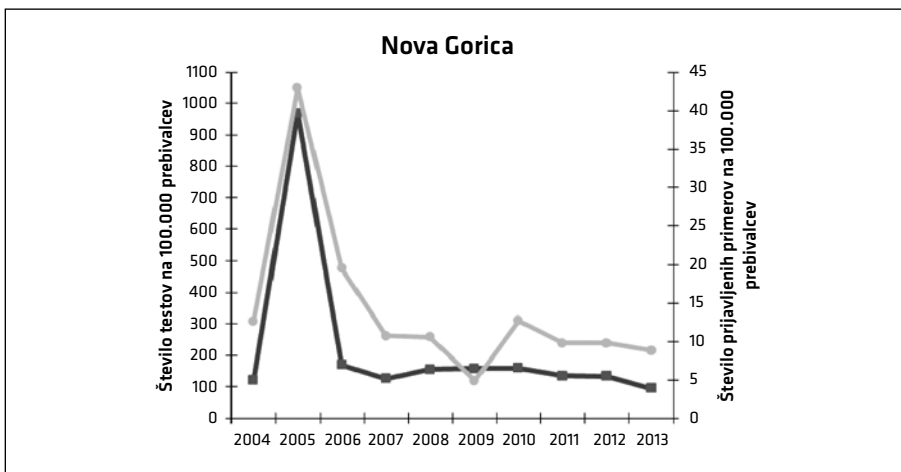
Izrazit porast stopnje testiranja in števila prepoznanih okužb v goriški regiji ter

posledičen porast v Sloveniji v letu 2005 je bil posledica projekta »Varovanje rodnega zdravja mladih žensk« v goriški regiji, kjer so od aprila do septembra 2005 rutinsko ponujali prostovoljno zaupno testiranje na spolno preneseno klamidijsko okužbo vsem ginekološkim pacientkam, starim 18–30 let.

Občutljivost epidemiološkega spremljanja okužbe s HIV in SPO bi lahko delno izboljšali z vzpostavitvijo laboratorijskega epidemiološkega spremljanja, ki bi vključevalo prijavljanje vseh diagnosticiranih okužb. Smiselno bi bilo tudi sistematično zbirati podatke o obsegu testiranja na okužbo s HIV in druge SPO ter deležu pozitivnih rezultatov v skupinah ljudi z različnimi tveganimi vedenji, v skupinah bolnikov z različnimi bolezenskimi težavami in znaki, ki so značilni za okužbo s HIV, med različnimi specialnostmi zdravnikov, med različnimi izvajalci zdravstvene dejavnosti in tudi v skupnosti MSM.

Zelo enostavno spremljanje nekaterih kazalnikov tveganega vedenja v majhnih priložnostnih vzorcih MSM in IUD bi morali dopolniti z večjimi in bolj poglobljenimi ponavljajočimi se presečnimi raziskavami tveganih vedenj, okužbe s HIV in drugih SPO ter njihovih potreb v zve-





Slika 6. Stopnja testiranja na spolno preneseno klamidijsko okužbo in prijave incidence spolno prenesene klamidijske okužbe, Slovenija, Nova Gorica, 2004–2013.

zi s preprečevanjem in obvladovanjem teh okužb ter oskrbe okuženih.

Rezultate epidemiološkega spremljanja okužbe s HIV in SPO bi morali dopolniti z bolj zanesljivimi ocenami njihove pogostosti z javnozdravstvenimi presečnimi raziskavami v verjetnostnih vzorcih prebivalcev, ki bi dale tudi zanesljive podatke o dejavnih tveganja in spolnem vedenju.

ZAKLJUČKI

Okužba s HIV in druge SPO v Sloveniji predstavljajo relativno veliko breme.

Njihovo preprečevanje in obvladovanje v okviru promocije spolnega in reproduktivnega zdravja je pomembna javnozdravstvena prednost.

Epidemiološko spremljanje okužbe s HIV in drugih SPO bi lahko izboljšali z vzpostavitvijo laboratorijskega epidemiološkega spremljanja. Rezultate bi morali dopolniti z javnozdravstvenimi presečnimi raziskavami v verjetnostnih vzorcih prebivalcev, ki bi dale zanesljive podatke o pogostosti SPO, dejavnih tveganja ter spolnem vedenju prebivalstva.

LITERATURA

1. Klavs I, Kustec T. Okužba s HIV v Sloveniji, letno poročilo 2013. Ljubljana: Nacionalni inštitut za javno zdravje, 2014. Pridobljeno 2.9.2014 s spletne strani: http://www.ivz.si/hiv_spo
2. Klavs I, Kustec T. Spolno prenesene okužbe v Sloveniji, letno poročilo 2013. Ljubljana: Nacionalni inštitut za javno zdravje, 2014. Pridobljeno 2.9.2014 s spletne strani: http://www.ivz.si/hiv_spo
3. Klavs I, Poljak M. Unlinked anonymous monitoring of HIV prevalence in high and low-risk groups in Slovenia, 1993–2002. *Croat Med J* 2003; 44 (5): 545–49.
4. Klavs I, Bergant N, Kastelic Z, et al. Disproportionate and increasing burden of HIV infection among men who have sex with men in Slovenia: surveillance data for 1999–2008. *Euro Surveill*. 2009; 14 (47).
5. Klavs I, Rodrigues LC, Wellings K, et al. Prevalence of genital Chlamydia trachomatis infection in the general population of Slovenia: serious gaps in control. *Sex Transm Infect*. 2004; 80 (2): 121–3.
6. Klavs I, Rodrigues LC, Wellings K, et al. Increased condom use at sexual debut in the general population of Slovenia and association with subsequent condom use. *AIDS*. 2005; 19 (11): 1215–23.

7. Grgič-Vitek M, Švab I, Klavs I. Prevalence of and risk factors for self-reported sexually transmitted infections in Slovenia in 2000. *Croat Med J.* 2006; 47 (5): 722–9.
8. Klavs I, Rodrigues LC, Weiss HA, et al. Factors associated with early sexual debut in Slovenia: results of a general population survey. *Sex Transm Infect.* 2006; 82 (6): 478–83.
9. Klavs I, Hamers FF. Male circumcision in Slovenia: results from a national probability sample survey. *Sex Transm Infect.* 2008; 84 (1): 49–50.
10. Klavs I, Grgič-Vitek M. The burden of genital warts in Slovenia: results from a national probability sample survey. *Euro Surveill.* 2008; 13 (45): pii: 19032.
11. Klavs I, Rodrigues LC, Wellings K, et al. Sexual behaviour and HIV/sexually transmitted infection risk behaviours in the general population of Slovenia, a low HIV prevalence country in central Europe. *Sex Transm Infect.* 2009; 85 (2): 132–8.
12. Učakar V, Poljak M, Klavs I. Pre-vaccination prevalence and distribution of high-risk human papillomavirus (HPV) types in Slovenian women: a cervical cancer screening based study. *Vaccine* 2012; 30 (2): 116–20.
13. Učakar V, Jelen MM, Faust H, et al. Pre-vaccination seroprevalence of 15 human papillomavirus (HPV) types among women in the population-based Slovenian cervical screening program. *Vaccine* 2013; 31 (43): 4935–9.
14. Učakar V, Poljak M, Oštrbenk A, et al. Pre-Vaccination prevalence of infections with 25 non-high-risk human papillomavirus types among 1000 Slovenian women in cervical cancer screening. *J. Med. Virol.* 2014; 86 (10): 1772–9.
15. Zakon o nalezljivih boleznih 1995. Uradni list RS št. 69/1995.16.
16. Zakon o zbirkah podatkov s področja zdravstvenega varstva. Uradni list RS št. 65/2000.
17. Decision No 2119/98/EC of the European Parliament and of the Council of 24 September 1998 setting up a network for the epidemiological surveillance and control of communicable diseases in the Community. *OJ L 268/1; 03.10.1998*
18. Commission Decision 2000/96/EC of 22 December 1999 on the communicable diseases to be progressively covered by the Community network under Decision No 2119/98/EC of the European Parliament and of the Council. *OJ L 28/50; 03.02.2000*
19. Commission Decision 2002/253/EC of 19 March 2002 laying down case definitions for reporting communicable diseases to the Community network under Decision No 2119/98/EC of the European Parliament and of the Council. *OJ L 86/44; 03.04.2002*
20. Commission Decision 2008/426/EC of 28 April 2008 amending Decision 2002/253/EC laying down case definitions for reporting communicable diseases to the Community network under Decision No 2119/98/EC of the European Parliament and of the Council. *OJ L 159/46; 18.06.2008*
21. Commission Implementing Decision 2012/506/EU of 8 August 2012 amending Decision 2002/253/EC laying down case definitions for reporting communicable diseases to the Community network under Decision No 2119/98/EC of the European Parliament and of the Council. *OJ L 262/1; 27.9.2012*
22. Klavs I. Nova definicija aidsa in revizija obrazca za prijavo aidsa in infekcije s HIV. *Zdrav Var* 1993; 32 (7,8): 154–58.
23. Grgič-Vitek M, Klavs I. Navodila za prijavo spolno prenosljivih okužb. Zdravstveno varstvo: Suplement. Ljubljana: Inštitut za varovanje zdravja RS; 2000.
24. European Centre for Disease Prevention and Control. Annual Epidemiological Report 2013. Reporting on 2011 surveillance data and 2012 epidemic intelligence data. Stockholm: European Centre for Disease Prevention and Control; 2013. Pridobljeno 22.9.2014 s spletne strani: <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/annual-epidemiological-report-2013.pdf>
25. European Centre for Disease Prevention and Control/WHO Regional Office for Europe. HIV/AIDS surveillance in Europe 2012. Stockholm: European Centre for Disease Prevention and Control; 2013. Pridobljeno 22.9.2014 s spletne strani: <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/hiv-aids-surveillance-report-2012-20131127.pdf>
26. European Centre for Disease Prevention and Control. Sexually transmitted infections in Europe 2012. Stockholm: European Centre for Disease Prevention and Control; 2014. Pridobljeno 22.9.2014 s spletne strani: <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/sexually-transmitted-infections-europe-surveillance-report-2012.pdf>
27. Klavs I, Rodrigues LC, Wellings K, et al. Feasibility of testing for Chlamydia trachomatis in a general population sexual behaviour survey in Slovenia. *Int J STD AIDS.* 2002; 13 Suppl 2: 5–8.
28. Klavs I, Keše D, Švab I. Slovene national survey of sexual lifestyles, attitudes and health: Preparatory work and feasibility study. *Zdrav Var* 2006; 45 (3): 117–25.

29. Klavs I, Keše D, Švab I. Slovene national survey of sexual lifestyles, attitudes and health, 1999–2001: Data collection methods. *Zdrav Var* 2007; 46 (1): 1–8.
30. Poljak M, Ostrbenk A, Seme K, et al. Comparison of clinical and analytical performance of the Abbott Realtime High Risk HPV test to the performance of hybrid capture 2 in population-based cervical cancer screening. *J Clin Microbiol.* 2011; 49 (5): 1721–9.
31. Faust H, Jelen MM, Poljak M, et al. Serum antibodies to human papillomavirus (HPV) pseudovirions correlate with natural infection for 13 genital HPV types. *J Clin Virol.* 2013; 56 (4): 336–41.
32. Klavs I. Spolno vedenje Slovencev: rezultati nacionalne presečne raziskave. *Med Razgl.* 2014; 53 Suppl 6.

Irena Klavs¹

Spolno vedenje Slovencev: rezultati nacionalne presečne raziskave

Sexual Behaviour of Slovenians: the Results of a National Survey

Financiranje:

Raziskava je bila izvedena s sredstvi Inštituta za varovanje zdravja ob sofinanciranju Ministrstva za zdravje, Ministrstva za visoko šolstvo, znanost in tehnologijo, Slovenske agencije za raziskovanje in razvoj, Mestne občine Ljubljana, Zavoda za zdravstveno zavarovanje Slovenije, Merc & Dohme Idea Inc., Roche Diagnostics, Krke in Leka. Merc & Dohme Idea Inc., Roche Diagnostics, Krka in Lek niso imeli nobenega vpliva na pripravo protokola raziskave, analize zbranih podatkov in pripravo objav.

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: spolno vedenje, presečna raziskava, splošno prebivalstvo, Slovenija

IZHODIŠČA. Želeli smo opisati spolno vedenje Slovencev. METODE. V letu 2000 smo izvedli nacionalno presečno raziskavo v verjetnostnem vzorcu 18–49 let starih prebivalcev. Podatke smo zbrali z anketiranjem in anonimnim samoizpolnjevanjem vprašalnikov z bolj občutljivimi vprašanji. Uporabili smo statistične metode za kompleksne presečne raziskave. REZULTATI. Sodelovalo je 849 moških in 903 ženske. Med moškimi, rojenimi po zgodnjih 1960-ih letih in ženskami, rojenimi po zgodnjih 1970-ih letih, je bila mediana starosti ob prvem heteroseksualnem spolnem odnosu 17 let. Med rojenimi v obdobju 1975–1982 je o prvem heteroseksualnem spolnem odnosu pred starostjo 16 let poročalo 16,9 % moških in 14,4 % žensk. Uporabo kondoma ob prvem heteroseksualnem spolnem odnosu je navedlo 23,6 % vseh moških in 21,3 % žensk, med tistimi, ki so imeli prvi heteroseksualni spolni odnos v obdobju 1995–1999 pa že 71,7 % moških in 63,8 % žensk. Za obdobje zadnjih petih let so moški in ženske najpogosteje poročali o enem heteroseksualnem partnerju (mediana in aritmetična sredina znašata 3,2 in 1,5). O vzporednih partnerskih zvezah je poročalo 24,4 % moških in 8,2 % žensk, o heteroseksualnem seksu s tujci 12,6 % moških in 12,2 % žensk, 4,8 % žensk je navedlo, da jih je moški prisilil v spolni odnos, 2,6 % moških, da so plačali ženski za seks, in 0,6 % moških, da so imeli spolne odnose z moškimi. V zadnjem letu je 22,7 % moških in 9,5 % žensk poročalo o vsaj enem novem heteroseksualnem partnerju. Povprečno število spolnih odnosov v preteklih štirih tednih je bilo 6,1 za moške in 6,0 za ženske. Dosledna in občasna uporaba kondoma je bila bolj pogosta pri moških z več spolnimi partnerkami in tistih, ki niso bili poročeni oziroma niso živeli skupaj s partnerko. ZAKLJUČKI. Rezultati kažejo na v povprečju relativno nizko tvegano spolno vedenje Slovencev.

¹ Izr. prof. dr. Irena Klavs, dr. med., Center za nalezljive bolezni, Nacionalni inštitut za javno zdravje, Trubarjeva ulica 2, 1000 Ljubljana; irena.klavs@nijz.si

ABSTRACT

KEY WORDS: sexual behaviour, cross-sectional study, general population, Slovenia

BACKGROUND. We aimed to describe sexual behaviour of Slovenians. **METHODS.** In 2000, we conducted a national cross-sectional study in a probability sample of the general population 18–49 years old. The data were collected by conducting face-to-face interviews and via anonymous self-administered questionnaires with more sensitive questions. Statistical methods for complex survey data were used. **RESULTS.** There were 849 men and 903 women participating. Among men born after early 1960s and women born after early 1970s the median age for first heterosexual intercourse was 17 years. First heterosexual intercourse before the age of 16 was reported by 16.9 % of men and 14.4 % of women born during 1975–1982. Among all men and women, 23.6 % and 21.3 % reported condom use during the first heterosexual intercourse, whereas among those who had their first heterosexual intercourse during 1995–1999, the percentage increased to 71.7 % for men and 63.8 % for women. In the past 5 years, both men and women reported a median of one heterosexual partner (means: 3.2, 1.5 respectively). Concurrent heterosexual partnerships were reported by 24.4 % of men and 8.2 % of women, heterosexual sex with non-Slovenian partners by 12.6 % of men and 12.2 % of women, forced sex by 4.8 % of women, paid heterosexual sex by 2.6 % of men and sex with another man by 0.6 % of men. In the past year, 22.7 % of men and 9.5 % of women reported forming at least one new heterosexual partnership. On average, the number of episodes of heterosexual sex in the previous four weeks was 6.1 for men and 6.0 for women. Consistent and inconsistent condom use was reported more frequently among men reporting multiple female partners and those not married or cohabiting. **CONCLUSIONS.** Our results indicate relatively low risk sexual behaviour of the general population in Slovenia.

IZHODIŠČA

Zanesljivi podatki o spolnem vedenju prebivalstva so pomembni za razumevanje nacionalne epidemiologije okužbe s HIV in drugih spolno prenosljivih okužb (SPO) ter načrtovanje promocije spolnega in reproduktivnega zdravja, vključno s preprečevanjem in obvladovanjem okužbe s HIV in drugih SPO. Večina zahodnoevropskih držav je zato že v poznih 1980-ih in zgodnjih 1990-ih letih izvedla nacionalne raziskave spolnega vedenja v verjetnostnih vzorcih splošnega prebivalstva. V letih 1999–2001 je tudi Inštitut za varovanje zdravja (IVZ) izvedel prvo in do sedaj edino slovensko nacionalno presečno raziskavo z naslovom »Življenjski slog, stališča, zdravje in spolnost« (ŽSSZS) o tve-

ganih vedenjih za okužbo s HIV in druge SPO v verjetnostnem vzorcu slovenskih prebivalcev. Želeli smo:

- opisati spolno vedenje Slovencev starih 18–49 let,
- opredeliti demografske, socialne in vedenjske dejavnike tveganja za visoko tvegane vedenjske vzorce za okužbo s HIV in druge SPO in
- oceniti prevalenco ter opredeliti dejavnike tveganja za genitalne okužbe z bakterijo *Chlamydia trachomatis*.

Rezultati so bili objavljeni v mednarodnih medicinskih revijah in v knjigi (1–8). V prispevku povzemam metode in nekaj najpomembnejših rezultatov glede spolnega vedenja in uporabe kondoma.

METODE

Uporabljene metode zbiranja podatkov, ki smo jih priredili po podobni britanski raziskavi iz leta 1990, smo podrobno opisali (9–12). Podatke smo zbrali v letih 1999–2001, skoraj vse v letu 2000. Osebe, ki so bile izbrane v dvostopenjski stratificiran verjetnostni vzorec iz Centralnega registra prebivalcev, so prejele napovedno pismo. Podatki so bili zbrani na domovih sodelujočih s kombinacijo anketiranja v osebnem stiku in anonimnega samoizpolnjevanja vprašalnikov (svinčnik in papir). Sodelujoči so bili vnaprej obveščeni, da bodo knjižice z odgovori na bolj občutljiva vprašanja sami zalepili v kuverte in da njihovih odgovorov anketarke ne bodo videli. Vsi sodelujoči so bili tudi povabljeni, da prispevajo prvi curek urina za testiranje na okužbo z bakterijo *C. trachomatis*.

Zbrane podatke smo analizirali v statističnem paketu STATA. Uporabili smo metode, ki so primerne za kompleksne podatke iz presečnih raziskav z upoštevanjem stratifikacije, kopičenja vzorca in uteževanja. Z uteževanjem smo ocene prilagodili za nadzorčenje mladih in razlike v odgovoru med različnimi tipi in velikostmi skupnosti ter glede znanih značilnosti prebivalstva glede statističnih regij, spola in starosti v Centralnem registru prebivalcev za leto 2000. V prispevku ne prikazujem 95 % intervalov zaupanja ocen deležev ljudi z različnimi vedenji, ki so objavljeni v prej omenjenih člankih.

Pred zbiranjem podatkov smo pridobili soglasje Komisije za medicinsko etiko pri Ministrstvu za zdravje.

REZULTATI

V raziskavo smo vključili 1752 oseb, 849 moških in 903 ženske. Odgovor je bil 67,0 %.

Mediana starosti ob prvem heteroseksualnem spolnem odnosu je bila 17 let pri moških in 18 let pri ženskah ter je padla z 18 na 17 let med moškimi, rojenimi

po zgodnjih 1960-ih letih in med ženskami, rojenimi po zgodnjih 1970-ih letih. O zgodnjem prvem heteroseksualnem spolnem odnosu (pred starostjo 16 let) je poročalo 15,2 % vseh moških in 7,4 % vseh žensk, medtem ko sta bila ustrezna deleža med rojenimi v obdobju 1975–1982 zelo podobna (16,9 % in 14,4 %). Ženske z višjo izobrazbo in tiste, ki so jih o spolnosti poučili starši ali v šoli, so s spolnimi odnosi začele kasneje kot njihove vrstnice. Med ženskami z zgodnjim prvim spolnim odnosom z moškim jih je polovica ocenila, da se je zgodilo prezgodaj in 4,2 % jih je poročalo, da so bile v prvi spolni odnos prisiljene, medtem ko je o prisili v prvi spolni odnos z moškim poročalo 0,9 % vseh žensk. Osebe z zgodnjim spolnim odnosom so pogosteje poročale o višje tveganem spolnem vedenju v življenju, ženske o pogostejših najstniških nosečnostih in moški o manj pogosti uporabi kondomov in bolj pogostih SPO. Tri od štirih oseb z zgodnjim heteroseksualnim spolnim odnosom so poročale, da takrat niso imele ustreznega znanja o spolnosti in veliko jih je želelo, da bi jih o spolnosti poučili starši ali v šoli.

Da so ob prvem heteroseksualnem spolnem odnosu uporabili kondom, je poročalo 23,6 % moških in 21,3 % žensk. Med tistimi, ki so imeli prvi heteroseksualni spolni odnos v obdobju 1995–1999, je kondom uporabilo že 71,7 % moških in 63,8 % žensk. V primerjavi z vrstniki so kondom bolj verjetno uporabili moški, ki so bili ob prvem spolnem odnosu z žensko stari najmanj 18 let in so si v življenju pridobili višjo izobrazbo in manj verjetno tisti, ki so bili ob prvem spolnem odnosu z žensko pijani ali so jih »odnesli občutki«.

Tabela 1 za moške in ženske prikazuje razporeditev števila heteroseksualnih partnerjev v vsem življenju, v zadnjih petih letih in v zadnjem letu glede starosti oziroma rojstne kohorte. Večina moških (79,5 %) je poročala o več kot eni partnerki v življenju in 27,7 % o najmanj dese-

Tabela 1. Število heteroseksualnih partnerjev v vsem življenju, v zadnjih 5 letih in v zadnjem letu za moške in ženske glede starosti (rojstnih kohort), ŽSSZS 2000, Slovenija. ŽSSZS – raziskava Življenjski slog, stališča, zdravje in spolnost, SD – standardna deviacija, U – uteženo število ljudi, NU – neuteženo število ljudi.

	Moški				Ženske			
	Starost v letih (rojstna kohorta)			Vsi	Starost v letih (rojstna kohorta)			Vse
	18–24	25–34	35–49		18–24	25–34	35–49	
Število partnerjev	(1975–82)	(1965–74)	(1950–64)		(1975–82)	(1965–74)	(1950–64)	
V vsem življenju								
0	15,3 %	3,0 %	1,0 %	4,9 %	14,6 %	1,4 %	0,2 %	3,7 %
1	16,5 %	13,6 %	16,5 %	15,6 %	31,1%	33,4 %	44,9 %	38,5 %
2	9,6 %	8,9 %	10,3 %	9,7 %	16,2 %	18,1 %	14,3 %	15,9 %
3–4	21,8 %	22,3 %	19,7 %	21,0 %	20,1 %	23,4 %	20,5 %	21,3 %
5–9	17,5 %	24,6 %	20,8 %	21,2 %	13,0 %	18,9 %	13,3 %	15,2 %
10+	19,4 %	27,7 %	31,8 %	27,7 %	5,1 %	4,8 %	6,3 %	5,6 %
Povprečje ^a (SD)	6,5 (14,3)	7,9 (11,6)	9,5 (13,0)	8,3 (12,9)	2,9 (3,9)	3,4 (3,5)	3,1 (3,6)	3,2 (3,6)
Mediana (99. percentil)	3 (45)	5 (58)	5 (60)	4 (58)	2 (22)	2 (15)	2 (20)	2 (20)
Število ljudi: U (NU)	193 (323)	250 (186)	394 (303)	837 (812)	181 (313)	255 (214)	408 (352)	844 (879)
V zadnjih 5 letih								
0	15,9 %	4,8 %	3,0 %	6,5 %	14,7 %	2,8 %	2,6 %	5,2 %
1	18,4 %	52,7 %	68,9 %	52,6 %	33,8 %	76,0 %	89,3 %	73,5 %
2	10,4 %	10,1 %	8,4 %	9,4 %	19,7 %	9,7 %	5,6 %	9,8 %
3–4	23,4 %	13,1 %	9,9 %	14,0 %	17,4 %	7,0 %	2,6 %	7,0 %
5–9	17,9 %	12,6 %	5,6 %	10,5 %	10,5 %	4,5 %	0,0 %	3,6 %
10+	13,6 %	6,6 %	4,2 %	7,2 %	3,9 %	0,0 %	0,0 %	0,8 %
Povprečje ^a (SD)	5,5 (13,3)	3,1 (4,7)	2,1 (3,1)	3,2 (7,3)	2,5 (3,4)	1,4 (1,1)	1,1 (0,5)	1,5 (1,8)
Mediana (99. percentil)	3 (40)	1 (30)	1 (15)	1 (30)	2 (16)	1 (5)	1 (4)	1 (8)
Število ljudi: U (NU)	193 (322)	249 (186)	400 (307)	842 (815)	180 (311)	258 (216)	414 (357)	851 (884)
V zadnjem letu								
0	23,3 %	9,3 %	4,4 %	10,2 %	19,7 %	5,3 %	5,9 %	8,6 %
1	44,5 %	70,2 %	78,1 %	68,1 %	61,2 %	89,8 %	92,0 %	84,8 %
2	12,1 %	10,9 %	11,3 %	11,3 %	11,9 %	4,1 %	1,5 %	4,5 %
3–4	12,9 %	7,3 %	5,6 %	7,8 %	5,1 %	0,9 %	0,6 %	1,7 %
5–9	5,8 %	1,8 %	0,3 %	2,0 %	2,2 %	0,0 %	0,0 %	0,5 %
10+	1,5 %	0,5 %	0,3 %	0,6 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %
Povprečje ^a (SD)	1,8 (3,7)	1,3 (1,3)	1,2 (0,8)	1,4 (2,0)	1,1 (1,0)	1,0 (0,4)	1,0 (0,3)	1,0 (0,6)
Mediana (99. percentil)	1 (10)	1 (7)	1 (4)	1 (8)	1 (5)	1 (2)	1 (2)	1 (3)
Število ljudi: U (NU)	192 (321)	248 (185)	399 (306)	840 (812)	182 (315)	259 (217)	414 (357)	855 (889)

^a Povprečje ni najboljša mera, ker je razporeditev nesimetrična. Število ljudi, vključenih v različne analize, je različno, kar je odvisno od števila manjkajočih vrednosti za posamezne spremenljivke.

tih. Po drugi strani pa je več kot o enem partnerju v življenju poročalo precej manj žensk (57,9 %) in o najmanj desetih samo 5,6 %. Na povprečno število heteroseksualnih partnerjev v življenju (8,3 za moške in 3,2 za ženske; $p < 0,001$) so vplivali predvsem tisti z visokim številom. Starejši moški so poročali o višjem številu partnerk kot mlajši (povprečja: v starostni skupini 18–24 let: 6,5; 25–34 let: 7,9; 35–49 let: 9,5; $p < 0,001$). Za razliko od tega so ženske, stare 25–34 let poročale o višjem povprečnem številu partnerjev v življenju kot tiste, stare 35–49 let (povprečji: 3,4 in 3,1; $p < 0,001$). Za vse življenje, zadnjih 5 let in zadnje leto ter tudi v vseh starostnih skupinah so moški v povprečju poročali o višjem številu partnerk, kot je bilo povprečno število partnerjev, o katerih so poročale ženske (vsi $p < 0,001$).

Tabela 2 za moške in ženske prikazuje razporeditev različnih poročanih spolnih vedenj glede starosti oziroma rojstne kohorte. O vsaj enem novem heteroseksualnem spolnem partnerju v zadnjem letu je poročalo 22,7 % moških in 9,5 % žensk, med poročenimi ali živečimi v skupnem gospodinjstvu sta bila ustrezna deleža 8,9 % in 1,5 % in med poročenimi v preteklosti (razvezanimi, ločenimi in ovdovelimi) ali samskimi 43,1 % in 29,6 %. Med vsemi moškimi z novimi heteroseksualnimi partnerstvi v zadnjem letu je bilo 83,7 % samskih ali prej poročenih moških, čeprav so ti predstavljali le 40,4 % vseh moških. Ustrezni deleži za ženske so bili 88,3 % in 29,0 %. Povprečno število novih heteroseksualnih partnerjev v zadnjem letu je bilo 0,4 za moške in 0,1 za ženske ($p < 0,001$). Najpogosteje so nova partnerstva oblikovali mladi.

O vsaj enem vzporednem heteroseksualnem partnerju (varanju) v življenju je poročalo 35,3 % moških in 15,3 % žensk in da se je to zgodilo v zadnjih petih letih 24,4 % moških in 8,2 % žensk. V vseh obdobjih in v vseh starostnih skupinah je več moških

kot žensk poročalo o vzporednih heteroseksualnih partnerjih (vsi $p < 0,05$), z izjemo 18–24 let starih za obdobje preteklega leta ($p = 0,07$). Ker naj bi delež oseb z vzporednimi heteroseksualnimi partnerji v življenju naraščal s številom spolno aktivnih let, so bili poročani deleži višji med starejšimi kot mlajšimi moškimi. Nasprotno pa so ženske stare 18–24 let poročale o podobnem številu vzporednih moških partnerjev (17,4 %) kot ženske stare 25–34 in 35–49 let (15,5 %, 14,2 %).

Ženske smo vprašali »Kdaj, če sploh kdaj, je bilo zadnjikrat, ko vas je kakšen moški prisilil v spolni odnos?«, na kar jih je 12,0 % odgovorilo, da se jim je to zgodilo in 4,8 %, da se jim je to zgodilo v zadnjih petih letih. Deleži se niso razlikovali glede na starost ali zakonski stan.

Da so ženske že plačali za seks, je poročalo 4,4 % moških, 2,1 % samo enkrat in 0,9 % najmanj desetkrat. Povprečno število dogodkov plačanega seksa se je od 0,1 med 18–24 starimi zvišalo na 0,4 in 0,3 med moškimi starimi 25–34 in 35–49 ($p = 0,03$). Tujkam je že plačalo za seks 3,4 % moških. Moške in ženske smo tudi vprašali, ali so že prejeli plačilo za heteroseksualen seks, pri čemer je 0,9 % moških in 0,6 % žensk poročalo, da so ga že prejeli. Ustrezen delež je bil relativno visok med najmlajšimi ženskami, starimi 18–24 let in sicer 1,6 %, kar nakazuje, da prodajanje seksa postaja bolj pogosto, kot je bilo med njihovimi starejšimi vrstnicami ($p = 0,05$).

O heteroseksualnem seksu s tujci v zadnjih petih letih je poročalo 12,6 % moških in 12,2 % žensk. Pri zadnjem spolnem odnosu moških in žensk s tujcem najpogosteje ni šlo za stalnega heteroseksualnega partnerja (63,6 % in 38,8 %), sledili so zakonci (22,1 % in 36,2 %), stalni partnerji (8,1 % in 25,0 %) in za moške prostitutke (6,2 %). Da so imeli zadnji heteroseksualni spolni odnos s tujcem v tujini je poročalo 48,7 % moških in 25,9 % žensk in sicer samo v 5 % primerov v državi izven Evrope.

Tabela 2. Spolno vedenje moških in žensk glede starosti (rojstnih kohort), ŽSSZS 2000, Slovenija. ŽSSZS – raziskava Življenjski slog, stališča, zdravje in spolnost, U – uteženo število ljudi, NU – neuteženo število ljudi, SD – standardna deviacija.

Vedenje	Moški				Ženske			
	Starost v letih (rojstna kohorta)				Starost v letih (rojstna kohorta)			
	18–24	25–34	35–49	Vsi	18–24	25–34	35–49	Vsi
	(1975–82)	(1965–74)	(1950–64)		(1975–82)	(1965–74)	(1950–64)	
Nov heteroseksualni^a partner v zadnjem letu								
	44,7 %	21,2 %	13,1 %	22,7 %	31,4 %	5,0 %	2,6 %	9,5 %
Baze U (NU)	192 (321)	250 (187)	404 (310)	846 (818)	181 (313)	257 (216)	411 (354)	849 (883)
Število novih heteroseksualnih^a partnerjev v zadnjem letu glede zakonskega stanu								
Poročeni: povprečje (SD)	0 (0)	0,13 (0,5)	0,08 (0,3)	0,09 (0,3)	0 (0)	0 (0)	0,02 (0,2)	0,01 (0,1)
Število ljudi: U (NU)	3 (4)	95 (68)	300 (233)	398 (305)	10 (18)	154 (130)	340 (296)	505 (444)
Kohabit.: povprečje (SD)	0,51 (1,7)	0,10 (0,4)	0,15 (0,4)	0,17 (0,7)	0,07 (0,3)	0,07 (0,4)	0,04 (0,2)	0,06 (0,4)
Število ljudi: U (NU)	13 (21)	51 (39)	39 (28)	103 (88)	25 (45)	51 (42)	26 (22)	102 (109)
Bili por. ^b : povprečje (SD)	-	1 (-)	1,37 (2,1)	1,32 (2,0)	-	0,75 (1,2)	0,12 (0,3)	0,20 (0,5)
Število ljudi U (NU)	0 (0)	1 (1)	10 (7)	11 (8)	0 (0)	4 (3)	28 (22)	32 (25)
Samski: povprečje (SD)	1,16 (3,8)	0,62 (1,2)	0,26 (0,6)	0,87 (2,9)	0,54 (1,0)	0,23 (0,5)	0,09 (0,3)	0,43 (0,9)
Baze: U (NU)	163 (273)	92 (71)	41 (31)	296 (375)	138 (239)	47 (40)	17 (14)	202 (293)
Vsi: povprečje (SD)	1,10 (3,7)	0,32 (0,9)	0,14 (0,5)	0,40 (1,9)	0,44 (0,9)	0,07 (0,3)	0,03 (0,2)	0,13 (0,5)
Število ljudi: U (NU)	179 (298)	239 (179)	391 (300)	809 (777)	174 (303)	256 (215)	411 (354)	841 (872)
Vzporedni heteroseksualni^a partnerji (varanje)								
V življenju	25,7 %	30,2 %	43,1 %	35,3 %	17,4 %	15,5 %	14,2 %	15,3 %
Število ljudi: U (NU)	182 (304)	228 (170)	378 (290)	788 (764)	176 (305)	243 (205)	397 (343)	816 (853)
V zadnjih 5 letih	25,6 %	22,6 %	25,0 %	24,4 %	16,4 %	10,3 %	3,4 %	8,2 %
Število ljudi U (NU)	185 (309)	241 (181)	401 (307)	827 (797)	177 (307)	255 (214)	409 (353)	841 (874)
V zadnjem letu	10,7 %	10,9 %	16,5 %	13,5 %	6,4 %	2,6 %	1,4 %	2,8 %
Število ljudi: U (NU)	189 (317)	248 (186)	403 (309)	841 (812)	181 (313)	257 (216)	414 (357)	852 (886)
Plačali za seks ženski								
V življenju	3,2 %	5,4 %	4,5 %	4,4 %	-	-	-	-
Število ljudi: U (NU)	193 (323)	250 (187)	392 (300)	836 (810)	-	-	-	-
V zadnjih 5 letih	2,9 %	3,8 %	1,7 %	2,6 %	-	-	-	-
Število ljudi: U (NU)	193 (323)	253 (189)	392 (300)	839 (812)	-	-	-	-
Imeli heteroseksualnega^a partnerja tujca								
V življenju	18,9 %	22,0 %	27,7 %	24,0 %	17,9 %	19,1 %	24,1 %	21,3 %
Število ljudi: U (NU)	193 (323)	254 (190)	401 (307)	848 (820)	182 (315)	256 (215)	412 (356)	850 (886)
V zadnjih 5 letih	17,0 %	10,4 %	11,8 %	12,6 %	16,6 %	10,9 %	11,1 %	12,2 %
Število ljudi: U (NU)	191 (320)	252 (188)	403 (309)	846 (817)	182 (315)	256 (215)	410 (354)	848 (884)

Število heteroseksualnih^a spolnih odnosov (dogodkov) v zadnjih 4 tednih								
0	46,7 %	21,7 %	14,4 %	24,5 %	36,0 %	13,0 %	14,0 %	18,6 %
1–4	17,2 %	24,7 %	28,3 %	24,5 %	20,0 %	28,3 %	34,1 %	29,1 %
5–9	12,9 %	21,5 %	28,1 %	22,4 %	20,1 %	25,1 %	30,4 %	26,4 %
10–29	21,3 %	32,2 %	29,2 %	28,2 %	22,9 %	33,2 %	21,6 %	25,5 %
30+	1,9 %	0 %	0 %	0,5 %	1,0 %	0,5 %	0 %	0,4 %
Povprečje (SD)	5,2 (8,8)	6,3 (5,6)	6,5 (5,3)	6,1 (6,5)	5,5 (7,6)	7,0 (5,8)	5,6 (4,6)	6,0 (5,8)
Mediana (99. percentil)	2 (50)	5 (20)	5 (25)	5 (25)	3 (25)	6 (20)	5 (20)	5 (20)
Število ljudi: U (NU)	190 (317)	243 (182)	350 (269)	783 (768)	176 (304)	242 (203)	365 (315)	783 (822)
Število heteroseksualnih^a spolnih odnosov (dogodkov) v zadnjih 4 tednih glede zakonskega stanu								
Poročen/koh: ^b pov. (SD)	14,4 (19)	7,6 (5,3)	7,3 (5,2)	7,6 (6,3)	8,7 (6,5)	7,7 (5,8)	6,1 (4,5)	6,8 (5,2)
Število ljudi: U (NU)	15 (25)	141 (104)	287 (222)	443 (351)	32 (57)	190 (159)	323 (281)	545 (497)
Bili por. ^b : povpr. (SD)	-	10 (-)	2,5 (4,0)	3,1 (4,4)	-	5,8 (5,3)	3,0 (5,2)	3,4 (5,1)
Število ljudi: U (NU)	0 (0)	1 (1)	15 (11)	17 (12)	0 (0)	4 (3)	26 (20)	29 (23)
Samski: povprečje (SD)	4,4 (6,8)	4,4 (5,6)	2,9 (4,6)	4,2 (6,2)	4,8 (7,6)	4,2 (4,9)	1,0 (2,4)	4,3 (6,9)
Število ljudi: U (NU)	175 (292)	100 (77)	48 (36)	323 (405)	143 (246)	48 (41)	17 (14)	208 (301)
Vsi: povprečje (SD)	5,2 (8,8)	6,3 (5,6)	6,5 (5,3)	6,1 (6,5)	5,5 (7,6)	7,0 (5,8)	5,6 (4,6)	6,0 (5,8)
Število ljudi: U (NU)	190 (317)	243 (182)	350 (269)	783 (768)	176 (304)	242 (203)	365 (315)	783 (822)

^a Partnerjev drugega spola

^b Bili poročeni v preteklosti (ločeni, razvezani, vdovci)

^c Poročeni ali živijo skupaj

Število ljudi vključenih v različne analize je različno, kar je odvisno od števila manjkajočih vrednosti za posamezne spremenljivke.

Med moškimi in ženskami ni bilo razlik v pogostosti heteroseksualnih spolnih odnosov v zadnjih štirih tednih (mediana: 5), a so imeli stari 18–24 let v povprečju manj spolnih odnosov kot starejši ($p < 0,001$). Ker je seks »bolj dosegljiv«^c poročenim in tistim, ki živijo s partnerjem, so ti imeli višje povprečno število spolnih odnosov v primerjavi z ostalimi ($p < 0,001$ za oba spola).

Skoraj vsi ljudje so poročali, da so že imeli vaginalni spolni odnos (tabela 3). Oralni heteroseksualni seks je bil tudi precej pogost (felacija: 79,3 % moških, 72,7 % žensk in kunilingus: 78,1 % moških in 77,3 % žensk). Da so že imeli heteroseksualni analni spolni odnos je poročalo 31,6 % moških in 22,3 % žensk.

O homoseksualnih izkušnjah (npr. poljubljanje, ljubkovanje) je poročal majhen delež moških (3,3 %) in žensk (3,6 %) in še manjši delež je poročal o homoseksualnih spolnih odnosih (oralni in analni seks med moškimi (1,0 %) in oralni med ženskami (0,9 %)). Večina moških, ki je poročala o homoseksualnih spolnih odnosih, je bila v času raziskave poročena ali so bivali s partnerko v skupnem gospodinjstvu.

O dosledni uporabi kondomov pri vaginalnih ali analnih spolnih odnosih v zadnjih štirih tednih je poročalo 11,6 % moških in 9,1 % žensk in dodatnih 14,7 % moških in 9,9 % žensk o nedosledni uporabi. Dosledna in nedosledna uporaba

Tabela 3. Heteroseksualne prakse moških in žensk glede starosti (rojstnih kohort), ŽSSZS, 2000, Slovenija. ŽSSZS – raziskava Življenjski slog, stališča, zdravje in spolnost, U – uteženo število ljudi, NU – neuteženo število ljudi, SD – standardna deviacija.

Vedenje	Moški				Ženske			
	Starost v letih (rojstna kohorta)				Starost v letih (rojstna kohorta)			
	18–24 (1975–82)	25–34 (1965–74)	35–49 (1950–64)	Vsi	18–24 (1975–82)	25–34 (1965–74)	35–49 (1950–64)	Vse
Heteroseksualne prakse v življenju								
Vaginalni spolni odnos	84,2 %	97,1 %	99,1 %	95,2 %	85,0 %	99,1 %	99,8 %	96,3 %
Število ljudi: U (NU)	192 (321)	257 (192)	408 (312)	857 (825)	183 (317)	256 (215)	403 (348)	842 (880)
Oralni spolni odnos ^a	71,6 %	88,1 %	85,9 %	83,3 %	74,3 %	91,0 %	76,2 %	80,2 %
Število ljudi: U (NU)	191 (319)	250 (187)	388 (297)	829 (803)	181 (314)	251 (210)	397 (343)	829 (867)
Analni spolni odnos	25,2 %	42,4 %	27,9 %	31,6 %	19,6 %	30,6 %	18,3 %	22,3 %
Število ljudi: U (N)	191 (319)	246 (184)	383 (294)	821 (797)	180 (312)	254 (213)	392 (339)	826 (864)
Ne-penetrantni seks ^b	75,0 %	85,2 %	73,2 %	77,3 %	69,8 %	77,2 %	63,4 %	69,0 %
Število ljudi: U (NU)	193 (323)	253 (189)	386 (296)	832 (808)	183 (317)	250 (210)	395 (341)	828 (868)
Heteroseksualne prakse v zadnjem letu								
Vaginalni spolni odnos	77,4 %	90,5 %	96,0 %	90,2 %	79,3 %	95,1 %	93,6 %	91,0 %
Število ljudi: U (NU)	192 (321)	257 (192)	408 (312)	857 (825)	183 (314)	251 (210)	497 (343)	829 (880)
Oralni spolni odnos ^a	62,9 %	82,1 %	76,9 %	75,3 %	68,4 %	81,5 %	63,4 %	70,0 %
Število ljudi: U (NU)	191 (319)	250 (187)	388 (297)	829 (803)	181 (314)	251 (210)	397 (343)	829 (867)
Analni spolni odnos	18,1 %	24,7 %	16,2 %	19,2 %	14,6 %	16,7 %	10,9 %	13,5 %
Število ljudi: U (NU)	191 (319)	246 (184)	383 (294)	821 (797)	180 (312)	254 (213)	392 (339)	826 (864)
Ne-penetrantni seks ^b	63,8 %	73,1 %	58,5 %	64,2 %	63,1 %	61,2 %	46,0 %	54,4 %
Število ljudi: U (NU)	193 (323)	253 (189)	386 (296)	832 (808)	183 (317)	250 (210)	395 (341)	828 (868)

^a Kunilingus ali felacija

^b Genitalni stik brez spolnega odnosa (penetracije)

Število ljudi vključenih v različne analize je različno, kar je odvisno od števila manjkajočih vrednosti za posamezne spremenljivke.

kondomov je bila bolj pogosta med samskimi ali prej poročenimi moškimi in ženskami v primerjavi s poročenimi in živječimi skupaj s partnerjem ($p < 0,05$). Poleg tega je bila dosledna uporaba kondomov v zadnjem letu bolj pogosta med tistimi z vsaj dvema heteroseksualnima partnerjema v primerjavi s tistimi, ki so v zadnjem letu imeli enega samega heteroseksualnega partnerja ($p < 0,05$), in nedosledna uporaba med tistimi s številnimi heteroseksualnimi partnerji (moški: $p < 0,05$, ženske: $p = 0,09$).

RAZPRAVA

Naši rezultati predstavljajo prve zanesljive ocene pogostosti različnih vzorcev spolnega vedenja med 18–49 let stari prebivalci Sloveniji. Kažejo veliko raznolikost spolnega vedenja med posamezniki različnih starosti, moškimi in ženskami in med osebami z različnim zakonskim stanom.

Naši rezultati so najbolj primerljivi z rezultati britanske raziskave iz leta 2000 (NATSAL 2000), ker smo uporabili podobne metode zbiranja podatkov, smo podatke

zbirali sočasno in smo imeli verjetnostne vzorce splošnega prebivalstva, čeprav smo v raziskavo vključili ljudi malo drugačnih starosti (slovenska raziskava: 18–49 let, britanska raziskava: 16–44 let) (13). Na primer, Britanci so poročali o višjem številu heteroseksualnih partnerjev v življenju (povprečje za moške in ženske: Britanci: 12,7 in 6,5; Slovenci: 8,3 in 3,2); več moških je poročalo o spolnih odnosih z moškimi v zadnjih petih letih (Britanci: 2,6 %; Slovenci: 0,6 %) in da so v zadnjih petih letih ženski plačali seks (Britanci: 4,2 %; Slovenci: 2,6%). V zadnjem letu je tudi več moških in žensk poročalo o novih heteroseksualnih partnerjih (povprečje: Britanci: 0,8 in 0,4; Slovenci: 0,4 in 0,1) in več žensk o vzporednih heteroseksualnih partnerjih (Britanke: 9,0 %; Slovenke: 2,8 %). Edino višje tvegano spolno vedenje za okužbo s HIV, ki je bilo v Sloveniji poročano pogosteje kot v Britaniji, so bili heteroseksualni analni spolni odnosi (britanski moški in ženske: 12,2 % in 11,3 %; slovenski moški in ženske: 31,6 % in 22,3 %).

Metodološke jakosti naše raziskave so bile odličen vzorčni okvir (Centralni register prebivalstva), verjetnostno vzorčenje, uporaba temeljito pretestiranih in pilotiranih metod zbiranja podatkov in uporaba ustreznih statističnih metod za analize kompleksnih podatkov iz presečnih raziskav z upoštevanjem stratifikacije, kopičenja vzorca in uteževanja (10–11). Anonimno samoizpolnjevanje knjižic z občutljivejšimi vprašanji je verjetno doprineslo k resničnosti poročanih po-

datkov. Možne slabosti bi lahko bile pristranost vzorca zaradi nesodelovanja nekaterih povabljenih k sodelovanju in vedno delno vprašljiva verodostojnost podatkov zbranih z anketiranjem. Zelo verjetno smo podcenili nekatere vzorce visoko tveganega spolnega vedenja, ki so zelo stigmatizirani, na primer delež moških, ki imajo spolne odnose z moškimi.

ZAKLJUČKI

Naši rezultati predstavljajo prve zanesljive ocene pogostosti različnih spolnih vedenj med 18–49 let starimi prebivalci v Sloveniji in kažejo veliko raznolikost spolnega vedenja. Spolno vedenje splošnega prebivalstva v Sloveniji je v povprečju relativno nizko tvegano za prenos okužbe s HIV in drugih SPO. Naši rezultati so osnova za bolj poučeno promocijo spolnega in reproduktivnega zdravja in morebitno sledenje sprememb spolnega vedenja v času. Rezultati so posebno pomembni tudi zato, ker so bili prvi rezultati o spolnem vedenju v verjetnostnem vzorcu splošnega prebivalstva v eni izmed držav srednje Evrope (14).

ZAHVALA

Zahvaljujem se sodelujočim v raziskavi, anketarkam in številnim, ki so doprinesli k načrtovanju in izvedbi raziskave ter interpretaciji rezultatov: Marti Arnež, Zdenki Blejec, Marti Grgič-Vitek, Richardu Hayesu, Zdenki Kastelic, Andreju Kvedru, Marjanu Premiku, Lauri C. Rodrigues, Igorju Švabu, Helen A. Weiss, Kaye Wellings in Metki Zaletel.

LITERATURA

1. Klavs I, Rodrigues LC, Wellings K, et al. Prevalence of genital Chlamydia trachomatis infection in the general population of Slovenia: serious gaps in control. *Sex Transm Infect.* 2004; 80 (2): 121–3.
2. Klavs I, Rodrigues LC, Wellings K, et al. Increased condom use at sexual debut in the general population of Slovenia and association with subsequent condom use. *AIDS.* 2005; 19 (11): 1215–23.
3. Grgič-Vitek M, Švab I, Klavs I. Prevalence of and risk factors for self-reported sexually transmitted infections in Slovenia in 2000. *Croat Med J.* 2006; 47 (5): 722–9.
4. Klavs I, Rodrigues LC, Weiss HA, et al. Factors associated with early sexual debut in Slovenia: results of a general population survey. *Sex Transm Infect.* 2006; 82 (6): 478–83.
5. Klavs I, Hamers FF. Male circumcision in Slovenia: results from a national probability sample survey. *Sex Transm Infect.* 2008; 84 (1): 49–50.
6. Klavs I, Grgič-Vitek M. The burden of genital warts in Slovenia: results from a national probability sample survey. *Euro Surveill.* 2008; 13 (45): pii: 19032.
7. Klavs I, Rodrigues LC, Wellings K, et al. Sexual behaviour and HIV/sexually transmitted infection risk behaviours in the general population of Slovenia, a low HIV prevalence country in central Europe. *Sex Transm Infect.* 2009; 85 (2): 132–8.
8. Bernik I, Klavs I. *Spolno življenje v Sloveniji.* Maribor: Aristej; 2011.
9. Johnson AM, Wadsworth J, Wellings K, et al. *Sexual Attitudes and Lifestyles.* Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1994.
10. Klavs I, Rodrigues LC, Wellings K, et al. Feasibility of testing for Chlamydia trachomatis in a general population sexual behaviour survey in Slovenia. *Int J STD AIDS.* 2002; 13 Suppl 2: 5–8.
11. Klavs I, Keše D, Švab I. Slovene national survey of sexual lifestyles, attitudes and health: Preparatory work and feasibility study. *Zdrav Var* 2006; 45 (3): 117–25.
12. Klavs I, Keše D, Švab I. Slovene national survey of sexual lifestyles, attitudes and health, 199–2001: Data collection methods. *Zdrav Var* 2007; 46 (1): 1–8.
13. Johnson AM, Mercer CH, Erens B, et al. Sexual behaviour in Britain: partnerships, practices, and HIV risk behaviours. *Lancet* 2001; 358 (9296): 1835–42.
14. Wellings K, Collumbien M, Slaymaker E, et al. Sexual behaviour in context: global perspective. *Lancet* 2006; 368 (9558): 1706–28.

Mojca Matičič¹

Sodoben pristop k diagnostični obravnavi bolnikov s spolno prenosljivo okužbo v vsakodnevni klinični praksi: smo v Sloveniji na pravi poti?

A Modern Approach to Diagnostic Management of Sexually Transmitted Infections under Daily Clinical Conditions: Experiences from Slovenia

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: spolno prenosljive okužbe, Slovenija, nacionalne usmeritve, MSM

Spolno prenosljive okužbe so globalno razširjene in predstavljajo veliko javno zdravstveno breme. Pogosto potekajo brez bolezenskih znakov in so povezane s stigmo, kar otežuje pravočasno odkritje in omogoča nemi prenos s tveganim spolnim vedenjem. Pri okuženem lahko pripeljejo celo do življenje ogrožajočih posledic, prenašajo se lahko z okužene matere na plod oz. novorojenca. Temeljni ukrepi sodobne diagnostične obravnave spolno prenosljivih okužb vključujejo: zavedanje o problematiki, zgodnje odkrivanje, razpoložljivost ustreznih laboratorijskih zmožnosti in izvajanje potrebnih raziskav ter epidemiološki nadzor in nadzor nad odpornostjo spolno prenosljivih mikrobov. Prispevek prikazuje epidemiološke značilnosti spolno prenosljivih okužb v Sloveniji – še posebej stanje v skupinah z velikim tveganjem za okužbo, sodoben pristop k diagnostični obravnavi spolno prenosljivih okužb v vsakodnevni praksi in izvajanje diagnostične obravnave spolno prenosljivih okužb na nacionalni ravni. V zadnjem delu predstavljamo usmeritve za prihodnost, s katerimi bi lahko obvladovanje spolno prenosljivih okužb v Sloveniji pripeljali na zavidljivo raven.

ABSTRACT

KEY WORDS: sexually transmitted infections, Slovenia, national guidelines, MSM

Sexually transmitted infections are widely spread and represent a huge public health burden. They are often asymptomatic and stigmatized, which prevents them from being promptly recognised. This in turn leads to further spread of infection through risky sexual behaviour, life threatening complications in an infected person and to transmission of infection from infected mother to foetus or newborn. The key points for diagnostic management of sexually transmitted infections include: awareness of the pro-

¹ Izr. prof. dr. Mojca Matičič, dr. med., Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Japljeva ulica 2, 1525 Ljubljana; mojca.maticic@kclj.si

blem; early detection; laboratory infrastructure capacities with the necessary testing methods; epidemiological surveillance and microbiological surveillance of resistant sexually transmitted microbes. This review presents epidemiological characteristics of sexually transmitted infections in Slovenia with the focus on high risk populations. We emphasize modern approach to diagnostic management of sexually transmitted infections and its applications in daily life situations in Slovenia. We conclude the review by outlining future directions to improve the management of sexually transmitted infections on the national level in Slovenia.

UVOD

Svetovna zdravstvena organizacija (SZO) je leta 2001 ocenila, da se spolno prenosljive okužbe (SPO) pojavljajo v pandemični obliki (1). Gre za ene najpogostejše zaznanih okužb v svetu, saj je leta 1990 za t. i. ozdravljivimi SPO (sifilis, gonoreja, klamidijaska okužba in trihimoza) zbolelo nad 250 milijonov ljudi, leta 2005 pa je letna incidenca narasla na 448 milijonov v starosti 15–49 let (1–4). Če tovrstnim SPO pridružimo še virusne, kot je okužba s humanim virusom papiloma (angl. *human papilloma virus*, HPV), ki je najpogostejša SPO, virusom herpesa simpleksa (angl. *herpes simplex virus*, HSV), HIV, ki je v pomembnem soodnosu z epidemiologijo ostalih SPO in s katerim je v svetu okuženih skoraj 35 milijonov ljudi, ter spolno pridobljeno okužbo z virusom hepatitisa B (angl. *hepatitis B virus*, HBV) s še dodatnih 350 milijoni okuženih, ter redko, a možno spolno prenosljivim virusom hepatitisa C (angl. *hepatitis C virus*, HCV) s 170 milijoni okuženih, postane današnji »bazen« okuženih, ki so vir prenosa mikrobov s tveganim spolnim stikom, ogromen (5–7). V novem tisočletju pa tudi znotraj samih SPO beležimo številne spremembe, tako zaradi razvoja specifičnih diagnostičnih in preventivnih metod (cepivo), pojava in naraščanja odpornosti spolno prenosljivih mikrobov na priporočene protimikrobne učinkovine kot tudi zaradi sprememb v načinu spolnega vedenja. Če je imela npr. konec prejšnjega tisočletja vodilno vlogo

med bakterijskimi SPO *Chlamydia trachomatis*, ji SZO danes povsem enakovredno ob bok postavlja bakterijo *Neisseria gonorrhoeae*, s katero se je v svetu samo leta 2008 na novo okužilo 106 milijonov ljudi (4). Če smo konec prejšnjega tisočletja beležili upad incidence sifilisa, v novem tisočletju spremljamo njegov porast, še posebej v določenih skupinah s tveganim spolnim vedenjem (5).

Zaradi številnih izjemnosti diagnostična obravnava SPO v vsakodnevni klinični praksi zavzema posebno mesto in jo je tako potrebno tudi obravnavati (5). Že zaradi samega načina prenosa številni socialni, antropološki, religiozni in drugi vzroki predstavljajo veliko oviro pri odkrivanju SPO, saj še vedno nosijo pečat stigmatizacije:

- so prenosljive, bodisi s heteroseksualnim bodisi z istospolnim stikom z okuženo osebo,
- prenašajo se lahko z okužene matere na novorojenčka,
- nekatere trajajo doživljenjsko,
- za nekatere ne poznamo zdravila in
- lahko so tudi smrtne.

Nepoznavanje ali napačne in nasprotujoče si informacije o SPO lahko vodijo do strahu pred diagnostično obravnavo v povezavi z načinom njihovega odkrivanja in zdravljenjem, še posebej če gre za socialno ali geografsko majhna področja (3). Pomembno oviro pri diagnostični obravnavi oz. odkrivanju SPO predstavlja tudi

dejstvo, da jih večina lahko poteka brez-simptomno in bolnika k zdravniku privedejo šele posledice nezdravljenih ali nepravilno zdravljenih SPO, ki so lahko kronične narave, lahko celo ogrozijo življenje zbolelega, okužba pa se lahko prenese na spolnega partnerja ali plod oz. novorojenca.

Po kriterijih SZO in Evropskega Centra za nadzor nad boleznimi (angl. *European Center for Disease Control, ECDC*) temeljni ukrepi sodobne diagnostične obravnave bolnikov s sumom na SPO vključujejo (8, 9):

- zavedanje o problematiki,
- zgodnje odkrivanje,
- razpoložljivost ustreznih laboratorijskih zmožnosti in izvajanje potrebnih raziskav ter
- epidemiološki nadzor in nadzor nad odpornostjo spolno prenosljivih mikrobov.

Za uspešno izvajanje diagnostične obravnave SPO v vsakodnevni klinični praksi tako na nivoju posameznika kot na nivoju epidemiološkega širjenja okužbe so torej v posamezni državi ključnega pomena: ustrezna strokovna raven medicinske stroke, organizacija zdravstvene službe za obvladovanje SPO na nacionalnem nivoju ter sodoben pristop k diagnostiki SPO v vsakodnevni klinični praksi upoštevajoč svetovne trende in nacionalne posebnosti.

EPIDEMIOLOŠKE ZNAČILNOSTI SPOLNO PRENOSLJIVIH OKUŽB V SLOVENIJI

Gibanje SPO v Sloveniji v grobem ne odstopa od tistega v drugih evropskih državah, z nekaj izjemami (5). Po podatkih Nacionalnega inštituta za javno zdravje RS (NIJZ) je bilo leta 2013 prijavljenih 1189 primerov SPO, po pogostosti: genitalne bradavice (n = 466), klamidijske okužbe (n = 248), nespecifični uretritis (n = 234), genitalni herpes (n = 113), sifilis (n = 65; 35 primerov zgodnjega sifilisa) in gonoreja

(n = 62) (10). Leto poprej je bilo zabeleženih precej manj primerov genitalnih bradavic (n = 249), skoraj tretjino manj primerov gonoreje (n = 45) in za 56 % več primerov primarnega sifilisa (n = 63) (11). Realnega podatka o bremenu tovrstnih SPO zagotovo nimamo, o čemer zgovorno priča tudi podatek, da je bilo v obdobju od 2007 do 2010 epidemiološki službi prijavljenih le 35,8 % klamidijskih okužb, ki so bile prepoznane z ustreznimi mikrobiološkimi diagnostičnimi preiskavami na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani (10). Slovenija se z oceno prevalence HBsAg pod 1 % uvršča med države z nizko prevalenco okužbe s HBV. V letu 2012 je bilo v Sloveniji 45 novo odkritih okužb s HIV (21,9/1.000.000 prebivalcev), glavnina primerov med moškimi, ki imajo odnose z moškimi (angl. *men who have sex with men, MSM*) (11). Ker je veliko okuženih s HIV diagnosticiranih relativno pozno, podatki o prijavljenih novih diagnozah okužbe s HIV podcenjujejo dejansko breme.

Vzrokov za tako stanje je več in tičijo v nedoslednem prijavljanju SPO epidemiološki službi s strani različnih zdravnikov specialistov, predvsem pa v odsotnosti diagnostike SPO, saj se jih zaradi brezsimptomnega poteka okuženi ne zaveda, zato tudi ne išče ustrezne zdravniške pomoči. Po drugi strani pa nam aktivno iskanje okuženih, ki so brez simptomov, še posebej v skupinah z velikim tveganjem za okužbo (npr. MSM), z ustreznimi diagnostičnimi preiskavami lahko prikaže povsem drugačno podobo bremena SPO v Sloveniji. Raziskave so pokazale, da se stopnje tveganja za prenos različnih SPO med seboj razlikujejo (3). Stopnja tveganja za prenos SPO pri enkratni izpostavitvi ob nezaščitenem heteroseksualnem spolnem stiku je za gonorejo ocenjena na 20-50 %, za sifilis do 60 % in za HIV v povprečju pod 0,5 % , v populaciji MSM

pa kar 1–3 % (12, 13). Prisotnost genitalnih razjed lahko dramatično zveča tveganje za okužbo s HIV in najverjetneje tudi z drugim SPO. Prenos gonoreje in klamidijske okužbe je enako učinkovit tako pri heteroseksualnem spolnem stiku kot pri MSM in je ocenjen med 20 % in 90 % (14). Ker vse SPO lahko potekajo brezsimptomno, je edini način za njihovo razkritje zavedanje o tveganju za okužbo in ustrezna mikrobiološka diagnostika.

SKUPINE Z VEČJIM TVEGANJEM ZA SPOLNO PRENOSLJIVE OKUŽBE V SLOVENIJI

Tvegano spolno vedenje vključuje zgoden vstop v spolno življenje, nezaščitene oralne, vaginalne ali analne spolne odnose, veliko število in pogosto menjavanje spolnih partnerjev ter spolne odnose z osebo iz skupine z večjim tveganjem ali znano okužbo. Pogostejše je znotraj določenih skupin, kot so MSM, spolni delavci in delavke ter uživalci in uživalke nedovoljenih drog. Posebno okoliščino predstavljajo potovanja, saj je znano, da je tveganje za SPO med potovanjem do trikrat večje kot v domačem okolju; kar 5–51 % potnikov se namreč na kratkotrajnih potovanjih predaja priložnostnim spolnim odnosom, delež pa je še mnogo večji pri daljši trajajočih potovanjih (15). Izvajanje ustreznih diagnostičnih postopkov za aktivno odkrivanje SPO v teh populacijah je v Sloveniji dokaj skopo.

V zadnjih letih imamo na voljo še največ podatkov o SPO v skupini MSM, ki je v Sloveniji najpogosteje okužena s HIV, zelo pa je izpostavljena tudi ostalim SPO:

- porastu sifilisa (z nebolečo primarno lezijo večinoma v ustni votlini ali zadnjiku),
- porastu odpornih sevov *N. gonorrhoeae* in hitro napredujočem spolno pridobljenem hepatitisu C, katerega prvi primer, prinešen iz tujine, smo že zabeležili, in

- okužbi s HPV, povezani z rakom zadnjika in spolovila (10, 11).

Raziskave so pokazale, da se v Sloveniji MSM vedejo precej tvegano, saj jih le dobra polovica redno uporablja kondom, slaba petina pa sploh nikoli (10). Leta 2011 je imelo od 342 HIV-pozitivnih, med katerimi je večina MSM (76 %), kar 30 % klinično sliko in/ali serološke označevalce sifilisa; pri polovici je bila diagnoza sifilisa ugotovljena hkrati z okužbo s HIV (16). Leta 2012 je bila polovica vseh prijavljenih primerov gonoreje diagnosticirana pri MSM (11). Aktivno iskanje gonoreje v tej skupini je v raziskavi, izvedeni istega leta pri 306 brezsimptomnih MSM, razkrilo prisotnost *N. gonorrhoeae* kar pri 4,2 % MSM, od tega pri 2,3 % v žrelu; v manjši skupini 67 MSM je bila brezsimptomna gonoreja prisotna v zadnjiku pri 9,2 % (17). Najnovejša raziskava je razkrila, da je imelo kar 88 od 135 MSM, vključenih v raziskavo, v analnem kanalu prisoten beta humani virus papiloma, značilno pogosteje pa tisti, ki so okuženi s HIV (18).

Za ostale skupine z zvečanim tveganjem za SPO žal večinoma nimamo tovrstnih podatkov, opravljenih pa je bilo nekaj raziskav, ki posredno nakazujejo na stanje okužb v določenih populacijah.

V manjši raziskavi populacije oseb, ki so obiskale ambulanto za SPO, je bila seroprevalenca genitalnega herpesa 24,11 %, medtem ko je v splošni populaciji znašala le 8,6 % (19). Prevalenca *C. trachomatis* v teh ambulantah je bila med leti 1999 in 2003 pri heteroseksualnih moških 19,5 % (334/1714) in pri ženskah 10,7 % (96/892); najvišja je bila v starostni skupini 15–30 let (20).

Med mladimi vojaškimi rekruti celjske regije je bila v letih 1999–2001 ugotovljena prevalenca brezsimptomnega klamidijskega uretritisa pri 2,6 % (21).

V obsežni raziskavi o prisotnosti brezsimptomne klamidijske okužbe v splošni

populaciji, stari med 18–49 let, ki jo je leta 2000 izvedel Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije (IVZ RS), je bila odkrita visoka prevalenca klamidijske okužbe moških in žensk, starih med 18–24 let (4,1 % v obeh skupinah), od tega v starosti 20–24 let kar 5,1 % za ženske in 4,6 % za moške (22).

V nacionalni presečni raziskavi splošne populacije žensk na obisku pri ginekologu, starih med 20–64 let, je bilo leta 2010 ugotovljeno, da jih je bilo skoraj 60 % seropozitivnih na vsaj en visoko rizičen genotip HPV, 12 % pa je aktualno imelo prisoten virus v materničnem vratu (10).

SODOBEN PRISTOP K DIAGNOSTIČNI OBRAVNAVI SPOLNO PRENOSLJIVIH OKUŽB V VSAKODNEVNI KLINIČNI PRAKSI

Diagnostiko okužbe s SPO opravljamo zaradi različnih razlogov: bolezenskih znakov, zaskrbljenosti po tveganem spolnem vedenju ali v okviru obdobjnega rednega testiranja oseb iz skupin z večjim tveganjem. Problem pri odkrivanju SPO ostajajo brezsimptomni bolniki brez prepoznanih tveganj, zato je epidemiološka anamneza ključ do uspeha. Še vedno živimo v času, ko pogovori o spolnosti niso brez zadreg, bolezn, ki jih s sabo prinašajo tovrstna tveganja, pa žal še vedno močno stigmatizirane. Zato je potreben ustrezen prostor, kjer bo pogovor o tovrstnih tveganjih lahko stekel brez motečih dejavnikov, pacientu pa je potrebno zagotoviti molčečnost in si vzbuditi njegovo zaupanje.

Pri sumu na SPO poizvemo o tem, kdaj je bil zadnji tvegan spolni odnos, kakšni so pacientovi načini spolne prakse, o številu spolnih partnerjev v zadnjih šestih mesecih, spolnih odnosih za denar, pripadnosti določeni skupini z velikim tveganjem za okužbo ipd. Poleg tega poizvemo seveda še o zdravstvenih težavah oz. ra-

zlogu za obisk v ambulanti. Ko si na podlagi pacientovih težav in anamnestičnih podatkov izdelamo delovno diagnozo, razložimo diagnostične postopke.

Ker imamo na voljo dobro dostopne, hitre in zanesljive mikrobiološke preiskave, je v razvitem svetu zdravljene SPO vzročno in ne sindromno. Opravimo testiranje na SPO, prisotne v našem epidemiološkem prostoru, z obrazložitvijo, da dokaz SPO z enim povzročiteljem lahko pomeni tudi hkratno okužbo z več drugimi (tabela 1). Pacientu razložimo način odvzema kužnin za ustrezne preiskave (bris sečnice, nožnice, materničnega vratu, glede na način tveganja pa tudi žrela in zadnjika). Za oceno aktivnosti vnetja pregledamo omejene brise z mikroskopom pri 1.000-kratni povečavi (število polimorfonuklearnih celic v vidnem polju), za morebitno oceno povzročitelja pa z barvanjem preparata po Gramu (npr. z metilenskim modrilom). S specifičnimi mikrobiološkimi preiskavami v teh kužninah dokazujemo prisotnost bakterij *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, *Trichomonas vaginalis*, urogenitalnih mikoplazem ter morebitnih drugih patogenih bakterij. Pregledamo urin, nativno in z urinokulturo. S serološkimi preiskavami testiramo kri na okužbo s HIV, HBV, HCV in spiroheto *T. pallidum*. Po potrebi odvzamemo tudi izcedek prostate. Ob prisotnosti razjed odvzamemo bris sprememb za mikrobiološke preiskave.

Posebej se z osebo pogovorimo glede testiranja na okužbo s HIV. Pri vodenju pogovora pred testiranjem na okužbo s HIV so nam v pomoč priporočila v obliki desetih opornih točk. Gre za smiselno zaporedje vprašanj, razlag in ocen, ki svetovalcu razkrijejo najpomembnejše značilnosti preiskovanca, testirana oseba pa prejme vse potrebne informacije in priporočila za nadaljnje življenje.

Vsak rezultat diagnostične obravnave SPO zahteva ustrezno razlago tako v primeru negativnega (inkubacijska doba,

Tabela 1. Priporočila za odkrivanje spolno prenosljivih okužb. VDRL – angl. *venereal diseases research laboratory*, RPR – angl. *rapid plasmin reagin*, TPHA – angl. *Treponema pallidum hemagglutination assay*, FTA-ABS – angl. *fluorescent treponemal antibody absorbed*, CIA – angl. *chemiluminescence immunoassay*, EIA – angl. *enzyme immunoassay*, HSV-1 – virus herpesa simpleksa tipa 1, HSV-2 – virus herpesa simpleksa tipa 2, HAV – virus hepatitisa A (angl. *hepatitis A virus*), HBV – virus hepatitisa B (angl. *hepatitis B virus*), HCV – virus hepatitisa C (angl. *hepatitis C virus*), HIV – človeški virus imunske pomanjkljivosti (angl. *human immunodeficiency virus*), PCR – verižna reakcija s polimerazo (angl. *polymerase chain reaction*).

Klinični sindrom (povzročitelj/bolezni)	Preiskave
<p>Urethritis/cervicitis: <i>Neisseria gonorrhoeae</i>, <i>Chlamydia trachomatis</i>, <i>Mycoplasma hominis</i>, <i>Mycoplasma genitalium</i>, <i>Ureaplasma urealyticum</i>, HSV-1 in HSV-2</p>	<p><i>Neisseria gonorrhoeae</i>: bris z vseh mest penetracije:</p> <ul style="list-style-type: none"> • sečnice/materničnega vratu za direktno mikroskopiranje, osamitev ali PCR, • žrela/zadnjika za direktno mikroskopiranje, osamitev. <p><i>Chlamydia trachomatis</i>: bris z vseh mest penetracije:</p> <ul style="list-style-type: none"> • sečnice/materničnega vratu za kulturo ali PCR, • žrela/zadnjika za kulturo in/ali urin za PCR. <p><i>Mycoplasma hominis</i>, <i>Ureaplasma urealyticum</i>^a: bris sečnice/materničnega vratu za PCR (osamitev).</p> <p><i>Mycoplasma genitalium</i>^a: bris sečnice/materničnega vratu za PCR.</p> <p><i>Trichomonas vaginalis</i>:</p> <ul style="list-style-type: none"> • mikroskopiranje prvega jutranjega urina, • bris sečnice/materničnega vratu za osamitev ali PCR. <p>HSV-1 in HSV-2^a: bris sečnice/materničnega vratu za PCR (osamitev, antigenski test).</p> <p>Serološki testi na ostale SPO:</p> <p><i>Treponema pallidum</i>:</p> <ul style="list-style-type: none"> • serološki testi: netreponemalni (VDRL, RPR) in treponemalni (TPHA, FTA-ABS, CIA, EIA), • po zelo tveganem odnosu: ponovimo čez 2–4 tedne, • po manj tveganem odnosu: ponovimo čez 12 in 24 tednov. <p>HIV:</p> <ul style="list-style-type: none"> • anti-HIV izhodiščno; ponovimo 6, 12, 24 tednov po odnosu. <p>HBV:</p> <ul style="list-style-type: none"> • če ni cepljen: testa HBsAg, anti-HBc, • če je cepljen: test anti-HBs. <p>HCV: ni nujno; testiramo, če je bila poškodba med odnosom ali če je i. v. uživalce drog:</p> <ul style="list-style-type: none"> • anti-HCV izhodiščno, • anti-HCV in PCR 12 in 24 tednov po odnosu. <p>HAV: IgM, IgG anti-HAV (če analno-oralni odnos).</p>
<p>Razjeda na spolovilu s povečanimi bezgavkami ali brez povečanih bezgavk: sifilis, genitalni herpes, mehki čankar, klamidijski limfogranulom, ingvinalni granulom</p>	<p><i>Treponema pallidum</i>:</p> <ul style="list-style-type: none"> • mikroskopiranje brisa razjede v temnem polju ali DIF, • serološki testi: netreponemalni (VDRL, RPR) in/ali treponemalni (TPHA, FTA-ABS, CIA, EIA). <p>HSV-1/2:</p> <ul style="list-style-type: none"> • bris razjede za PCR (osamitev ali antigenski test), • serološki testi: IgM, IgG HSV-1/2 (če ni razjed ali je kužnina neprimerna). <p><i>Chlamydia trachomatis</i> (L1-3):</p> <ul style="list-style-type: none"> • bris razjede ali gnoja iz bezgavk za PCR ali osamitev. <p><i>Haemophilus ducreyi</i>:</p> <ul style="list-style-type: none"> • bris razjede ali kužnine iz obodnih bezgavk za osamitev ali PCR (redki laboratoriji). <p><i>Calymatobacterium granulomatis</i>:</p> <ul style="list-style-type: none"> • mikroskopiranje tkiva razjede ali granulacijskega tkiva za Donovanova teslesa, • osamitev iz kužnine (težko!). <p>testiranje na anti-HIV in ostale SPO</p>

^aV določenih primerih.

diagnostično okno) kot tudi v primeru pozitivnega izvida (navodila o zdravljenju, potrebi po kontrolnem pregledu in o potrebi testiranja zdajšnjih oz. morebitnih bivših spolnih partnerjev). Zaželeno je, da bolnik izvid prejme osebno, še posebej ob potrditvi določene diagnoze, povezane s tveganim vedenjem. Interpretacija izvidov je namreč potrebno izkoristiti tudi za svetovanje glede varnejšega spolnega vedenja.

Če gre za nevirusne SPO, moramo preveriti, ali je bolnik upošteval dana priporočila in protimikrobno zdravljenje, ter mu po potrebi svetovati kontrolni diagnostični pregled (obvezno pri gonoreji in sifilisu; izjemoma pri klamidiji okužbi). V nasprotnem primeru je na vsak način potrebno poudariti prednosti, ki jih prinaša tovrstni nadzor, in ustrezno ukrepati. Poudarimo tudi pomen hkratnega pregleda oz. zdravljenja spolnega partnerja/ke.

V primeru genitalnega herpesa se moramo natančno pogovoriti o različnih vidikih možnosti zdravljenja, o morebitni potrebi po uvedbi trajne kemoprofilakse, spregovoriti moramo o potencialni nevarnosti prenosa okužbe na plod in izpostaviti pomen obveščanja ginekologa/porodničarja o prebolelem genitalnem herpesu.

Ženske z genitalnimi bradavicami je potrebno spodbujati k rednim pregledom pri ginekologu zaradi povezave določenih sevov HPV s karcinomom materničnega vratu. Pozornost glede HPV je potrebna tudi v skupini MSM zaradi možnosti razvoja karcinoma analnega predelela. Pri mlajših spregovorimo o možnosti zaščitnega cepljenja pred tovrstno okužbo. Svetujemo jim lahko tudi glede možnih načinov odstranjevanja estetsko in lahko tudi funkcionalno neprijetnih tvorbo.

Pacientom z ugotovljeno spolno preneseno okužbo z virusi, ki se prenašajo tudi s krvjo, svetujemo, da se testirajo njihovi spolni partnerji, ožji družinski člani oz. člani skupnega gospodinjstva.

Pri osebah, ki so nedavno prebolele akutni hepatitis B, moramo izpostaviti pomen varnega spolnega življenja (pravilno in stalno uporabo kondoma), dokler ne vemo, da je spolni partner/ka ustrezno cepljen/a proti hepatitisu B. Pri nosilcih HBsAg je potrebno preveriti, ali je spolni partner/ka ustrezno zaščiten/a pred okužbo. Pri ženskah v rodnem obdobju poudarimo pomen obveščeniosti ginekologa/porodničarja o trajnem nosilstvu HBsAg zaradi ustreznega preprečevanja prenosa okužbe na novorojenca. Bolnikom s kroničnim hepatitisom C svetujemo, naj partner/ka opravi pregled za okužbo s HCV v področnem epidemiološkem zavodu. Pri trajnih partnerskih zvezah zaščiteni spolni odnosi niso potrebni. Med svetovanjem o varnejšem spolnem vedenju naj se poudari pomembnost zaščite med spolnimi odnosi s pravilno in redno uporabo kondoma, poleg tega svetujemo spremembo dotedanjega načina spolne aktivnosti in po možnosti tudi spremembo drugih tveganih spolnih navad.

V primeru novo odkritih okužb s HBV, HCV in HIV je potrebna takojšnja napotitev k infektologu.

DIAGNOSTIČNA OBRAVNAVA SPOLNO PRENOSLJIVIH OKUŽB V SLOVENIJI

Zgodovinsko gledano so v Sloveniji po drugi svetovni vojni glavnino SPO obvladovali dermatovenerologi na čelu z Dermatološko kliniko v Ljubljani. Organizirani so bili v mrežo devetih ambulant po državi in so izvajali antivenerično dejavnost predvsem klasičnih SPO. Konec prejšnjega stoletja so bili bolniki s SPO diagnostično obravnavani pri različnih specialistih, pri tistih, kamor so sodili zaradi narave svojih zdravstvenih težav: dermatovenerologih, ginekologih, infektologih, urologih in deloma tudi zdravnikov družinske medicine. V takratnem obdobju razmaha aidsa in ostalih SPO je

zato tako v splošni populaciji kot tudi v skupinah z zvečanim tveganjem postalo zelo pomembno, da bi vse te specialnosti delovale po enotnih doktrinarnih kriterijih in z enotno strategijo diagnostičnih ukrepov, zgledujoč se po mednarodnih priporočilih, a z upoštevanjem specifičnih nacionalnih razmer, diagnostičnih možnosti, protimikrobne občutljivosti povzročiteljev, farmakološke zmožljivosti in ne nazadnje tudi državnega proračuna. Ta kompleksen pristop je moral nuditi ne le ustrezno diagnostiko, temveč tudi zdravljenje, poenoten epidemiološki nadzor nad pojavljanjem SPO v Sloveniji in ukrepe za preprečevanje širjenja okužbe. Z Zakonom o nalezljivih boleznih so vse SPO postale obvezno prijavljive, po letu 2001 s posebnim obrazcem, ki ščiti identiteto okuženega. Interdisciplinarna skupina specialistov infektologov, dermatovenerologov, ginekologov, mikrobiologov in epidemiologov je pod vodstvom Klinike za infekcijske bolezni in vročinska stanja Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana leta 1994 izdelala Nacionalne smernice odkrivanja in zdravljenja SPO, ki jih je leta 1994 potrdil nacionalni strokovni kolegij za infektologijo (23). Smernice vključujejo sodoben in slovenskim razmeram ustrezen diagnostičen in terapevtski pristop k bolniku s sumom na SPO, ki je naravnano k usmerjenemu in ne sindromnemu zdravljenju SPO ter spodbuja k presejalnem testiranju na vse SPO. Že enkratno tvegano spolno vedenje namreč pomeni možnost za hkratno okužbo z različnimi spolno prenosljivimi mikrobi, ki lahko vrsto let poteka brezsimptomno (3).

V zadnjem desetletju so SPO tudi v Sloveniji razkrile svoje nove potenciale, predvsem z eksplozivno širitvijo incidence med MSM, pojavom odpornih sevov spolno prenosljivih mikrobov ter upadom preventivnih aktivnosti. Glede na akcijski načrt SZO in ECDC o diagnostični obravnavi SPO je v Sloveniji za določene zahte-

ve dobro poskrbljeno, nekatere pa bo potrebno izboljšati (8, 9).

Na področju mikrobiološke diagnostike imamo na voljo odlične laboratorijske zmožnosti tako za vsakodnevno rutinsko uporabo kot tudi za izvajanje zahtevnejših raziskav, z epicentrom na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani. V rutinski rabi so vse bolj pogoste molekularne metode zaznave povzročiteljev SPO, vendar s pozornostjo, uprto v njihovo izolacijo za sledenje morebitnega pojava odpornosti na priporočeno protimikrobno zdravljenje. Najaktualnejši tovrstni primer je zgodnja zaznava večkratno odpornih sevov *N. gonorrhoeae*, ki je bila zabeležena kot druga v Evropi, v raziskovalne namene pa potekajo tudi druge raziskave (24, 25). Redno se z molekularnimi metodami dokazovanja rutinsko in raziskovalno spremlja tudi gibanje klamidijjskih okužb in okužb z urogenitalnimi mikoplazmami (26). Uvedena je bila sodobnejša, molekularna diagnostika za odkrivanje okužbe s HSV. Najnovejša je uvedba molekularne diagnostike okužbe s *Trichomonas vaginalis*, za katero tako kot drugod po svetu menimo, da je v Sloveniji zaenkrat podcenjena. Nedavno je bila za rutinsko rabo uvedena tudi nova, sodobnejša serološka metoda za dokazovanje sifilisa (kemiluminiscenčni imunski test, angl. *chemiluminescence immunoassay*, CIA), saj se v številnih centrih po svetu za primarno presejanje netreponemski test zamenjuje s treponemskim, ki tudi zaradi večje občutljivosti olajša diagnozo zgodnjega in latentnega sifilisa. Izjemno je udejstvovanje kliničnih virologov na področju HPV, ki je naravnano predvsem na raziskovalno ravnen na svetovni ravni (27). Neprestano se posodablja serološka diagnostika okužbe s HIV, ki ažurno sledi svetovnim trendom, prav tako diagnostika virusnih hepatitsov. Vendar pa se postavlja vprašanje, v kolikšni meri so vse te najnovejše diagno-

stične metode že prodrle v različne ambulante za SPO in se že uporabljajo v praksi širom po Sloveniji.

Diagnostično obravnavo bolnikov s sumom na SPO v vsakodnevni klinični praksi v Sloveniji izvajajo različni specialisti sekundarne ravni zdravstva: dermatovenerologi, infektologi, ginekologi, proktologi in urologi. Vendar so te specialnosti po regijah zelo neenakomerno razporejene; zdi se namreč, da je obravnava SPO v določenih slovenskih regijah podcenjena. Leta 2012 npr. ni bilo uradno zabeleženega nobenega primera gonoreje v kar nekaj slovenskih regijah (goriška, kranjska, novomeška, koroška) (11). Iste leta so npr. 60 % primerov gonoreje prijavili dermatovenerologi, po nekaj primerov pa infektologi, proktologi, ginekologi in družinski zdravniki (11). Videti je, da urologi tovrstno patologijo obravnavajo najredkeje, proktologi so številčno izrazito podcenjeni, ginekologi pa se rutinsko najpogosteje osredotočajo na diagnostiko klamidijske okužbe. Vsi bolniki s HIV/aidsom so centralizirano obravnavani na Kliniki za infekcijske bolezni in vročinska stanja Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana, tisti z virusnim hepatitisom pa večinoma pri infektologih v dveh kliničnih centrih in treh splošnih bolnicah.

Vsi specialisti za obravnavo SPO, razen izbranega ginekologa, so dostopni z napotnico izbranega osebnega zdravnika. Edina možnost brezplačnega anonimnega testiranja, torej brez napotnice, je presejalno testiranje na okužbo s HIV, HBV in HCV na Kliniki za infekcijske bolezni in vročinska stanja Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana.

Veliko pomanjkanje se kaže tudi na diagnostičnem področju aktivnega iskanja brezsimptomno okuženih; npr. sorazmerno visoka prevalenca klamidijske okužbe med brezsimptomnimi udeleženci raziskav, posebej v določeni starostni skupini, kaže, da je problem pri nas podcenjen in

da bi se stroka morala opredeliti do presejalnega testiranja. Še posebej problematična pa je obravnava SPO pri populaciji MSM, saj je tej populaciji za »analno zdravje« zaenkrat na voljo le zasebna ambulanta. V sistemu javnega zdravstva populacija MSM ni posebej opredeljena, ne glede na to, da ji je po navodilih CDC priporočljivo ponuditi rutinsko testiranje na HIV, sifilis, gonorejo in klamidijsko okužbo (po možnosti tudi HSV-2) vsaj enkrat letno (28). V primeru tveganih odnosov z več nepoznanimi partnerji ali s hkratnim uživanjem droge pa bi bilo tako testiranje potrebno vsaj dva- do trikrat letno. Ob tem bi bilo potrebno tudi izhodiščno testiranje na okužbo s HBV in virusom hepatitisa A (angl. *hepatitis A virus*, HAV) ter v primeru negativnega izvida rutinsko cepljenje proti enemu ali obema hepatitisoma (28).

Glede strokovne obravnave bolnikov s SPO je zaznati precej neenoten pristop k uporabi različnih laboratorijskih diagnostičnih metod in kompleksnemu testiranju na več (vse) SPO, a dokaj poenoten terapevtski pristop, ki sledi posodabljanju smernic za zdravljenje SPO na podlagi lastnih mikrobioloških dognanj. Zadnji primer je posodobitev nacionalnih smernic za zdravljenje gonoreje v juliju 2014, ki je sledil mednarodnim smernicam in je temeljil na izsledkih lastne raziskave (25, 29, 30). Nacionalne smernice za diagnostiko sifilisa, ki so ravno dočakale spremembe na mednarodni ravni, so v pripravi (31). Tako kot povsod po svetu se tudi pri nas postavlja vprašanje diagnostičiranja okužb z urogenitalnimi mikoplazmami (32). Ogromen kliničen zalogaj, ki še ne pozna dokončne rešitve na diagnostičnem področju, pa je obravnava spolno prenesenega prostatitisa.

Zavedanje o SPO, ki je prva zahteva za uspešno diagnostično obravnavo, se je v Sloveniji začelo močno izboljševati v obdobju aidsa, s prihodom visoko aktivne-

ga protiretrovirusnega zdravljenja aidsa in upadanja strahu pred njim pa nekoliko popušča. Ozaveščanje spolno aktivnega prebivalstva o SPO – še posebej mladih in skupin z velikim tveganjem za okužbo, spodbujanje k pravočasnemu iskanju ustrezne diagnostične obravnave ter sledenje spolnih partnerjev so ključni elementi uspešne diagnostične obravnave SPO. Na tem področju so aktivne tako javnozdravstvene inštitucije kot nevladne organizacije, vendar bi bilo njihovo delovanje potrebno še razširiti in potencirati (33, 34).

ZAKLJUČEK

Diagnostična obravnava SPO je v Sloveniji na splošno zadovoljiva, še posebej v večjih zdravstvenih centrih in za določene populacije. Na voljo so ustrezna laboratorijska diagnostika, različne specialistične ambulante in služba za epidemiološki nadzor. Nacionalne smernice diagnostike SPO se posodablajo, z njimi pa je sproti potrebno seznanjati ustrezne specialiste, da enotno in sodobno obravnavajo bolnike s sumom na SPO, kar bi lahko opravila interdisciplinarna skupina strokovnjakov vpletenih specializacij medicine. Uvedba rutinskega presejanja na klamidijско okužbo v določeni, z okužbo bolj obremenjeni populaciji, je vredna razmisleka in dokončne odločitve. Presejanje na okužbo s HIV je nujno pri vseh bolnikih s SPO, hkratno testiranje na vse SPO je priporočljivo.

Nujno bi bilo potrebno izboljšati dosegljivost pregleda in omogočiti neposredno dostopnost do diagnostične obravnave pri ustreznih specialistih na sekundarni ravni zdravstvenega varstva in to z možnostjo ambulantnega pregleda brez napotitve izbranega zdravnika. Pri Ministrstvu za zdravje Republike Slovenije je proces

pridobitve take dostopnosti že v povojih. Potrebno bi bilo uravnotežiti tudi regionalno razpoložljivost ustreznih ambulant. Kaže se izrazita potreba po ustreznem diagnostičnem nadzoru in boljšem obvladovanju teh okužb v populacijah z velikim tveganjem za SPO. MSM v sistemu javnega zdravstva potrebujejo ambulanto za »analno zdravje« oz. smernice za redni diagnostični nadzor nad SPO, močno pa bi bilo v tej skupini potrebno okrepiti preventivo oz. ozaveščanje o varnejši spolnosti. Diagnostični nadzor nad SPO oz. presejanje pri spolnih delavcih in delavkah je realno izvedljiv ob legalizaciji prostitucije in ne ob dekriminalizaciji, ki jo imamo v Sloveniji. V splošni populaciji bi bilo potrebno dvigniti ozaveščenost o varni spolnosti in pravočasnem ukrepanju, predvsem med mladimi.

Strah pred visoko smrtnostjo zaradi aidsa je v preteklosti spodbudil nacionalno in mednacionalno skrb ter posledično vključitev aidsa v razvojne strategije, programe in finančne načrte mnogih držav. V Sloveniji je leta 1985 ustanovljena Komisija za aids pri Ministrstvu za zdravje RS na področju aidsa razvila strategijo in program preprečevanja in obvladovanja okužbe s HIV in aidsa vključno z diagnostično obravnavo; različni resorji, stroka, civilna družba, nevladni sektor in druge zainteresirane skupine so se ji pridružile z zdravstveno-vzgojnimi aktivnostmi (34). Vključevanje še ostalih SPO na isto raven pa pomeni, da se bodo vloženi napor in sredstva v bodoče z gotovostjo bogato obrestovali. Obvladovanje SPO, ki vključuje tudi njihovo diagnostično obravnavo, je že vključeno v Nacionalno strategijo obvladovanja HIV/aidsa za obdobje 2010–2015 (34).

LITERATURA

1. WHO. Global prevalence and incidence of selected curable sexually transmitted infections: Overviews and estimates [internet]. Ženeva: World Health Organization; 2001 [citirano 2014 2. Okt 19]. Dosegljivo na: <http://who.int/hiv/pub/sti/who.hiv.aids2001.02.pdf>
Gerbase AC, Rowley JT, Mertens TE. Global epidemiology of sexually transmitted diseases. *Lancet*. 1998; 351: 2–4.
3. Aral SO, Holmes KK. Epidemiology of sexual behaviour and sexual diseases. In: Holmes KK, Mardh PA, Sparling PF, eds. *Sexually Transmitted Diseases*. New York: McGraw Hill; 1990. p. 19–36.
4. WHO. Global incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted infections – 2008. Ženeva: World Health Organization; 2012. p. 1–20.
5. European Centre for Disease Prevention and Control. Sexually transmitted infections in Europe 1990–2010. Stockholm: ECDC; 2012. p. 1–10.
6. Hatzakis A, Van Damme P, Alcorn K, et al. The state of hepatitis B and C in the Mediterranean and Balkan countries: report from a summit conference. *J Viral Hepat*. 2013; 20 (Suppl 2): 1–20.
7. WHO. AIDS Epidemic Update [internet]. Ženeva: World Health Organization; 2007 [citirano 2014 Okt 19]. Dosegljivo na: <http://data.unaids.org/pub/EPISlides/2007/2007.epiupdate.en.pdf>
8. WHO. Global action plan to control the spread and impact of antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. Ženeva: World Health Organization; 2012.
9. ECDC. Response plan to control and manage the threat of multidrug-resistant gonorrhoea in Europe. Stockholm: European Centre for Disease Prevention and Control; 2012.
10. Klavs I, Kustec T. Spolno prenesene okužbe v Sloveniji, letno poročilo 2013. Ljubljana: Nacionalni inštitut za javno zdravje; 2014.
11. Klavs I, Kustec T, Kastelic Z. Spolno prenesene okužbe v Sloveniji, letno poročilo 2012. Ljubljana: Inštitut za varovanje zdravja; 2013.
12. Hook EW, Handsfield HH. Gonococcal infections in the adult. In: Holmes KK, Mardh PA, Sparling PF, eds. *Sexually Transmitted Diseases*. New York: McGraw-Hill; 1990. p. 181–93.
13. Thin RN. Syphilis in the adult. In: Holmes KK, Mardh PA, Sparling PF, eds. *Sexually Transmitted Diseases*. New York: McGraw-Hill; 1990. p. 221–62.
14. Stamm W, Holmes KK. Chlamydia trachomatis infection in adults. In: Holmes KK, Mardh PA, Sparling PF, eds. *Sexually Transmitted Diseases*. New York: McGraw-Hill; 1990. p. 181–93.
15. Ryan ET, Wilson ME, Kain CK. Illness after international travel. *N Engl J Med*. 2002; 347: 505–16.
16. Saje A, Tomažič J. Syphilis and HIV co-infection: excellent response to multiple doses of benzathine penicillin. *Acta Dermatoven APA*. 2014; 23: 1–3.
17. Jeverica S, Unemo M, Mlakar B, et al. Prevalence of *Neisseria gonorrhoeae* infection in two distinct men-who-have-sex-with-men (MSM) populations in Slovenia, 2012. STI&AIDS World Congress; 2013 Jul 14–Jul 17; Vienna 2013.
18. Mlakar B, Kocjan BJ, Hošnjak L, et al. Beta papilloma viruses in the anal canal of HIV positive and HIV negative men who have sex with men. *J Clin Virol*. 2014; 61: 237–41.
19. Rogelj - Butinar M, Potočnik M, Marin J. Prevalence of HSV antibodies in Slovene patients attending STD clinic. *Acta Dermatoven APA*. 2002; 11: 148–50.
20. Keše D, Matičič M, Potočnik M. Chlamydia trachomatis infections in heterosexuals attending sexually transmitted disease clinics in Slovenia. *Clin Microbiol Infect*. 2005; 11: 240–2.
21. Skaza A, Grsković B, Pleština S, et al. Prevalence of asymptomatic chlamydial urethritis in military recruits in the Celje region, Slovenia. *Int J STD AIDS*. 2003; 14: 765–9.
22. Klavs I, Rodrigues LC, Wellings K, et al. Prevalence of genital Chlamydia trachomatis infection in the general population of Slovenia: serious gaps in control. *Sex Transm Infect*. 2004; 80: 121–3.
23. Matičič M. Spolno prenosljive bolezni danes v svetu in doma. *Zdrav Vestn*. 1995; 64: 197–201.
24. Unemo M, Golparian D, Potočnik M, et al. Treatment failure of pharyngeal gonorrhoea with internationally recommended first-line ceftriaxone verified in Slovenia, September 2011. *Euro. Surveill*. 2012; 17 (25):1–4.
25. Jeverica S, Golparian D, Maticic M, et al. Phenotypic and molecular characterization of *Neisseria gonorrhoeae* isolates from Slovenia, 2006–12: rise and fall of the multidrug-resistant NG-MAST genogroup 1407 clone? *J Antimicrob Chemother*. 2014; 69: 1517–25.

26. Kese D, Potocnik M, Maticic M, et al. Genotyping of *Chlamydia trachomatis* directly from urogenital and conjunctiva samples using an *ompA* gene pyrosequencing-based assay. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2011; 63: 210–6.
27. Poljak M. Review of 20 years of HPV research in Slovenia. *Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat.* 2011; 20: 99–112.
28. Radcliffe K. European STD Guidelines. *Int J STD&AIDS.* 2001; 12 (Suppl 3): 4–87.
29. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Update to CDC's Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2010: oral cephalosporins no longer a recommended treatment for gonococcal infections. *MMWR Morb. Mortal Wkly. Rep.* 2012; 61 (31): 590–4.
30. Bignell C, Unemo M, European STI Guidelines Editorial Board. European guideline on the diagnosis and treatment of gonorrhoea in adults [internet]. Copenhagen: Department of Microbiological Surveillance and Research, Statens Serum Institut; 2012 [citirano 2014 Okt 20]. Dosegljivo na: http://www.iusti.org/regions/Europe/pdf/2012/Gonorrhoea_2012.pdf
31. Janier M Hegyi V, Dupin N, et al. European guideline on the management of syphilis [internet]. Pariz: STD Clinic, Hôpital Saint-Louis AP-HP and Hôpital Saint-Joseph; 2014 [citirano 2014 Okt 20]. Dosegljivo na: <http://www.iusti.org/regions/europe/pdf/2014/2014SyphilisguidelineEuropean.pdf>
32. Marovt M, Keše D, Miljkovic J, et al. Clinical role of *Ureaplasma parvum* and *Ureaplasma urealyticum* presence in female lower urogenital tract: Is there a place for routine screening and treatment? *Zdrav Vestn.* V tisku 2014.
33. Pinter B. Spolno in reproduktivno zdravje mladostnikov - kje smo v Sloveniji? *Zdrav Vestn.* 2003; 72 Suppl 2: 27–9.
34. Žalar A, Leskovšek E, Čeh F, et al. Spolna vzgoja v okviru vzgoje za zdravje v slovenskih srednjih šolah. Ljubljana: Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije; 2012.
35. Komisija za aids. Strategija preprečevanja in obvladovanja okužbe s HIV 2010-2015 [internet]. Ljubljana: Ministrstvo za zdravje Republike Slovenije; 2009 [citirano 2014 Okt 20]. Dosegljivo na: http://www.mz.gov.si/si/delovna_podrocja/javno_zdravje/obvladovanje_nalezljivih_bolezni/hiv/aids

Andrej Golle¹, Darja Keše², Irena Klavs³, Petra Deželak⁴, Barbara Zdolšek⁵, Iztok Štrumbelj⁶, Anamarija Juriševič-Dodič⁷, Mateja Ravnik⁸, Jerneja Fišer⁹, Ljudmila Sarjanovič¹⁰, Cimerman Mojca¹¹

Pregled metod za ugotavljanje urogenitalnih okužb z bakterijo *Chlamydia trachomatis* in prikaz obsega testiranja v slovenskih mikrobioloških laboratorijih v obdobju 2009–2013

An Overview of Methods Suitable for Diagnosis of Urogenital Chlamydia trachomatis Infection and the Assessment of Chlamydia trachomatis Detection in Slovenian Microbiological Laboratories in the Period 2009–2013

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: spolno prenosljive okužbe, mikrobiološka diagnostika, *Chlamydia trachomatis*, metode pomnoževanja nukleinskih kislin

IZHODIŠČA. Namen našega prispevka je predstaviti metode za diagnozo urogenitalne okužbe s *Chlamydia trachomatis* ter prikazati obseg in rezultate testiranja za ugotavljanje tovrstne okužbe v slovenskih kliničnih mikrobioloških laboratorijih v obdobju 2009–2013.

¹ Asist. mag. Andrej Golle, dr. med., spec. klin. mikrobiol., Oddelek za medicinsko mikrobiologijo Maribor, Center za medicinsko mikrobiologijo, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Prvomajska ulica 1, 2000 Maribor; andrej.golle@nlzoh.si

² Doc. dr. Darja Keše, univ. dipl. biol., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

³ Izr. prof. dr. Irena Klavs, dr. med., Center za nalezljive bolezni, Nacionalni inštitut za javno zdravje, Trubarjeva ulica 2, 1000 Ljubljana

⁴ Petra Deželak, dr. med., spec. klin. mikrobiol., Oddelek za medicinsko mikrobiologijo Maribor, Center za medicinsko mikrobiologijo, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Prvomajska ulica 1, 2000 Maribor

⁵ Barbara Zdolšek, dr. med., spec. klin. mikrobiol., Oddelek za medicinsko mikrobiologijo Celje, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Gregorčičeva ulica 5, 3000 Celje

⁶ Mag. Iztok Štrumbelj, dr. med., spec. klin. mikrobiol., Oddelek za medicinsko mikrobiologijo Murska Sobota, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Ulica arhitekta Novaka 2b, 9000 Murska Sobota

⁷ Anamarija Juriševič-Dodič, univ. dipl. biol., spec. med. mikrobiol. Oddelek za medicinsko mikrobiologijo Koper, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Verdijeva ulica 11, 6000 Koper

⁸ Mag. Mateja Ravnik, univ. dipl. kem., Oddelek za medicinsko mikrobiologijo Kranj, Center za medicinsko mikrobiologijo, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Gosposvetska ulica 12, 4000 Kranj

⁹ Jerneja Fišer, dr. med., spec. klin. mikrobiol., Mikrobiološki laboratorij, Splošna bolnišnica »dr. Franca Derganca« Nova Gorica, Ulica padlih borcev 13a, 5290 Šempeter pri Gorici

¹⁰ Prim. Ljudmila Sarjanovič, dr. med., spec. med. mikrobiol. s parazitologijo, Oddelek za medicinsko mikrobiologijo Nova Gorica, Center za medicinsko mikrobiologijo, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Vipavska cesta 13, 5000 Nova Gorica

¹¹ Cimerman Mojca, univ. dipl. mikrobiol., Oddelek za medicinsko mikrobiologijo Maribor, Center za medicinsko mikrobiologijo, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano; Oddelek za mikrobiološke analize živil, vod in drugih vzorcev okolja Maribor, Center za mikrobiološke analize živil, vod in drugih vzorcev okolja, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Prvomajska ulica 1, 2000 Maribor

METODE. Iz laboratorijskih informacijskih sistemov vseh devetih slovenskih kliničnih mikrobioloških laboratorijev smo pridobili podatke o številu bolnikov, pri katerih smo ugotavljali okužbo s klamidijo, in številu bolnikov, pri katerih je bila okužba potrjena v obdobju med leti 2009 in 2013. Laboratorijem smo poslali tudi kratek vprašalnik o tem, katere metode uporabljajo in ali so vključeni v sheme zunanega nadzora kakovosti. **REZULTATI.** Vsi slovenski laboratoriji za diagnostiko urogenitalne klamidijske okužbe uporabljajo metode direktne imunfluorescence (DIF) in metodo verižne reakcije s polimerazo (PCR). Z metodo DIF smo testirali 2.134 bolnikov in 3.419 bolnic, okužbo smo potrdili pri 375 (17,6 %) bolnikih in 327 (9,6 %) bolnicah. S testom PCR smo testirali 3.828 bolnikov in 4.158 bolnic, okužbo smo s PCR potrdili pri 694 (18,1 %) in 360 bolnicah (8,7 %). Vsi slovenski laboratoriji razen enega so tudi vključeni v zunanji nadzor kakovosti. **REZULTATI.** Nezdružljene klamidijske okužbe lahko privedejo do resnih posledic. Za zdravljenje klamidijskih okužb je potrebno le-te potrditi z mikrobiološko diagnozo. Ameriški center za preprečevanje in obvladovanje bolezni (angl. *Centers for Disease Control and Prevention*, CDC), Mednarodna zveza proti spolno prenosljivim okužbam (angl. *International Union against Sexually Transmitted Infections*, IUSTI) in Evropski center za preprečevanje in obvladovanje bolezni (angl. *European Centre for Disease Prevention and Control*, ECDC) za diagnostiko urogenitalnih klamidijskih okužb odobravajo le teste, ki temeljijo na pomnoževanju nukleinskih kislin. V Sloveniji večina kliničnih mikrobioloških laboratorijev izvaja teste PCR.

ABSTRACT

KEY WORDS: sexually transmitted diseases, microbiological diagnosis, *Chlamydia trachomatis*, nucleic acid amplification methods

BACKGROUND. The aim of this article is to present methods suitable for diagnosis of urogenital *Chlamydia trachomatis* infection and to assess which methods are used in Slovenian clinical microbiological laboratories. The assessment was based on the overall results of these methods in the period from 2009 to 2013. **METHODS.** The data about the patients tested for urogenital *Chlamydia trachomatis* infections were collected from laboratory information systems. In Slovenia, 9 clinical microbiological laboratories test routinely for chlamydial infection and all participated in the survey. A short questionnaire was sent to the laboratories to collect information about the methods used for urogenital chlamydial infections and about their involvement in the external quality assessment schemes. **RESULTS.** All of the laboratories use direct immunofluorescence test (DIF) for the detection of chlamydial antigen in urogenital samples and 7 of them also use polymerase chain reaction (PCR). In the 4-year period, 2,134 male and 3,419 female patients were tested with DIF. Chlamydial antigen was detected in 375 male (17.6%) and 327 female (9.6%) patients. With PCR we analyzed 3,828 male and 4,158 female patients and obtained positive results for 694 male (18.1%) and 360 female (8.7%) patients. All Slovenian laboratories except one participating in this study are included in the external quality assessment schemes. **CONCLUSIONS.** Untreated chlamydial infection may lead to serious complications. Centers for Disease Control and Prevention (CDC), the International Union against Sexually Transmitted Infections (IUSTI) and the European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) recognize only nucleic acid amplification tests as appropriate for the diagnostics of urogenital chlamydial infection. Most clinical microbiological laboratories in Slovenia are competent to diagnose chlamydial infections with PCR tests.

UVOD

Bakterija *Chlamydia trachomatis* je najpogostejši bakterijski povzročitelj spolno prenosljivih okužb v Evropi in drugod po svetu (1, 2). Prevalenca okužbe med spolno aktivnimi mladimi Evropejci znaša 5–10 % (2, 3). Število spoznanih primerov okužbe s *C. trachomatis* se v Evropi zvišuje, kar je verjetno posledica povečanega števila testiranja in uporabe vse bolj občutljivih testov (2, 3).

Urogenitalna okužba s *C. trachomatis* pri obeh spolih v večini primerov poteka brez simptomov, zato je pogosto neopoznana in nezdravljena (4–6, 7). Zaradi tega se lahko razvijejo pozni zapleti, nezdravljeni posamezniki pa predstavljajo tudi rezervoar okužbe (2, 8).

Okužbe urogenitalnih poti povzročajo serotipi od D do K *C. trachomatis*. Inkubacijska doba pri teh okužbah je 5–14 dni, simptomi se pojavijo v 2. tednu po okužbi (9). Nezdravljene asimptomatske okužbe lahko vztrajajo več mesecev in let ter privedejo do zapletov (5–7). Pri ženskah je primarno mesto okužbe epitelij materničnega vratu. Kljub temu da večina okužb poteka asimptomatsko, pa vsaj pri tretjini žensk pri pregledu najdemo lokalne znake okužbe; največkrat opisujejo sluzavo gnojni izcedek iz materničnega vratu in hipertrofično ektopijo materničnega vratu (4). Okužba s *C. trachomatis* pri ženskah poteka kot cervicitis, uretritis, akutni uretralni sindrom, bartholinitis, vnetja v mali medenici in tudi kot reaktivni artritis. Pojavljanje simptomov je odvisno od mesta okužbe. Za cervicitis in uretritis je značilen vaginalni izcedek, pekoča bolečina pri odvajanju urina in pogosto uriniranje, lahko pa se pojavljajo tudi bolečine pri spolnih odnosih, ki jih včasih spremljajo krvavitve (5). Okužbe zgornjega genitalnega trakta, kot so salpingitis in endometritis, se kažejo kot bolečine v spodnjem predelu trebuha, lahko tudi krvavitve iz rodil (5, 6). Klamidijski proktitis se kaže z

bolečino v predelu rektuma, izcedkom in krvavitvami iz rektuma (6).

Nezdravljena okužba pri ženskah lahko napreduje do zapletov, kot so endometritis, salpingitis, vnetja v mali medenici, zunajmaternična nosečnost, neplodnost in reaktivni artritis (9, 6). Približno dve tretjini neplodnosti zaradi neprehodnosti jajcevodov in eno tretjino zunajmaterničnih nosečnosti povezujejo z okužbo s *C. trachomatis* (10).

Klamidijsko okužbo med nosečnostjo povezujejo s številnimi zapleti nosečnosti, kot so: prezgodnji porod, prezgodnji razpok mehurja, nizka porodna teža, spontani splavi in poporodni endometritis (5, 6). Med porodom se okužba lahko prenese tudi na novorojenčka, lahko se razvija ophtalmia neonatorum in pljučnica (11).

Pri moških potekajo spolno prenosljive okužbe, ki jih povzroča *C. trachomatis*, najpogosteje v obliki negonokoknega uretritisa. V 30–50 % negonokoknega uretritisa pri moških je povzročitelj *C. trachomatis* (9). Približno 7–21 dni po okužbi nastane sluzasto gnojni izcedek iz sečnice, ki ga spremlja dizurija, včasih tudi uretralni pruritus. Pri kliničnem pregledu običajno ne odkrijemo drugih nepravilnosti (5). Pri moških lahko nezdravljena okužba napreduje, razvije se akutni epididimitis oz. epididimoorchitis, akutni prostatitis, konjunktivitis in zapleti, kot so reaktivni artritis, kronični prostatitis in neplodnost (5, 6).

Posebna oblika spolno prenosljive okužbe je dimeljski limfogranulom (lat. *lymphogranuloma venereum*, LGV), ki ga povzročajo sevi L1 do L3 *C. trachomatis* (9). Ti sevi so invazivni in prizadenejo predvsem limfatični sistem (12). Endemsko se LGV pojavlja v Afriki, Aziji in Južni Ameriki. V Evropi se pojavlja sporadično, večje število primerov v nekaterih evropskih državah so opisali po letu 2003, zlasti pri moških, ki imajo spolne odnose z moškimi (12–15).

Za zdravljenje nezapletenih klamidij-skih okužb so na voljo učinkovita protimikrobna zdravila. Klamidijski uretritis pri moških in klamidijski cervicitis pri ženskah učinkovito zdravimo z doksiciklinom (7 dni) ali z enim odmerkom azitromicina (5). Pri okuženih nosečnicah priporočajo zdravljenje z azitromicinom, amoksicilinom ali eritromicinom (16, 17).

Za zdravljenje okužb s sevi, ki povzročajo LGV, priporočajo tritedensko zdravljenje z doksiciklinom ali eritromicinom. *C. trachomatis* je v večini primerov dobro občutljiva na protimikrobna zdravila, ki se uporabljajo za zdravljenje klamidij-skih okužb. Opisali pa so primere neuspešne-ga zdravljenja z makrolidi in tetraciklini. Domnevajo, da so za neuspeh zdravljenja odgovorni farmakološki dejavniki, saj mehanizmov odpornosti pri izolatih na molekularnem nivoju niso potrdili (18, 19). Za zdravljenje klamidij-skih okužb je poleg zdravljenja okužene osebe pomembno testirati in zdraviti tudi spolne partnerje okuženih (6, 20). Bolnike moramo klinično spremljati do ozdravitve (6).

LABORATORIJSKA DIAGNOSTIKA UROGENITALNIH OKUŽB, KI JIH POVZROČA CHLAMYDIA TRACHOMATIS

Metode, s katerimi neposredno dokazujemo klamidij-ske okužbe so: osamitev *C. trachomatis* v celični kulturi, dokaz antigenov *C. trachomatis* v kužnini in dokaz nukleinskih kislin *C. trachomatis* v kužnini s testi pomnoževanja nukleinskih kislin (angl. *nucleic acid amplification tests*, NAATs). Evropske in ameriške smernice za obravnavo urogenitalnih klamidij-skih okužb za vsakodnevno diagnostiko priporočajo le uporabo NAATs, medtem ko odsvetujejo uporabo testov, ki temeljijo na dokazu antigenov *C. trachomatis*. Osamitev *C. trachomatis* v celični kulturi ima svoje mesto v določenih posebnih okoliščinah (21, 22).

Pri odvzemu kužnine je bistveno, da pridobimo celice, v katerih se klamidija razmnožuje. Za neposredno dokazovanje urogenitalne okužbe z vsemi tremi skupinami metod so ustrezne kužnine brisi sečnice in bris materničnega vratu. Kadar okužbo dokazujemo z NAATs, sta ustrezni kužnini tudi prvi curek urina (angl. *first void urine*, FVU) in bris nožnice (23, 24). Za FVU odvajamo prvih 10–30 ml urina na začetku odvajanja. Najprimernejši odvzem FVU je zjutraj ali 2–6 ur po zadnjem odvajanju (24).

Mednarodna zveza proti spolno prenosljivim okužbam (angl. *International Union against Sexually Transmitted Infections*, IUSTI) in Ameriški center za preprečevanje in obvladovanje bolezni (angl. *Centers for Disease Control and Prevention*, CDC) zaradi visoke občutljivosti NAATs v primerjavi z drugimi metodami priporočata testiranje z NAATs tudi v primeru izvengeneralnih okužb s *C. trachomatis*. V tem primeru so za testiranje primerne kužnine brisi žrela, brisi veznice in rektalne kužnine. Pri tem pa poudarjajo, da je potrebno za zaznavo klamidij-ske okužbe iz teh kužnin teste NAATs ustrezno validirati (21, 22, 25–27).

Osamitev *C. Trachomatis* v celični kulturi

Ker je *C. trachomatis* obvezen znotrajcelični parazit, jo lahko osamimo samo v celični kulturi. Pri tem moramo strogo upoštevati pogoje za odvzem in transport kužnine, saj je klamidija zelo občutljiva za vplive okolja. Kužnino moramo takoj po odvzemu dati v prenosno gojišče in jo pri temperaturi 4 °C shraniti za največ 24 ur (9). V laboratoriju je potrebno kužnine čim prej obdelati. Če to ni mogoče v 24 urah po odvzemu, moramo kužnine zamrzniti pri -70 do -80 °C (23). Kulture inkubiramo 48–72 ur. V okuženih celicah se razvijejo znotrajcelični vključki, ki jih dokažemo z barvanjem s fluorescenčno označenimi monoklonalnimi protitelesi,

usmerjenimi proti poglavitni beljakovini zunanje ovojnice (angl. *major outer membrane protein*, MOMP) (28). Osamitev *C. trachomatis* v celični kulturi je bila dolga leta zlati standard, s katerim so primerjali ostale teste za dokazovanje okužbe s *C. trachomatis* (29). Je visoko specifična, z njo dokažemo žive organizme, ki jih lahko serotipiziramo in genotipiziramo. Celična kultura je metoda, s katero dobimo klinične izolate, ki jih lahko nadalje testiramo za občutljivost za protimikrobna zdravila (30, 31). Pri pravilnem odvzemu in ustreznem prenosu je primerna metoda za dokaz okužbe iz vseh zgoraj navedenih kužnin, razen iz prvega curka urina in brisov nožnice. Slabe strani so, da jo je težko standardizirati, je izredno zahtevna, dolgotrajna in ima v primerjavi s testi pomnoževanja nukleinskih kislin nizko občutljivost (30, 31). Zaradi večje možnosti lažno negativnih rezultatov ni primerna za presejalno testiranje (29, 32).

Dokazovanje antigena

Antigen *C. trachomatis* lahko dokazujemo s testi direktne imunofluorescence (DIF) ali z encimsko imunskimi testi (ELISA).

DIF izvedemo na objektnem stekelcu, kamor nanesimo bolnikovo kužnino. Podobno kot pri celični kulturi so primerne vse navedene kužnine, razen FVU in brisov nožnice. Klamidijska elementarna telesca (ET) dokazujemo z visoko specifičnimi monoklonalnimi protitelesi, ki so označena s fluoresceinom (29). DIF je hitra metoda, izvedba traja okoli 30 minut. Omogoča nam, da ocenimo ustreznost kužnine. Je relativno dobro občutljiva in specifična. Glede na osamitev v celični kulturi ocenjujejo, da ima DIF občutljivost 75–85 % oz. specifičnost 98–99 %. V primerjavi z NAATs ima DIF nižjo občutljivost (24). Slabost testa DIF je subjektivna interpretacija rezultata. Zaradi izvedbe je primerna le za laboratorije z nizkim številom preiskav (33).

Najnovejše smernice CDC in IUSTI za Evropo odsvetujejo uporabo DIF za diagnostiko urogenitalne okužbe s *C. trachomatis* in kot edine ustrezne teste navajajo NAATs (21, 22).

V preteklosti so za neposredno dokazovanje klamidijskih antigenov pogosto uporabljali teste ELISA. Zaradi slabe občutljivosti in specifičnosti se danes uporaba teh metod ne priporoča, nadomeščajo jih molekularne metode (28).

Testi pomnoževanja nukleinskih kislin

Testi pomnoževanja nukleinskih kislin (NAATs) so zasnovani tako, da pomnožujejo specifični odsek zaporedja nukleinske kisline. Praviloma so visoko občutljivi, z njimi lahko teoretično dokažemo eno samo kopijo tarčne DNK ali RNK (34). Na občutljivost testa vplivajo primernost in vrsta vzorca ter prisotnost inhibitorjev v vzorcu (35). Na specifičnost testov lahko vpliva več dejavnikov, poleg pogojev reakcije še zlasti izbira tarčnega zaporedja – specifičnega odseka zaporedja nukleinske kisline, ki ga v testu pomnožujemo.

V različnih kromosomskih genih in v kriptičnem plazmidu *C. trachomatis* je mnogo visoko ohranjenih nukleotidnih zaporedij, ki se uporabljajo kot tarčne sekvence v testih pomnoževanja nukleinskih kislin (36). Ta zaporedja so: geni na kriptičnem plazmidu, gen *ompA*, ki nosi zapis za MOMP, geni 23S rRNK in geni za s cisteinom bogat protein zunanje membrane (37). Večina NAATs za tarčno zaporedje uporablja zapis na kriptičnem plazmidu, ki je prisoten v večkratnih kopijah, njegovo nukleotidno zaporedje je visoko ohranjeno in je dokazano pri vseh genotipih *C. trachomatis* (36, 38). Problem te izbire je, da so dokazani izolati *C. trachomatis*, ki nimajo kriptičnega plazmida (39, 40) ali pa da se zaporedje na kriptičnem plazmidu spremeni zaradi možne mutacije (41). Kadar za tarčno zaporedje izbere-

mo kromosomske gene, teh nevarnosti ni, so pa ti testi v primerjavi s testi, ki uporabljajo kot tarčno zaporedje del kriptičnega plazmida, manj občutljivi (36, 42). Ko izbiramo test, moramo izbrati takšnega, ki zazna seve brez kriptičnega plazmida oz. tiste seve, pri katerih je nukleotidno zaporedje na kriptičnem plazmidu spremenjeno (21).

NAATs so hitri, imajo visoko občutljivost (92–100 %) in visoko specifičnost (od 99–100 %) (43). Danes veljajo za zlati standard v diagnostiki urogenitalnih okužb z bakterijo *C. trachomatis* (44).

Ker imajo NAATs visoko občutljivost, lahko za diagnozo urogenitalnih okužb s *C. trachomatis* uporabimo tudi kužnine, pri katerih je odvzem za bolnika manj obremenjujoč. Tako so primerne kužnine za dokaz urogenitalne okužbe s *C. trachomatis* zlasti prvi curek urina pri moških in bris nožnice pri ženskah. Te kužnine vsebujejo praviloma nizke koncentracije ET *C. trachomatis* oz. epiteljskih celic, v katerih se klamidija razmnožuje, zato niso primerne za testiranje z metodami z nižjo občutljivostjo, kot sta gojitev v celični kulturi in DIF (21, 22).

Med NAATs za dokazovanje okužbe s *C. trachomatis* danes prevladujejo tri skupine testov (22, 24):

- Testi verižne reakcije s polimerazo (angl. *polymerase chain reaction*, PCR); uporabljamo zlasti različico testa PCR v realnem času. S PCR dokazujemo specifično zaporedje DNK.
- Testi, ki temeljijo na pomnoževanju, posredovanem z izmikanjem verige (angl. *strand displacement amplification*, SDA); izotermalna metoda pomnoževanja, kjer pomnožujemo specifično zaporedje DNK.
- Testi pomnoževanja, ki je posredovano s prepisovanjem (angl. *transcription-mediated amplification*, TMA); izotermalna metoda pomnoževanja, kjer pomnožujemo specifično zaporedje RNK.

V prispevku želimo oceniti, kakšen je obseg testiranja na urogenitalno okužbo s klamidijo pri nas, ugotoviti kakšen delež med preiskavami zavzemajo testi, ki jih za diagnostiko urogenitalnih okužb priporočajo mednarodne smernice. Prikazati želimo tudi, katere metode uporabljajo sodelujoči laboratoriji ter ali so laboratoriji vključeni v sheme zunanjega nadzora kakovosti.

METODE

Retroaktivno smo iz laboratorijskih informacijskih sistemov pridobili podatke o številu preiskovancev, ki so bili testirani na klamidijske urogenitalne okužbe v letih od 2009 do 2013. Predstavnike vseh laboratorijev, ki so sodelovali pri pridobivanju podatkov, smo zaprosili, da natančno navedejo, katere od metod uporabljajo in ali kakovost metode preverjajo z vključitvijo v zunanje sheme nadzora kakovosti.

REZULTATI

Podatke o številu oseb, ki so bile testirane na klamidijske urogenitalne okužbe v letih od 2009 do 2013, smo zbrali iz vseh 9 slovenskih kliničnih mikrobioloških laboratorijev, ki ta testiranja izvajajo. To so: Inštitut za klinično mikrobiologijo in imunologijo Univerze v Ljubljani, območni laboratoriji Nacionalnega laboratorija za zdravje, okolje in hrano (NLZOH) ter mikrobiološki laboratorij Splošne bolnišnice »dr. Franca Derganca« Nova Gorica. Podatke prikazuje tabela 1. V nadaljnjem besedilu teste NAATs, ki jih izvajamo v slovenskih laboratorijih, označujemo s PCR, saj v vseh laboratorijih za diagnostiko urogenitalne okužbe s *C. trachomatis* uporabljamo izključno tovrstne teste.

V petletnem obdobju 2009–2013 smo z metodo DIF na urogenitalno okužbo s klamidijo testirali 5.553 bolnikov, z metodami PCR pa 7.986 bolnikov. Z metodo DIF smo ugotovili 702, z metodami

PCR pa 1.054 klamidijских okužb. Letno povprečje za DIF znaša 140,4, za PCR pa 210,8 ugotovljenih klamidijских okužb, kar pomeni 6,8 (ugotovljenih DIF) oz. 10,23 (ugotovljenih s PCR) diagnosticiranih urogenitalnih okužb na 100.000 prebivalcev. Vrednosti, ločene po spolu, bi znašale za moške 7,35 (DIF) oz. 13,6 (PCR) na 100.000 moških na leto, za ženske pa 6,3 (DIF) oz. 7 (PCR) na 100.000 žensk na leto. Za izračun smo uporabili zaokrožene podatke, ki smo jih dobili na spletni strani Statističnega urada Republike Slovenije in so veljali na dan 1. julij, 2013 (45). Predpostavili smo, da v Sloveniji živi 2.060.000 prebivalcev, od tega 1.020.000 moških in 1.040.000 žensk.

Ocenili smo tudi, pri kolikšnem deležu bolnikov smo uporabili teste DIF in pri kolikšnem deležu teste PCR. S testi DIF smo testirali urogenitalne kužnine 5.553 bolnikov, medtem ko smo s testi PCR testirali kužnine 7.986 bolnikov. Izračunali smo, da smo opravili test PCR pri 60 % bolnikov.

Za diagnozo urogenitalne klamidijske okužbe z metodo DIF osem laboratorijev

uporablja diagnostični komplet Micro-track proizvajalca Trinity Biotech, en laboratorij pa diagnostični komplet Chlamydia direct IF proizvajalca Biomerieux.

Teste, ki temeljijo na pomnoževanju nukleinskih kislin, izvaja sedem laboratorijev. Trije med njimi uporabljajo diagnostični komplet GenXpert CT/NG, ki ga izdeluje podjetje Cepheid, od preostalih štirih laboratorijev v vsakem uporabljajo svoj test, in sicer: Cobas Taqman CT test, ki ga izdeluje Roche, Artus CT plus RG PCR, ki ga izdeluje Qiagen, Anyplex STI 7 test proizvajalca Seegen in v laboratoriju validiran PCR test v realnem času.

Vsi razen enega laboratorija, ki izvajajo teste, ki temeljijo na pomnoževanju nukleinskih kislin, so vključeni v zunanji nadzor kakovosti.

RAZPRAVA

Ugotavljamo, da smo v petletnem obdobju od leta 2009 do leta 2013 ugotovili klamidijško okužbo z metodo DIF pri 702 preiskovancih in z metodami PCR pri 1.054 preiskovancih. Letno povprečje novih diagnoz klamidijских okužb na 100.000 pre-

Tabela 1. Obseg in rezultati testiranja na urogenitalno klamidijško okužbo od leta 2009 do leta 2013 v slovenskih kliničnih mikrobioloških laboratorijih, prikazani ločeno po spolu, starosti in metodi testiranja. DIF – direktna imunofluorescenca, PCR – verižna reakcija s polimerazo.

	starost (leta)	število oseb, pri katerih smo izvedli DIF	število oseb, pri katerih je bila DIF pozitivna (%)	število oseb, pri katerih smo izvedli PCR	število oseb, pri katerih je bil PCR pozitiven (%)
moški	15–20	97	21 (21,65)	201	49 (24,38)
	21–30	686	176 (25,66)	1.655	439 (26,53)
	31–40	624	110 (17,63)	1.098	148 (13,48)
	41 in več	727	68 (9,35)	874	58 (6,64)
	skupaj	2.134	375 (17,57)	3.828	694 (18,13)
ženske	15–20	244	34 (13,93)	434	53 (12,21)
	21–30	1.443	156 (10,81)	2.044	236 (11,55)
	31–40	1.098	91 (8,29)	1.019	53 (5,20)
	41 in več	634	46 (7,29)	661	18 (2,72)
	skupaj	3.419	327 (9,56)	4.158	360 (8,66)

bivalcev znaša tako od 6,8 (z DIF) do 10,2 (z NAATs).

Poročila Nacionalnega inštituta za javno zdravje (NIJZ) podajajo za to obdobje 1.034 (725 pri moških in 309 pri ženskah) prijavljenih urogenitalnih okužb s *C. trachomatis*, kar znaša 10,04 prijavljene okužbe na 100.000 prebivalcev (46, 47, 48, 49, 50). Prav tako lahko iz letnih poročil NIJZ ugotovljamo, da je bilo v tem obdobju prijavljenih 725 urogenitalnih klamidijских okužb pri moških in 309 okužb pri ženskah.

Mi smo z metodo DIF ugotovili 375 okužb pri moških in 327 okužb pri ženskah. Z metodami PCR smo ugotovili 694 okužb pri moških in 360 okužb pri ženskah.

Točnega števila oseb s klamidijско urogenitalno okužbo iz naših podatkov ne moremo ugotoviti, saj smo posebej obdelali število bolnikov, testiranih z DIF, in posebej število bolnikov testiranih s PCR, pri čemer so bili lahko bolniki testirani z obema metodama. Kljub temu pa lahko ugotovljamo, da je bilo v mikrobioloških laboratorijih ugotovljenih več urogenitalnih okužb, kot jih je bilo prijavljenih. Prijava vsake nove diagnoze okužbe z bakterijo *C. trachomatis* v Sloveniji je zakonska obveza zdravnika, ki je postavil diagnozo. Prijave se zbirajo in obdelujejo na NIJZ (Ur. l. RS, št. 33/2006).

Podatki, ki smo jih pridobili, verjetno odražajo pretežno delež urogenitalnih okužb s klamidijo pri bolnikih oz. bolnicah s simptomi, in ne deležev okužbe med prebivalstvom. Z metodo DIF smo urogenitalno okužbo dokazali pri 17,5 % testiranih bolnikov in 9,56 % testiranih bolnic, medtem ko smo z metodami PCR dokazali urogenitalno klamidijско okužbo pri 18,13 % bolnikov in 8,66 % bolnic.

Največjo prevalenco urogenitalne okužbe smo ugotovili pri ženskah v starostni skupini od 15 do 20 let in pri moških v starostni skupini od 21 do 30 let. V starostni skupini od 15 do 21 let znaša

prevalenca klamidijске okužbe pri moških 21,65 % (DIF) oz. 24,38 % (PCR), medtem ko pri ženskah v tej starostni skupini znaša 13,93 % (DIF) oz. 12,21 % (PCR). Pri moških smo ugotovili najvišjo prevalenco v starostni skupini od 21 do 30 let. Ugotovili smo, da je v tej starostni skupini s klamidijo okuženih 25,66 (DIF) oz. 26,53 % (PCR) moških. Delež žensk z urogenitalno klamidijско okužbo v tej skupini znaša 10,88 (DIF) oz. 11,55 (PCR).

Naši rezultati glede deleža ugotovljenih urogenitalnih okužb v različnih starostnih skupinah se skladajo s podatki iz dveh slovenskih raziskav, kjer so obravnavali bolnike s simptomi okužbe. Tako v članku iz leta 1999 avtorji ugotavljajo, da so dokazali klamidijско okužbo pri 16,1 % moških in 5,3 % žensk, starih med 18 in 40 let (51).

V drugi raziskavi, ki je zajemala obdobje 1999–2003, pa so dokazali okužbo s *C. trachomatis* pri 19,5 % moških in 10,7 % žensk, ki so se zdravili v ambulantah za spolno prenosljive okužbe. Starost bolnikov je bila od 15 do 59 let, največjo prevalenco okužbe pa ugotavljajo pri obeh spolih v starostni skupini 21–30 let, in sicer 26,2 % okužb pri moških in 16,7 % okužb pri ženskah (52).

Podobno kot avtorji te raziskave tudi mi ugotovljamo, da prevalenca urogenitalne okužbe pada v starostnih skupinah 30 let in več (52). Pri naših podatkih odstopa visoka prevalenca (7,29 %), ugotovljena samo z DIF, pri skupini žensk starejših od 41 let. S PCR je bila ugotovljena veliko nižja (2,72 %) prevalenca. To je skladno s prevalenco, ugotovljeno v raziskavi iz let 1999–2003, kjer so pri ženskah starostne skupine 41–50 let ugotovili urogenitalno okužbo s *C. trachomatis* v 2,6 %.

Ker razen starosti in spola drugih značilnosti skupin, pri katerih smo ugotovljali urogenitalno okužbo s *C. trachomatis*, ne poznamo, je težko razložiti, zakaj takšno odstopanje.

V tej starostni skupini pri moških ugotavljamo prevalenco 9,35 % (DIF) oz. 6,64 % (PCR), kar je primerljivo z raziskavo iz leta 1999–2003 (52), medtem ko pri ženskah, starejših od 41 let, ugotavljamo z DIF prevalenco 7,29 %, z NAATs pa 2,72 % (PCR).

Ker smernice in priporočila CDC in IUSTI za vsakodnevno diagnostiko urogenitalne okužbe s *C. trachomatis* zahtevajo uporabo testov, ki temeljijo na pomnoževanju nukleinskih kislin, kot najprimernejše vzorce pa navajajo FVU pri moških in bris nožnice pri ženskah, smo ocenili, kakšen delež testiran v naših laboratorijih opravimo z DIF oz. s PCR (21, 22). Po grobi oceni smo z metodami, ki temeljijo na pomnoževanju nukleinskih kislin, ugotavljali klamidijsko okužbo pri 60 % vseh testiranih bolnikov. Delež je lahko zavajajoč, ker smo posameznike lahko testirali tudi z obema metodama. Domnevamo lahko, da so se zdravniki, ki sicer za diagnostiko urogenitalne okužbe še vedno uporabljajo DIF, odločali za uporabo PCR pri diagnostično težavnejših primerih. Po podatkih ECDC je še leta 2005 Slovenija sodila v skupino držav, ki s PCR opravijo manj kot 50 % vseh testiranj na urogenitalno okužbo s *C. trachomatis* (2).

Pri uvajanju molekularnega testiranja na klamidijsko okužbo v laboratorij je zelo pomembna izbira ustreznega testa. Danes so na voljo različni testi, ki temeljijo na pomnoževanju nukleinskih kislin. Vsi slovenski mikrobiološki laboratoriji, ki izvajajo NAATs, uporabljajo teste, ki temeljijo na PCR v realnem času. Test GeneXpert CT/NG, ki temelji izključno na dokazovanju nukleotidnega zaporedja na kromosomu *C. trachomatis* uporabljajo trije laboratoriji (53). Testi Cobas TaqMan CT in Artus CT Plus RG PCR (54, 55) ter prav tako v laboratoriju validiran test za diagnozo urogenitalnih okužb s *C. trachomatis* zaznavajo specifično nukleotidno zaporedje na kromosomu *C. trachomatis* in hkrati spe-

cifično nukleotidno zaporedje na kriptičnem plazmidu *C. trachomatis*. Plazmid je v celicah *C. trachomatis* prisoten v večkratnih kopijah, njegovo nukleotidno zaporedje je visoko ohranjeno, dokazan je pri vseh genotipih *C. trachomatis*. Kriptični plazmid kot tarčno zaporedje uporabljajo številni NAATs za dokazovanje okužbe s *C. trachomatis*, ki so opisani v literaturi (36). Zaradi možnosti mutacije v plazmidu je priporočljivo uporabljati metodo, ki hkrati pomnožuje še drugo – kromosomalno oligonukleotidno zaporedje. Znani so namreč primeri delecije v kriptičnem plazmidu prav na mestu, kjer so nalegali oligonukleotidni začetniki diagnostičnih kompletov za ugotavljanje klamidijske DNK (41, 56). Prav tako pa so iz literature znani redki opisi sevov *C. trachomatis*, ki plazmida sploh nimajo (39, 40). Eden od laboratorijev, ki izvajajo NAATs uporablja za diagnostiko urogenitalnih okužb Anyplex II STI-7 test, ki temelji na zaznavanju enega samega za *C. trachomatis* specifičnega oligonukleotidnega zaporedja v sklopu večkratne PCR za hkratno detekcijo sedem urogenitalnih patogenov (57).

Vsi laboratoriji, ki izvajajo NAATs za diagnostiko urogenitalne klamidijske okužbe, razen enega, so vključeni v sheme zunanjega nadzora testiranja. Laboratorij, ki v te sheme še ni vključen, je v fazi uvajanja NAATs testiranja.

ZAKLJUČKI

Okužbe urogenitalnega trakta, ki jih povzroča klamidija so ozdravljive, vendar jih pogosto ne ugotovimo in ne zdravimo, ker potekajo asimptomatsko. Če okužb s *C. trachomatis* ne zdravimo, lahko te privedejo do resnih zapletov.

Za zdravljenje okužb in preprečevanje posledic le-teh je pomembno redno testiranje oseb s simptomi urogenitalne okužbe, prav tako pa bi bilo potrebno uvesti presejalno testiranje oseb z višjim tveganjem za klamidijsko okužbo.

Testi, ki temeljijo na pomnoževanju nukleinskih kislin, so v primerjavi s klasičnimi testi bolj občutljivi in enostavnejši za izvedbo ter interpretacijo rezultatov. Njihova pomembna prednost pred klasičnimi testi je tudi izbira kužnine. S klasičnimi testi ugotavljamo urogenitalno okužbo s klamidijo predvsem v brisu materničnega vratu pri ženskah in brisu sečnice pri moških. NAATs imajo visoko občutljivost in so primerni tudi za testiranje kužnin, kot sta FVU in brisi nožnice. Zato za ugotavljanje klamidijske okužbe CDC, IUSTI in

ECDC priporočajo uporabo testov, ki temeljijo na pomnoževanju nukleinskih kislin.

Z razvojem metod, ki temeljijo na pomnoževanju nukleinskih kislin, in z večjo ponudbo testov so postali diagnostični kompleti reagentov cenovno dostopnejši. Zato se nam ponuja priložnost, da tudi v Sloveniji upoštevamo moderne smernice za diagnostiko urogenitalnih okužb in da pri ugotavljanju urogenitalnih okužb, ki jih povzroča *C. trachomatis*, povsem preidemo na molekularne metode, ki temeljijo na pomnoževanju nukleinskih kislin.

LITERATURA

1. Low N, McCarthy A, Macleod J, et al. Epidemiological, social, diagnostic and economic evaluation of population screening for genital chlamydial infection. *Health Technol Assess* 2007; 11 (8): 1-165.
2. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Chlamydia control in Europe. Stockholm: ECDC; 2009
3. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Review of Chlamydia control activities in EU countries. Stockholm: ECDC; 2008.
4. Stamm WE. Chlamydia trachomatis infections of the adult. In: Holmes KK, Mardh P-A, Spanling PF, eds. Sexually transmitted diseases. 3rd ed. New York: McGraw-Hill; 1999. p. 407-22.
5. Peipert JF. Clinical practice. Genital chlamydial infections. *N Engl J Med*. 2003; 349: 2424-30.
6. Manavi K. A review on infection with Chlamydia trachomatis. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2006; 20: 941-51.
7. World Health Organization, Department of Reproductive Health and Research. Prevalence And Incidence Of Selected Sexually Transmitted Infections. Geneva, Switzerland: WHO Press; 2011.
8. Low N, Bender N, Nartey L, et al. Effectiveness of chlamydia screening: systematic review. *Int J Epidemiol* 2009; 38:435-48.
9. Keše D. Klamidije. In: Gubina M, Ihan A, eds. Medicinska mikrobiologija z imunologijo. Ljubljana: Medicinski razgledi; 2002. p. 321-328.
10. Paavonen J, Eggert-Kruse W. Chlamydia trachomatis: impact on human reproduction. *Hum Reprod Update*. 1999; 5: 433-47.
11. U.S. Preventive Services Task Force. Screening for chlamydial infection: U.S. Preventive Services Task Force recommendation statement. *Annals of internal medicine*. 2007; 147: 128-34.
12. Nieuwenhuis RF, Ossewaarde JM, Gotz HM, et al. Resurgence of lymphogranuloma venereum in Western Europe: an outbreak of Chlamydia trachomatis serovar I2 proctitis in The Netherlands among men who have sex with men. *Clin Infect Dis*. 2004; 39: 996-1003.
13. Ward H, Martin I, Macdonald N, et al. Lymphogranuloma venereum in the United kingdom. *Clin Infect Dis*. 2007; 44: 26-32.
14. Kapoor S. Re-emergence of lymphogranuloma venereum. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2008; 22: 409-16.
15. Christerson L, de Vries HJ, de Barbeyrac B, et al. Typing of lymphogranuloma venereum Chlamydia trachomatis strains. *Emerg Infect Dis*. 2010; 16: 1777-9.
16. Kacmar J, Cheh E, Montagna A, et al. A randomized trial of azithromycin versus amoxicillin for the treatment of Chlamydia trachomatis in pregnancy. *Infect Dis Obstet Gynecol*. 2001; 9: 197-202.
17. Jacobson GF, Autry AM, Kirby RS, et al. A randomized controlled trial comparing amoxicillin and azithromycin for the treatment of Chlamydia trachomatis in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*. 2001; 184: 1352-4.

18. Bhengraj AR, Vardhan H, Srivastava P, et al. Decreased susceptibility to azithromycin and doxycycline in clinical isolates of *Chlamydia trachomatis* obtained from recurrently infected female patients in India. *Chemotherapy*. 2010; 56: 371–7.
19. Clarke IN. Evolution of *Chlamydia trachomatis*. *Ann N Y Acad Sci*. 2011;1230: 11–8.
20. McLean CA, Stoner BP, Workowski KA. Treatment of lymphogranuloma venereum. *Clin Infect Dis*. 2007; 44 Suppl 3: 147–52.
21. Lanjouw E, Ossewaarde JM, Strydom A, et al. 2010 European guideline for the management of *Chlamydia trachomatis* infection. *International journal of STD & AIDS*. 2010; 21: 729–37.
22. Center for disease control. Recommendations for the laboratory-based detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*--2014. *MMWR Recomm Rep* 2014; 63:1–19.
23. Mahony JB, Combes BK, Chernesky MA. *Chlamydia* and *chlamydia*. In: Murray PR et al., eds. *Manual of clinical microbiology*. 8th ed. Washington, DC: ASM; 2003. p. 991–1004.
24. Chernesky MA. The laboratory diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections. *Can J Infect Dis Med Microbiol*. 2005; 16: 39–44.
25. Schachter J, Moncada J, Liska S, et al. Nucleic acid amplification tests in the diagnosis of chlamydial and gonococcal infections of the oropharynx and rectum in men who have sex with men. *Sexually transmitted diseases*. 2008; 35: 637–42.
26. Elnifro EM, Storey CC, Morris DJ, et al. Polymerase chain reaction for detection of *Chlamydia trachomatis* in conjunctival swabs. *The British journal of ophthalmology*. 1997; 81: 497–500.
27. Hammerschlag MR, Roblin PM, Gelling M, et al. Use of polymerase chain reaction for the detection of *Chlamydia trachomatis* in ocular and nasopharyngeal specimens from infants with conjunctivitis. *The Pediatric infectious disease journal*. 1997; 16: 293–7.
28. Essig A. *Chlamydia* and *Chlamydia*. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, eds. *Manual of clinical Microbiology*, 9th ed., Vol. 1. Washington, DC: ASM Press; 2007. p. 1021–1035.
29. Harkins AL, Munson E. Molecular Diagnosis of Sexually Transmitted *Chlamydia trachomatis* in the United States. *ISRN Obstet Gynecol* 2011; 2011: 279149.
30. Black CM. Current methods of laboratory diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections. *Clin Microbiol Rev*. 1997; 10: 160–84
31. Eley A. How to detect *Chlamydia trachomatis* in males? *J Androl*. 2011; 32 (1): 15–22.
32. Mania-Pramanik J, Potdar S, Kerkar S. Diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infection. *J Clin Lab Anal*. 2006; 20: 8–14.
33. Woods GL, Bryan JA. Detection of *Chlamydia trachomatis* by direct fluorescent antibody staining. Results of the College of American Pathologists Proficiency Testing Program, 1986–1992. *Arch Pathol Lab Med*. 1994; 118: 483–8.
34. Chernesky MA. Nucleic acid tests for the diagnosis of sexually transmitted diseases. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 1999; 24: 437–46.
35. Mahony J, Chong S, Jang D, et al. Urine specimens from pregnant and nonpregnant women inhibitory to amplification of *Chlamydia trachomatis* nucleic acid by PCR, ligase chain reaction, and transcription-mediated amplification: identification of urinary substances associated with inhibition and removal of inhibitory activity. *J Clin Microbiol*. 1998; 36: 3122–6.
36. Jalal H, Stephen H, Curran MD, et al. Development and validation of a rotor-gene real-time PCR assay for detection, identification, and quantification of *Chlamydia trachomatis* in a single reaction. *J Clin Microbiol*. 2006; 44: 206–13.
37. Sachdeva P, Patel AL, Sachdev D, et al. Comparison of an in-house PCR assay, direct fluorescence assay and the Roche AMPLICOR *Chlamydia trachomatis* kit for detection of *C. trachomatis*. *J Med Microbiol*. 2009; 58: 867–73.
38. Ostergaard L. Microbiological aspects of the diagnosis of *Chlamydia trachomatis*. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2002; 16: 789–99.
39. Stothard DR, Williams JA, Van Der Pol B, et al. Identification of a *Chlamydia trachomatis* serovar E urogenital isolate which lacks the cryptic plasmid. *Infect Immun*. 1998; 66: 6010–3.
40. Peterson EM, Markoff BA, Schachter J, et al. The 7.5-kb plasmid present in *Chlamydia trachomatis* is not essential for the growth of this microorganism. *Plasmid*. 1990; 23: 144–8.
41. Ripa T, Nilsson P. A variant of *Chlamydia trachomatis* with deletion in cryptic plasmid: implications for use of PCR diagnostic tests. *Euro Surveill* 2006; 11: E061109.2.

42. George JA, Panchatcharam TS, Paramasivam R, et al. Evaluation of diagnostic efficacy of PCR methods for Chlamydia trachomatis infection in genital and urine specimens of symptomatic men and women in India. *Jpn J Infect Dis*. 2003; 56: 88–92.
43. Patel AL, Sachdev D, Nagpal P, et al. Prevalence of Chlamydia infection among women visiting a gynaecology outpatient department: evaluation of an in-house PCR assay for detection of Chlamydia trachomatis. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2010; 9: 24.
44. Skidmore S, Horner P, Mallinson H. Testing specimens for Chlamydia trachomatis. *Sex Transm Infect*. 2006; 82: 272–5.
45. Statistični urad republike Slovenije. <http://www.stat.si/index.asp>
46. Klavs I, Kustec T, Kastelic Z. Spolno prenesene okužbe v Sloveniji v letu 2009. [document on internet] Ljubljana. Nacionalni inštitut za javno zdravje; 2010. [citirano 20. oktober 2014]. Dosegljivo na: http://www.ivz.si/hiv_spo.
47. Klavs I, Kustec T, Kastelic Z. Spolno prenesene okužbe v Sloveniji v letu 2010. [document on internet] Ljubljana. Nacionalni inštitut za javno zdravje; 2011. [citirano 20. oktober 2014]. Dosegljivo na: http://www.ivz.si/hiv_spo.
48. Klavs I, Kustec T, Kastelic Z. Spolno prenesene okužbe v Sloveniji v letu 2011. [document on internet] Ljubljana. Nacionalni inštitut za javno zdravje; 2012. [citirano 20. oktober 2014]. Dosegljivo na: http://www.ivz.si/hiv_spo.
49. Klavs I, Kustec T, Kastelic Z. Spolno prenesene okužbe v Sloveniji v letu 2012. [document on internet] Ljubljana. Nacionalni inštitut za javno zdravje; 2013. [citirano 20. oktober 2014]. Dosegljivo na: http://www.ivz.si/hiv_spo.
50. Klavs I, Kustec T, Kastelic Z. Spolno prenesene okužbe v Sloveniji v letu 2013. [document on internet] Ljubljana. Nacionalni inštitut za javno zdravje; 2012. [citirano 20. oktober 2014]. Dosegljivo na: http://www.ivz.si/hiv_spo.
51. Keše D, Potočnik M, Marin J. Sexually transmitted Chlamydia trachomatis infection in Slovenia. *Acta Dermatovenerol Croat* 1999; 5: 203.
52. Kese D, Maticic M, Potocnik M. Chlamydia trachomatis infections in heterosexuals attending sexually transmitted disease clinics in Slovenia. *Clin Microbiol Infect*. 2005; 11: 240–2.
53. Gaydos CA. Review of use of a new rapid real-time PCR, the Cepheid GeneXpert(R) (Xpert) CT/NG assay, for Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae: results for patients while in a clinical setting. *Expert Rev Mol Diagn* 2014; 14: 135–7.
54. Taylor SN, Liesenfeld O, Lillis RA, et al. Evaluation of the Roche cobas(R) CT/NG test for detection of Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae in male urine. *Sex Transm Dis* 2012; 39: 543–9.
55. Herrmann B. A new genetic variant of Chlamydia trachomatis. *Sex Transm Infect* 2007; 83: 253–4.
56. Hopkins MJ, Ashton LJ, Alloba F, et al. Validation of a laboratory-developed real-time PCR protocol for detection of Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae in urine. *Sex Transm Infect*. 2010; 86: 207–11.
57. Choe HS, Lee DS, Lee SJ, et al. Performance of Anyplex II multiplex real-time PCR for the diagnosis of seven sexually transmitted infections: comparison with currently available methods. *Int J Infect Dis* 2013; 17: 1134–40.

Darja Duh¹, Mojca Cimerman², Andrej Golle³

Uporabnost metode multipleks PCR za molekularno diagnostiko spolno prenosljivih okužb

The use of Multiplex PCR for Molecular Diagnostic of Sexually Transmitted Infections

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: spolno prenosljive okužbe, mikrobiološka diagnostika, multipleks PCR, sočasno dokazovanje patogenov

IZHODIŠČA. Pravočasna in pravilna mikrobiološka diagnostika spolno prenosljivih okužb je izredno pomembna, saj lahko nezdravljene okužbe s temi patogeni povzročijo številne zdravstvene zaplete. Za zlati standard v diagnostiki večine spolno prenosljivih okužb veljajo testi pomnoževanja nukleinskih kislin. Zaradi raznolikosti spolno prenosljivih patogenov je smiselno uporabljati multipleks molekularne metode za sočasno dokazovanje mikroorganizmov. METODE. Na urogenitalnih vzorcih iz Oddelka za kožne in spolne bolezni Univerzitetnega kliničnega centra Maribor smo preizkusili multipleks metodo STD-Finder™ SMART 7. Rezultate smo primerjali z rezultati polimerazne verižne reakcije v realnem času. Princip multipleks metode temelji na SmartFinder® tehnologiji, ki omogoča dokaz različnih tarč v eni reakciji z uporabo posebnih ligirajočih sond na aparatu za polimerazno verižno reakcijo. Z metodo dokazujemo patogene: *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium*, *Trichomonas vaginalis*, *Treponema pallidum*, HSV-1 in HSV-2. REZULTATI. Iz šestmesečnega obdobja smo izbrali 84 urogenitalnih vzorcev, v katerih smo s polimerazno verižno reakcijo v realnem času dokazali DNK *C. trachomatis* v 30 ter DNK *N. gonorrhoeae* v 12 primerih. Preostalih 42 vzorcev je bilo negativnih. Z multipleks metodo smo DNK *C. trachomatis* in *N. gonorrhoeae* potrdili v vseh pozitivnih vzorcih. V dveh pozitivnih vzorcih smo dokazali še prisotnost dodatnih patogenov: HSV-2 in *T. vaginalis*. V dveh od 42 negativnih vzorcev smo dokazali še HSV-1 in *M. genitalium*. ZAKLJUČKI. Uvedba multipleks metode za sočasno dokazovanje spolno prenosljivih patogenov bi bila smiselna tudi v našem laboratoriju. Pri izbiri multipleks metode je potrebno poleg občutljivosti in specifičnosti upoštevati še ostale dejavnike: nabor spolno prenosljivih patogenov, način in čas izvedbe metode ter ceno reagentov in aparatov.

¹ Asist. dr. Darja Duh, univ. dipl. mikrobiol., Oddelek za medicinsko mikrobiologijo Maribor, Center za medicinsko mikrobiologijo, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Prvomajska ulica 1, 2000 Maribor; darja.duh@nlzoh.si

² Mojca Cimerman, univ. dipl. mikrobiol., Oddelek za medicinsko mikrobiologijo Maribor, Center za medicinsko mikrobiologijo, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Prvomajska ulica 1, 2000 Maribor

³ Asist. mag. Andrej Golle, dr. med., spec. klin. mikrobiol., Oddelek za medicinsko mikrobiologijo Maribor, Center za medicinsko mikrobiologijo, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Prvomajska ulica 1, 2000 Maribor

ABSTRACT

KEY WORDS: sexually transmitted infections, microbiological diagnosis, multiplex PCR, simultaneous pathogen detection

BACKGROUND. If left untreated, sexually transmitted infections can progress to chronic clinical conditions. It is therefore crucial to apply rapid and reliable laboratory techniques when diagnosing sexually transmitted infections. Nucleic acid amplification tests are now considered as the gold standard for diagnosis of most sexually transmitted infections and multiplex assays have an additional advantage of the simultaneous detection of multiple pathogens. **METHODS.** We tested a multiplex polymerase chain reaction assay STD Finder™ SMART 7 for the simultaneous detection of seven sexually transmitted disease pathogens: *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium*, *Trichomonas vaginalis*, *Treponema pallidum*, HSV-1 in HSV-2. The assay is based on the multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) technology and can be run on a real-time polymerase chain reaction cyler. Urogenital samples from the Department of Dermatology and Venereal Diseases, UMC Maribor, were used in the study. The results were compared to a specific real-time polymerase chain reaction routinely used in the laboratory. **RESULTS.** We selected 84 samples from the half-year period. The presence of *C. trachomatis* and *N. gonorrhoeae* DNA was proved by specific real-time polymerase chain reaction in 30 and 12 samples, respectively. The rest 42 samples were negative. By using the multiplex polymerase chain reaction we confirmed all positive samples and detected the DNA of two additional pathogens: HSV-2 in *T. vaginalis*. In two of the 42 negative samples, the presence of HSV-1 and *M. genitalium* DNA was confirmed by multiplex polymerase chain reaction. **CONCLUSIONS.** We concluded that the use of multiplex polymerase chain reaction would be beneficial for microbiological diagnostic of sexually transmitted infections in our laboratory. However, when choosing among the variety of commercially available multiplex methods, several factors should be considered: sensitivity and specificity of the method, the set of sexually transmitted pathogens included, the principle of the method, hands-on time and overall costs.

UVOD

Spolno prenosljive okužbe zavzemajo velik delež kužnih bolezni in predstavljajo veliko javnozdravstveno in finančno breme po vsem svetu (1). Povzročajo jih različni patogeni mikroorganizmi – bakterije, virusi in paraziti –, ki so povezani z različnimi in za njih značilnimi oblikami bolezni (2, 3). Kot spolno prenosljivi patogeni imajo največji vpliv na javno zdravstvo, družbo in kvaliteto življenja posameznika predvsem nekateri virusi: HIV, HBV, HPV in HSV-2 ter bakterije *Chlamydia trachomatis*, *Treponema pallidum* in *Neisseria gonorrhoeae*. Nezdruvljene okužbe

s temi patogeni lahko povzročijo številne zaplete, kot so vnetje v mali medenici, izvenmaternična nosečnost, neplodnost, razvoj raka na jajčnikih ali jetrih, nevrološke motnje, poškodbe notranjih organov ali visoko smrtnost v primeru okužb s HIV. Pravočasna in pravilna mikrobiološka diagnostika spolno prenosljivih okužb je zato nedvomno ključnega pomena (4, 5).

V tem prispevku se bomo osredotočili na molekularno diagnostiko spolno prenosljivih bakterij *C. trachomatis* in *N. gonorrhoeae*, ki jih dokazujemo v urogenitalnih vzorcih. Za zlati standard v diagnostiki okužb z bakterijo *C. trachomatis* veljajo testi

pomnoževanja nukleinskih kislin (NAATs). Le-te odlikujejo visoka občutljivost, specifičnost in nizek limit detekcije (6). Merila za razvoj in vpeljavo molekularnih testov v diagnostične namene so določena s smernicami in standardi. Danes na tržišču obstajajo številni diagnostični kompleti za dokazovanje DNK *C. trachomatis*, ki v večini ustrezajo tem standardom. Pri izbiri molekularne metode za dokazovanje *C. trachomatis* je smiselno upoštevati še dodatne dejavnike kot so primernost testnega vzorca, prevalenca okužb z bakterijo *C. trachomatis* v danem geografskem območju, cena preiskave, čas preiskave, stopnja avtomatiziranosti metode ter možnost sočasnega testiranja z ostalimi spolno prenosljivimi patogeni (7, 8).

V literaturi najdemo številne opise različnih »hišnih« in komercialnih molekularnih metod, ki jih po vsem svetu uporabljajo za dokazovanje bakterije *C. trachomatis* kot samostojne bakterije ali za dokazovanje sočasno z drugimi povzročitelji. Prvič so opisali verižno reakcijo s polimerazo (angl. *Polymerase chain reaction*, PCR) za dokazovanje DNK bakterije *C. trachomatis* leta 1990 (9). Sledil je nagel razvoj na tem področju, saj so v obdobju naslednjih šestih let objavili še podatke o prvem komercialno dostopnem kompletu reagentov, podatke o multipleks PCR za sočasno dokazovanje DNK bakterij *C. trachomatis* in *N. gonorrhoeae* ter podatke o prvem avtomatiziranem sistemu, ki omogoča obenem ekstrakcijo, pomnoževanje in dokaz DNK obeh bakterij (10-12). Po kratkem premoru leta 2005 so nato objavili prvi PCR v realnem času za dokazovanje *C. trachomatis*, temu pa je sledila poplava različnih molekularnih metod za sočasno dokazovanje bakterije *C. trachomatis* in ostalih spolno prenosljivih patogenov (13). Principi delovanja multipleks metod so različni in lahko temeljijo na PCR v realnem času, tehnologiji DPO (angl. *Dual Priming Oligonucleotides*),

metodi mPCR-RLB (PCR z *reverse line blotting*), tehnologiji XTR (ki temelji na amplifikaciji posredovani z izmikanjem verige) idr. (14-17). Multipleks metode so večinoma komercialno dostopne in vezane na določene aparate oziroma sisteme, ki nudijo popolno avtomatizacijo postopka. Slabost avtomatiziranih sistemov je predvsem začetni investicijski vložek, ki lahko za manjše laboratorije predstavlja preveliko finančno obremenitev.

Želeli smo preveriti, kakšno prednost bi v Laboratoriju za klinično molekularno diagnostiko, Oddelka za molekularno mikrobiologijo Nacionalnega laboratorija za zdravje, okolje in hrano (OMM-NLZOH) prinesla uvedba multipleks metode za sočasno dokazovanje več različnih spolno prenosljivih patogenov v primerjavi s PCR v realnem času. To metodo uporabljamo v laboratoriju za mikrobiološko diagnostiko bakterij *C. trachomatis* in *N. gonorrhoeae* iz urogenitalnih vzorcev. Izmed številnih multipleks metod smo izbrali takšno, ki prav tako temelji na principu PCR v realnem času in jo lahko izvajamo na aparatu za PCR, ki je že prisoten v laboratoriju.

METODE

V raziskavo smo vključili urogenitalne vzorce bolnikov, ki smo jih sprejeli v laboratorij v šest mesečnem obdobju z Oddelka za kožne in spolne bolezni, UKC Maribor. Vrsta naročene preiskave je bila PCR na bakterijo *C. trachomatis* in/ali bakterijo *N. gonorrhoeae*.

Brise sečnice, materničnega vratu, nožnice in rektalne sluznice smo ob sprejemu v laboratorij po potrebi zalili s fiziološko raztopino do največ 2 ml in jih skupaj z vzorci urina shranili v hladilniku pri 4 °C za največ 1 dan. Z vzorci vedno rokujemo v mikrobiološki komori druge varnostne stopnje in pri tem upoštevamo navodila za delo v molekularnem biološkem laboratoriju.

Ekstrakcijo DNK smo izvedli po navodilih proizvajalca, in sicer smo uporabili komercialni komplet reagentov RTP® DNA/RNA Virus Mini Kit (STRATEC Molecular GmbH, Nemčija). Princip ekstrakcije temelji na uporabi posebnih kolon s silikagelno membrano, na katero se zaradi kemijskih lastnosti vežejo nukleinske kisline.

Za dokazovanje DNK *C. trachomatis* v laboratoriju uporabljamo »hišno« metodo PCR v realnem času, ki jo je v magistrski nalogi ob upoštevanju standardov uvedel vodja laboratorija (18). Metoda temelji na uporabi barvila SYBR Green. Za izvedbo reakcije je potrebno uporabiti encim in barvilo v kompletu reagentov Universal SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, ZDA) ter začetne oligonukleotide za pomnoževanje 89 baznih parov (bp) dolgega fragmenta gena *ompA* *C. trachomatis* in 73 bp dolgega odseka kriptičnega plazmida bakterije. DNK bakterije *N. gonorrhoeae* dokazujemo s komercialno dostopno metodo PCR v realnem času LightMix® *Neisseria gonorrhoeae* (Tib MolBiol, Nemčija), ki vsebuje začetne oligonukleotide in hibridizirajoče sonde. Za izvedbo reakcij je potrebno uporabiti še encim v kompletu reagentov LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe (Roche Diagnostics, ZDA), kot to narekujejo navodila za izvedbo metode. Z metodo pomnožimo 166 bp dolg fragment gena *gyrA* bakterije *N. gonorrhoeae*.

Na izbranih urogenitalnih vzorcih, v katerih smo dokazali DNK ene ali obeh bakterij oziroma ki so bili negativni, smo naknadno preizkusili multipleks metodo STD-Finder™ SMART 7 (PathoFinder, Nizozemska). Uporabili smo predhodno ekstrahirano DNK, ki smo jo shranili v skrinji pri -20 °C. Princip multipleks metode temelji na SmartFinder® tehnologiji, ki omogoča dokaz različnih tarč v eni reakciji z uporabo specifičnih sond. Lete v postopku hibridizacije in ligacije do-

damo tarčni molekuli in nato izvedemo PCR v realnem času. Rezultate pomnoževanja smo odčitali pri različnih valovnih dolžinah na aparatu Rotor Gene Q (QIAGEN, Nemčija) v obliki talilnih krivulj in vrednosti primerjali s tistimi, ki jih navaja proizvajalec za posamezne patogene, vključene v multipleks metodo: *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium*, *Trichomonas vaginalis*, *Treponema pallidum*, HSV-1 in HSV-2. Reakcijo in analizo smo izvedli z upoštevanjem navodil proizvajalca.

REZULTATI

Za študijo smo izbrali 84 urogenitalnih vzorcev iz obdobja od septembra 2013 do februarja 2014. V 42 od 84 vzorcev smo dokazali prisotnost ene ali druge bakterije s specifičnim PCR v realnem času, in sicer smo DNK *C. trachomatis* potrdili v 30 ter DNK *N. gonorrhoeae* v 12 primerih. V preostalih 42 vzorcih iz istega obdobja nismo dokazali DNK omenjenih dveh bakterij.

Ekstrahirano DNK iz vseh 84 vzorcev smo uporabili tudi za multipleks metodo STD-Finder™ SMART 7. Vrednosti talilnih krivulj za posamezni patogen in valovno dolžino, ki smo jih povzeli po navodilih proizvajalca, so v tabeli 1.

Tabela 1. Vrednosti talilnih krivulj potrebne za analizo rezultatov. T_m – temperatura taljenja.

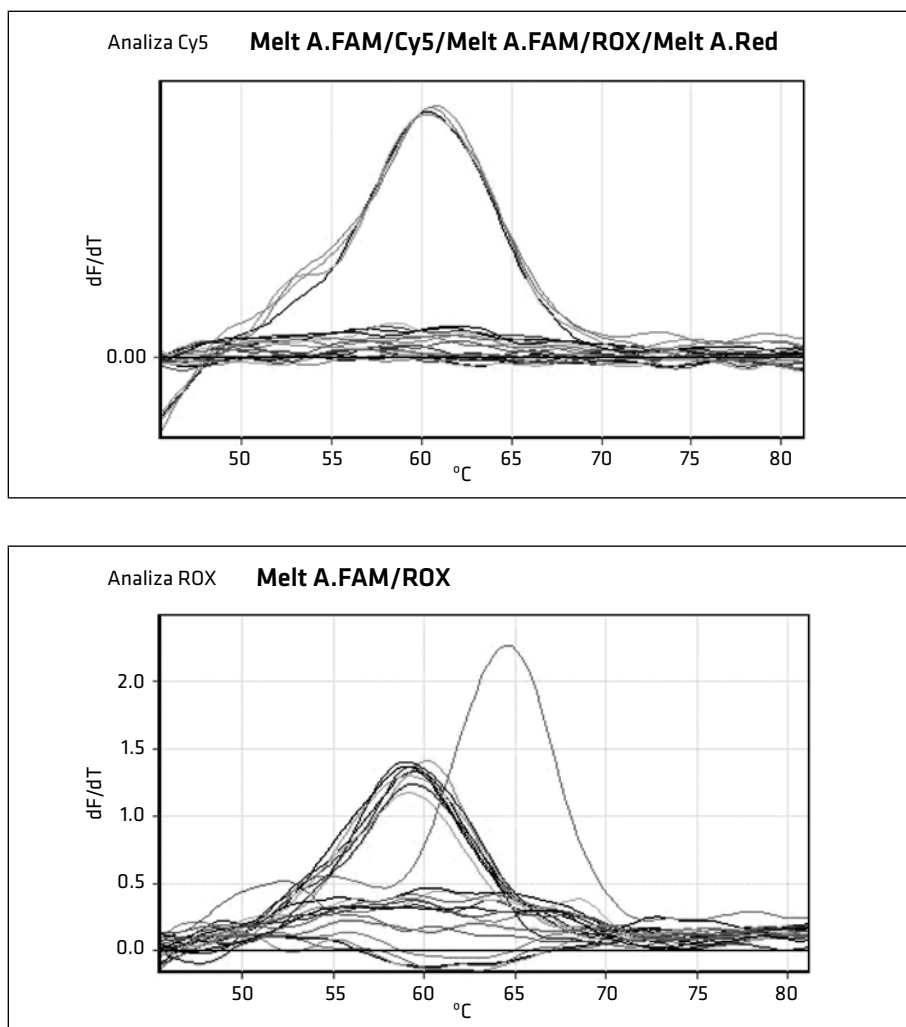
Flourokrom	Patogen	Vrednost T _m (°C)
Cy5	HSV-2	58 ± 2
	<i>N. gonorrhoeae</i>	63 ± 2
	<i>T. pallidum</i>	69 ± 2
ROX	HSV-1	53 ± 2
	<i>C. trachomatis</i>	60 ± 2
	<i>M. genitalium</i>	65 ± 2
	<i>T. vaginalis</i>	69 ± 2

Z multipleks metodo smo DNK *C. trachomatis* potrdili v vseh 30 pozitivnih vzorcih ter DNK *N. gonorrhoeae* v vseh 12 pozitiv-

nih vzorcih. Vrednosti temperature taljenja (T_m) so se za *C. trachomatis* gibale med 58 in 60 °C v območju valovne dolžine barvila ROX in med 61 in 63 °C v območju valovne dolžine barvila Cy5 za *N. gonorrhoeae*. V dveh pozitivnih vzorcih smo z metodo multipleks dokazali še prisotnost dodatnih patogenov. V vzorcu urina z dokazano DNK bakterije *C. trachomatis* smo dokazali še DNK HSV-2 ($T_m = 65$ °C, Cy5). V vzorcu urina, združenem z brisom nožnice z dokazano DNK bakterije *N. gonorr-*

hoeae, smo dodatno dokazali še DNK parazita *T. vaginalis* ($T_m = 68$ °C, ROX).

V 40 od 42 negativnih vzorcev tudi z multipleks metodo nismo dokazali DNK nobenega izmed sedmih patogenov. V dveh od 42 negativnih vzorcev pa smo dokazali DNK dveh patogenov, in sicer v vzorcu urina herpesvirus HSV-1 ($T_m = 52$ °C, ROX) ter v vzorcu brisa sečnice herpesvirus HSV-1 in bakterijo *M. genitalium* ($T_m = 54$ °C in $T_m = 65$ °C, ROX). Primer analize rezultatov je na sliki 1.



Slika 1. Primer analize rezultatov multipleks metode STD-Finder™ SMART 7.

DNK iz vzorcev, v katerih smo z multipleks metodo dokazali herpesviruse, smo uporabili še za specifični PCR v realnem času za dokazovanje HSV-1, HSV-2 in VZV (metodo opisujemo v prispevku *Okužbe anogenitalnega predela z virusom varičela zoster*). Potrdili smo le prisotnost HSV-2, ne pa tudi HSV-1 iz obeh primerov. DNK *T. vaginalis* in *M. genitalium* v vzorcih nismo potrdili, ker za te patogene v laboratoriju nimamo specifičnih molekularnih metod.

RAZPRAVA

Multipleks molekularne metode omogočajo sočasno dokazovanje več različnih patogenov v eni reakciji iz enega vzorca. Zato posledično skrajšajo čas, potreben za mikrobiološko diagnostiko, in znižajo stroške preiskav (7). Na tržišču so dostopne multipleks metode, ki jih izvajamo na delno oziroma popolnoma zaprtih avtomatiziranih sistemih. Te metode in sistemi imajo vse odlike, ki jih pripisujemo NAATs, in so zato uporabne tudi za mikrobiološko diagnostiko spolno prenosljivih okužb (14–17).

V našem laboratoriju smo se odločili preizkusiti multipleks metodo, ki omogoča sočasno dokazovanje sedem spolno prenosljivih patogenov, temelji na PCR v realnem času in ni vezana na drage avtomatizirane sisteme, temveč jo lahko izvajamo na aparatu za PCR.

S to metodo smo potrdili vse pozitivne in negativne rezultate za dve najpogostejši spolno prenosljivi bakteriji v Sloveniji, *C. trachomatis* in *N. gonorrhoeae*, ki jih v laboratoriju dokazujemo s PCR v realnem času. Ugotovili smo, da preizkušena multipleks metoda ne predstavlja predno-

sti pred specifičnim PCR v realnem času za dokazovanje teh dveh bakterij. Izvedba multipleks testa traja namreč približno šest ur in zahteva delo s PCR produkti v tehnično zapletenem protokolu za izvedbo in predvsem za analizo rezultatov.

S to metodo multipleks pa smo v 84 testiranih vzorcih dodatno dokazali DNK štirih spolno prenosljivih patogenov: herpesvirusov HSV-1 in HSV-2, bakterije *M. genitalium* in DNK parazita *T. vaginalis*. Herpesvirus HSV-2 je eden izmed najpogostejših virusnih povzročiteljev razjed na spolovilih in ga je potrebno zdraviti (19). Bakterijo *M. genitalium* sicer uvrščajo med porajajoče se spolno prenosljive patogene, vendar je vse več dokazov, da so ravno okužbe s to bakterijo najpogostejše vzrok negonoknega uretritisa (20). Čeprav so okužbe s parazitom *T. vaginalis* velikokrat asimptomatske, lahko parazit povzroča vaginitis, cervicitis in tudi uretritis. Ker lahko nezdravljene okužbe z obema spolno prenosljivima patogenoma vodijo do vnetja v mali medenici, izvenmaternične nosečnosti ter neplodnosti, ju je potrebno pravilno diagnosticirati (20, 21).

Iz navedenega sklepamo, da bi bila uvedba multipleks metode za sočasno dokazovanje različnih spolno prenosljivih patogenov smiselna tudi v našem laboratoriju. Vsekakor pa se strinjamo, da je pri izbiri multipleks metode poleg občutljivosti, specifičnosti ter drugih analitičnih parametrov metode potrebno smotro upoštevati še ostale dejavnike, kot so predvsem nabor spolno prenosljivih patogenov, način in čas izvedbe metode ter cena reagentov in aparatov oziroma sistemov za izvajanje multipleks metode.

LITERATURA

1. Starnbach MN, Roan NR. Conquering sexually transmitted diseases. *Nat. Rev.* 2008; 8: 313-7.
2. Hay P. HIV transmission and sexually transmitted infections. *Clin Med.* 2008; 8: 323-6.
3. Creasas G, Deligeorgiou E. Microbial ecology of the lower genital tract in women with sexually transmitted diseases. *J Med Microbiol.* 2012; 61: 1347-51.
4. Francis SC, Ao TT, Vanobberghen FM, Chilongani J, et al. Epidemiology of curable sexually transmitted infections among women at increased risk for HIV in northwestern Tanzania: inadequacy of syndromic management. *PLoS One.* 2014; 9: e101221.
5. Johannsen E, Lambert PF. Epigenetics of human papillomaviruses. *Virology.* 2013; 445: 205-12.
6. Skidmore S, Horner P, Mallinson H. Testing specimens for *Chlamydia trachomatis*. *Sex Transm Infect.* 2006; 82: 272-5.
7. Speers Dj. Clinical Applications of Molecular Biology for Infectious Diseases. *Clin Biochem Rev.* 2006; 27: 39-51.
8. Lanjouw E, Ossewaarde JM, Stary A, Boag F. European guideline for the management of *Chlamydia trachomatis* infections, Department of Dermatology, Erasmus MC, Rotterdam, The Netherlands.
9. Ostergaard L, Birkelund S, Christiansen G. Use of polymerase chain reaction for detection of *Chlamydia trachomatis*. *J Clin Microbiol.* 1990; 28: 1254-60.
10. Rumpianesi F, La Placa M, D'Antuono A, Negosanti M et al. Assessment of the „Amplicor“ PCR test in the diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infection. *New Microbiol.* 1993; 16: 293-5.
11. Mahony JB, Luinstra KE, Tyndall M, Sellors JW, et al. Multiplex PCR for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in Genitourinary specimens. *J Clin Microbiol.* 1995; 33: 3049-53.
12. Jungkind D, Dizenzo 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.
13. Whiley DM, Sloots TP. Comparison of three in-house multiplex PCR assays for the detection of *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* using real-time and conventional detection methodologies. *Pathology.* 2005; 37: 364-70.
14. Kim JK. J. Epidemiological Trends of Sexually Transmitted Infections Among Women in Cheonan, South Korea, 2006-2012. *Microbiol Biotechnol.* 2013; 23: 1484-90.
15. Mckechnie ML, Hillman R, Couldwell D, Kong F et al. Simultaneous Identification of 14 Genital Microorganisms in Urine by Use of a Multiplex PCR-Based Reverse Line Blot Assay. *J Clin Microbiol.* 2009; 47: 1871-7.
16. Marshall R, Chernesky M, Jang D, Hook EW et al. Characteristics of the m2000 Automated Sample Preparation and Multiplex Real-Time PCR System for Detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *J Clin Microbiol.* 2007; 45: 747-51.
17. Van Der Pol B, Taylor SN, LeBar W, Davis T, et al. Clinical Evaluation of the BD ProbeTec™ *Neisseria gonorrhoeae* Qx Amplified DNA Assay on the BD Viper™ System With XTR™ Technology. *Sex Trans Dis.* 2012; 39: 147-53.
18. Golle A. Uporabnost metode kvantitativnega PCR pri dokazovanju okužb z bakterijo *Chlamydia trachomatis* [magistrska naloga]. Ljubljana: Univerza v Ljubljani; 2013.
19. Gupta R, Warren T, Wald A. Genital herpes. *Lancet.* 2007; 370: 2127-37.
20. Manhart LE. *Mycoplasma genitalium*: An Emergent Sexually Transmitted Disease? *Infect Dis Clin N Am.* 2013; 27: 779-92.
21. Hobbs MM, Seña AC. Modern diagnosis of *Trichomonas vaginalis* infection. *Sex Transm Infect.* 2013; 89: 434-8.

Samo Jeverica¹, Urša Dolinar², Andrej Golle³, Andrej Rojnik⁴, Vinko Božanič⁵, Martina Kavčič⁶, Helena Ribič⁷, Iztok Štrumbelj⁸, Marko Potočnik⁹, Tomi Bremec¹⁰, Andreja Murnik Rauh¹¹, Boštjan Mlakar¹², Miha Lobnik¹³, Irena Klavs¹⁴, Tanja Kustec¹⁵, Mojca Matičič¹⁶

Odpornost gonokokov proti antibiotikom v Sloveniji, 2006–2013

Antimicrobial Resistance of Gonococci in Slovenia, 2006–2013

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: *Neisseria gonorrhoeae*, odpornost proti antibiotikom, nadzor

Neisseria gonorrhoeae oz. gonokok je spolno prenosljiva bakterija, ki povzroča gonorejo. V preteklosti so gonokoki razvili odpornost proti vsem zdravilom, ki smo jih uporabljali za zdravljenje okužbe, nedavno tudi proti cefalosporinom s širokim spektrom delovanja. Obstaja resna nevarnost, da bi gonoreja v določenih kliničnih razmerah postala neozdravljiva. Eden izmed načinov boja proti tej grožnji je povečan nadzor nad odpornostjo bakterije na lokalnem, regionalnem in nacionalnem nivoju. V prispevku predstavljamo organiziranost in rezultate nadzora odpornosti gonokoka v Sloveniji med letoma 2006 in 2013.

¹ Asist. dr. Samo Jeverica, dr. med., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana; samo.jeverica@mf.uni-lj.si

² Urša Dolinar, univ. dipl. mikrobiol., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

³ Asist. mag. Andrej Golle, dr. med., spec. klin. mikrobiol., Oddelek za medicinsko mikrobiologijo Maribor, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Prvomajska ulica 1, 2000 Maribor

⁴ Andrej Rojnik, dr. med. Oddelek za medicinsko mikrobiologijo Celje, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Gregorčičeva ulica 5, 3000 Celje

⁵ Mag. Vinko Božanič, dr. med., Oddelek za medicinsko mikrobiologijo Celje, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Gregorčičeva ulica 5, 3000 Celje

⁶ Martina Kavčič, dr. med., Oddelek za medicinsko mikrobiologijo Koper, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Verdijeva ulica 11, 6000 Koper

⁷ Asist. Helena Ribič, dr. med. Oddelek za medicinsko mikrobiologijo Kranj, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Gosposvetska ulica 12, 4000 Kranj

⁸ Mag. Iztok Štrumbelj, dr. med., Oddelek za medicinsko mikrobiologijo Murska Sobota, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Ulica Arhitekta Novaka 2b, 9000 Murska Sobota

⁹ Doc. dr. Marko Potočnik, dr. med., Dermatovenerološka klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana

¹⁰ Tomi Bremec, dr. med., Dermatovenerološka klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana

¹¹ Andreja Murnik Rauh, dr. med., Dermatovenerološka klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana

¹² Doc. dr. Boštjan Mlakar, dr. med., Kirurški center Zdrav Splet, Cesta v Mestni log 55, 1000 Ljubljana

¹³ Miha Lobnik, Društvo informacijski center Legebitra, Trubarjeva cesta 76a, 1000 Ljubljana

¹⁴ Izr. prof. dr. Irena Klavs, dr. med., Center za nalezljive bolezni, Nacionalni inštitut za javno zdravje, Trubarjeva cesta 2, 1000 Ljubljana

¹⁵ Tanja Kustec, univ. dipl. soc., Center za nalezljive bolezni, Nacionalni inštitut za javno zdravje, Trubarjeva cesta 2, 1000 Ljubljana

¹⁶ Izr. prof. dr. Mojca Matičič, dr. med., Klinika za infektivne bolezni in vročinska stanja, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Japljeva ulica 2, 1000 Ljubljana

ABSTRACT

KEY WORDS: *Neisseria gonorrhoeae*, antimicrobial resistance, surveillance

Neisseria gonorrhoeae (gonococcus) is a sexually transmitted bacterium causing gonorrhoea. In the previous decades, gonococcus has developed resistance to all antimicrobial agents used for treatment of infection, including most recently to extended-spectrum cephalosporins, the last remaining treatment option for empirical treatment of gonorrhoea. There is a fear, that once easily curable gonorrhoea might become difficult to treat. One of the main focuses for prevention of such scenario is to enhance surveillance of resistance of gonococcus, both locally and regionally. In the article, we present the organization and results of gonococcal surveillance in Slovenia from 2006 to 2013.

UVOD

Klasična spolno prenosljiva okužba gonoreja (kapavica) ostaja pomemben javnozdravstveni problem v nerazvitem in razvitem svetu. Leta 2008 je po oceni Svetovne zdravstvene organizacije (angl. *World Health Organization*, WHO) za gonorejo zbolelo 106 milijonov odraslih oseb (1). S tem je gonoreja postala v svetovnem merilu najpogostejša bakterijska spolno prenosljiva okužba. V Sloveniji je bila incidenca gonoreje na vrhuncu v sedemdesetih letih prejšnjega stoletja. Leta 1971 je bilo prijavljenih 2.628 novih primerov okužbe, medtem ko je bilo leta 2011 prijavljenih na novo okuženih samo 25 oseb (2, 3). V zadnjih dveh letih opazamo več kot dvakratni porast incidence gonoreje v Sloveniji (4).

Neisseria gonorrhoeae oz. gonokok, bakterijski povzročitelj gonoreje, se postopoma razvija v superbakterijo. V preteklosti so gonokoki razvili in ohranili odpornost proti vsem antibiotikom, s katerimi smo zdravili okužbo: sulfonamidom, penicilinu, tetraciklinom, kinolonom, makrolidom in nedavno proti cefalosporinom z razširjenim spektrom delovanja (v nadaljevanju cefalosporinom). Cefalosporini so do nedavnega predstavljali zadnje zdravilo izbora za izkustveno zdravljenje gonoreje v monoterapiji. Prav pojav odpornosti proti cefalosporinom, ki se je za-

čel s postopnim zviševanjem minimalnih inhibitornih koncentracij (MIK) in nadaljeval z osamitvijo treh sevov gonokoka z visoko stopnjo odpornosti proti cefalosporinom na Japonskem in v Evropi, je v zadnjih letih sprožil val bojzani, da bi gonoreja v določenih kliničnih razmerah lahko postala težko ozdravljiva okužba.

Na hitro evolucijo povečane odpornosti gonokokov proti cefalosporinom so se odzvale številne javnozdravstvene organizacije na globalni in regionalni ravni, ki so sprejele krizne načrte ukrepanja za zamejitev širjenja večkratno odpornih sevov gonokokov in zmanjšanje posledic okužb s tovrstnimi bakterijami. Eden izmed ključnih poudarkov tovrstnih kriznih načrtov je tudi izboljšanje nadzora nad odpornostjo gonokokov na lokalni, regionalni in nacionalni ravni. V pričujočem prispevku bomo opisali organizacijo spremljanja odpornosti gonokokov v Evropi in Sloveniji, ter prikazali dostopne fenotipske in genotipske podatke o odpornosti gonokokov v Sloveniji med letoma 2006 in 2013.

NADZOR ODPORNOSTI GONOKOKA V EVROPI IN SLOVENIJI

Skupni evropski nadzor nad gonokoknimi okužbami in odpornostjo gonokokov proti antibiotikom se je začel leta 2002

pod okriljem programa ESSTI (angl. *European Surveillance of Sexually Transmitted Infections*). Prvi podatki programa za leta 1998–2007 so pokazali, da je število prijavljenih gonokoknih okužb v evropskih državah zelo različno (5). Tako je bila na primer leta 2007 incidenca gonoreje v Združenem kraljestvu 30,8/100.000, v Italiji pa samo 0,3/100.000. Euro-GASP (angl. *European Gonococcal Antimicrobial Surveillance Programme*), mikrobiološki del programa ESSTI je izvedel prvo evropsko raziskavo odpornosti gonokokov v letu 2004 (5). V njej so ugotovili visoko stopnjo odpornosti gonokokov proti ciprofloksacinu (31 %), ki se je v tistem času v večini držav uporabljal kot zdravilo izbora za izkustveno zdravljenje gonoreje, tetraciklinu (60 %) in penicilinu (21 %). V raziskavi so prvič v Evropi ugotovili > 5 % odpornost proti azitromicinu (8 %), kar je pomenilo, da je azitromicin presegel stopnjo odpornosti, pri kateri antibiotik na splošno odsvetujemo za izkustveno zdravljenje bolezni (6). Zanimivo je, da so že takrat osamili tudi prve izolate gonokokov z nizko stopnjo odpornosti proti cefalosporinom (0,3 %).

V okviru programa Euro-GASP od leta 2006 redno izvajajo nadzor odpornosti gonokokov, v katerega je bilo leta 2011 vključenih 21 držav iz Evropske unije in Evropskega gospodarskega prostora. Slovenija se je programu priključila leta 2006. Sprva smo sodelovali samo z izolati gonokokov, ki smo jih osamili na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo (IMI) Medicinske fakultete v Ljubljani, od leta 2012 pa v programu sodelujemo vsi slovenski mikrobiološki laboratoriji.

Metodološko je program Euro-GASP organiziran tako, da v okviru dveh letnih obdobj (maj/junij in november/december) pridružene članice zberejo 110 zaporednih izolatov gonokokov, ki jim določijo občutljivost za standardni in aktualni nabor antibiotikov. Države, v katerih je

število izolatov manjše od predvidenega, sodelujejo v programu z vsemi pridobljenimi izolati tekočega leta. Mednje spada tudi Slovenija.

Poleg natančne mikrobiološke opredelitve izolatov je eden izmed ključnih poudarkov programa povezava mikrobioloških podatkov posameznih izolatov o občutljivosti za antibiotike z omejenim naborom epidemioloških podatkov bolnikov: mestom okužbe, načinom prenosa okužbe, sočasnimi spolno prenesenimi okužbami in drugimi. S stališča mikrobiologov je prav del pridobivanja epidemioloških podatkov najbolj zahteven, saj nam tovrstni podatki niso rutinsko dosegljivi, trenutni način obvezne prijave gonoreje pa ne omogoča povezovanja obeh vrst podatkov z enotnim ključem.

Sodelovanje slovenskih laboratorijev poteka po ocenah prvega avtorja zgleddo. Sodelujoči laboratoriji pošiljajo vse pridobljene izolate gonokokov na dodatno testiranje občutljivosti na IMI, ki jim v zameno za sodelovanje in pomoč pri pridobivanju epidemioloških podatkov nudi pridobljene rezultate odpornosti in letno poročilo o kumulativni odpornosti testiranih gonokokov. V sistemu velja izpostaviti tudi lečeče zdravnike, ki pred začetkom zdravljenja odvzamejo kužnine za osamitev gonokokov in zagotovijo epidemiološke podatke. Vnos slovenskega dela podatkov v Evropski sistem nadzora (angl. *The European Surveillance System, TESSy*), centralno podatkovno platformo Evropskega centra za nadzor bolezni (angl. *European Centre for Disease Prevention and Control, ECDC*), opravijo kolegi epidemiologi. Slovenski del programa Euro-GASP trenutno poteka brez zagotovljenih finančnih sredstev. Vsekakor bi bilo v prihodnosti vredno razmisliti o enotni platformi sodelovanja slovenskih laboratorijev v tovrstnih nadzornih raziskavah in predvsem zagotoviti finančno vzdržnost tovrstnih programov.

FENOTIPSE LASTNOSTI GONOKOKOV V SLOVENIJI (2006–2013)

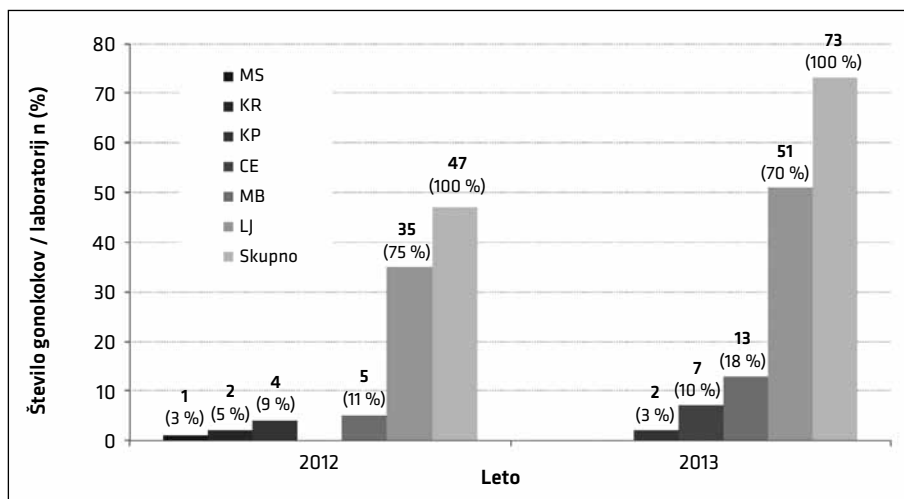
V Sloveniji je bilo med letoma 2006 in 2013 prijavljenih 323 novih primerov gonoreje, 92 % (n = 297) pri moških in 8 % (n = 25) pri ženskah (4). Med moškimi bolniki je bilo 38 % (n = 113) moških, ki imajo spolne odnose z moškimi (MSM). Ocenjujemo, da število prijavljenih primerov močno podcenjuje dejansko stanje okužbe. Po nekaterih ocenah je bolnikov, ki se zdravijo v zdravstvenem sistemu, manj kot 5 % (6). Prav tako pa lahko rečemo, da je med prijavljenimi primeri nesorazmerno veliko MSM (4).

Na IMI Medicinske fakultete v Ljubljani smo imeli v istem časovnem obdobju na voljo 267 nepodvojenih izolatov gonokokov, kar predstavlja 83 % vseh prijavljenih gonokoknih okužb v Sloveniji. Večino izolatov, 87 % (n = 233), smo osamili na IMI v Ljubljani, 7 % (n = 18) izolatov je bilo iz Nacionalnega laboratorija za zdravje, okolje in hrano (NLZOH) Maribor, 3 % (n = 7) izolatov je bilo iz NLZOH

Celje, 2 % (n = 6) izolatov je bilo iz NLZOH Koper, 1 % (n = 2) iz NLZOH Kranj in < 1 % (n = 1) iz NLZOH Murska Sobota. Število in delež gonokokov, osamljenih v posameznih laboratorijih v letih 2012 in 2013, odkar sodelujemo v programu Euro-GASP vsi slovenski mikrobiološki laboratoriji, sta prikazana na sliki 1.

Glede anatomskega mesta osamitve je bilo 78 % (n = 208) izolatov iz predela urogenitalnega trakta, 11 % (n = 30) iz žrela, 10 % (n = 26) iz danke, < 1 % (n = 1) izolat iz sklepa, za dva izolata pa nismo imeli podatkov o anatomskem mestu osamitve. Med vsemi izolati je bilo 48 % (n = 127) dokazane gonoreje posledica heteroseksualnega prenosa, 42 % (n = 113) posledica prenosa med MSM, za 10 % (n = 27) izolatov pa je bil način prenosa neznan.

Vsem izolatom smo določili odpornost proti osmim antibiotikom (cefiksimu, ceftriaksonu, penicilinu, ciprofloksacinu, azitromicinu, tetraciklinu, gentamicinu in spektinomycinu) z gradient difuzijsko metodo z Etesti ter jim določili prisotnost betalaktamaze z nitrocefinskim testom.



Slika 1. Število in delež gonokokov, osamljenih v posameznih laboratorijih v letih 2012 in 2013. MS – Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano (NLZOH) Murska Sobota, KR – NLZOH Kranj, KP – NLZOH Koper, CE – NLZOH Celje, MB – NLZOH Maribor, LJ – Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani.

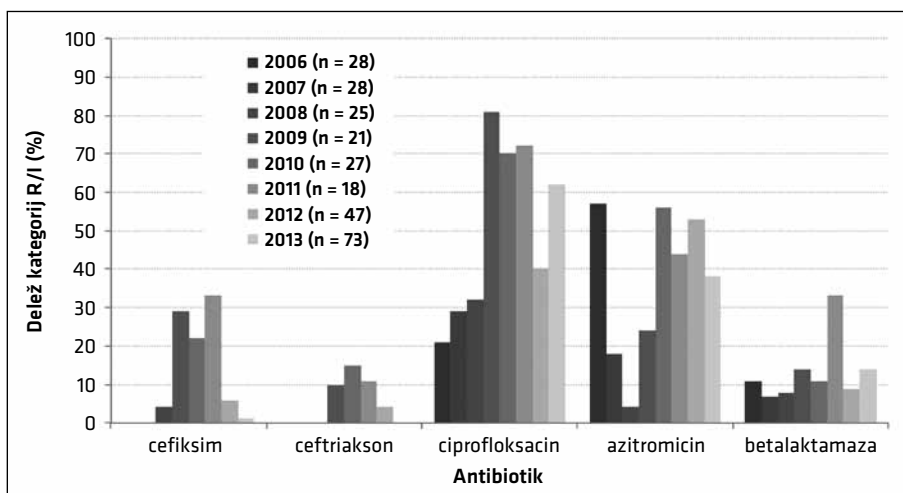
Skupni delež odpornosti (R) in / ali zmanjšane občutljivosti (I) gonokokov v obdobju 2006–2013 je znašal za cefiksim 9 % (n = 23), ceftriakson 4 % (n = 10), penicilin 96 % (n = 257), ciprofloksacin 51 % (n = 135), azitromicin 39 % (n = 103), tetraciklin 70 % (n = 188) in spektinomycin 0 % (n = 0). Betalaktamaza je bila prisotna pri 12 % (n = 33) izolatov. Vrednosti MIK gentamicina so bile nizke, vendar njihova interpretacija zaradi neobstoječih kriterijev ni bila možna.

Longitudinalni trendi odpornosti proti penicilinu, cefiksimu, ceftriaksonu, ciprofloksacinu, azitromicinu in prisotnost betalaktamaze med letoma 2006 in 2013 so prikazani na sliki 2. Odpornost in/ali zmanjšana občutljivost za cefiksim (definirana kot MIK $\geq 0,125$ mg/L) je bila v Sloveniji prvič ugotovljena leta 2008, 4 % (en izolat), in je naraščala do leta 2011, ko je znašala 33 % (n = 6). V letih 2012 in 2013 je sledil padec odpornosti in/ali zmanjšane občutljivosti proti cefiksimu na 6 % (n = 3) in 2 % (n = 1). Podoben porast in upad odpornosti in/ali zmanjšane občutljivosti smo opazili tudi za ceftri-

akson in ciprofloksacin. Pri obeh je bilo najvišje deleže odpornosti in/ali zmanjšane občutljivosti zaslediti v letih 2009–2011. Odpornost in/ali zmanjšana občutljivost proti azitromicinu (definirana kot MIK $\geq 0,5$ mg/L) je prav tako nihala in sicer je bilo med letoma 2007 in 2009 opaziti njen padec na 4 % (n = 1). V nadaljevanju opazovanega obdobja pa opažamo strmo povečanje deleža odpornosti in/ali zmanjšane občutljivosti za azitromicin do 53 % (n = 25) v letu 2012.

GENOTIPSKE LASTNOSTI GONOKOKOV V SLOVENIJI (2006–2012)

Da bi ugotovili vzrok epidemije povečane odpornosti gonokokov proti cefalosporinom in ciprofloksacinu, ki smo jo ugotovili s fenotipskimi metodami, smo seve tipizirali z metodo NG-MAST (angl. *Neisseria gonorrhoeae* Multi-Antigen Sequence Typing). S to metodo pomnožimo in določimo nukleotidno zaporedje polimorfni odsekov dveh genov gonokoka, *porB* in *tbpB*, ki nosita zapis za dve beljakovini zunanje membrane bakterije. NG-MAST



Slika 2. Longitudinalni trendi odpornosti gonokoka v Sloveniji med leti 2006–2013. R – odporen, I – zmanjšana (intermediarna) občutljivost. Uporabljeni interpretacijski kriteriji: cefiksim in ceftriakson R/I (MIK $\geq 0,125$ mg/L), ciprofloksacin R/I (MIK $\geq 0,064$ mg/L), azitromicin (MIK $\geq 0,5$ mg/L).

metoda tipizacije ima visoko ločljivost, je objektivna in ponovljiva. S pomočjo mednarodne zbirke alelov obeh genov in sekvenčnih tipov *N. gonorrhoeae* lahko vsakemu izolatu določimo sekvenčni tip. Izolate, ki imajo identičen en alel in se v drugem alelu razlikujejo < 1 % lahko dodatno združimo v genske skupine (7).

Najpogostejši NG-MAST sekvenčni tipi gonokokov v letih 2006–2012, ki so bili zastopani z najmanj petimi izolati, so bili: ST1407 – 9 % (n = 18), ST21 – 6 % (n = 12), ST225 – 6 % (n = 12), ST4 – 5 % (n = 9), ST2675 – 4 % (n = 7), ST5615 – 4 % (n = 7), ST8464 – 3 % (n = 6), ST1195 – 3 % (n = 5), ST2992 – 3 % (n = 5), ST5340 – 3 % (n = 5) in ST5570 – 3 % (n = 5). Z dodatnim združevanjem zelo sorodnih sekvenčnih tipov smo opredelili sedem najpogostejših genskih skupin: G1407, G225, G21, G1195, G4, G2675 in G2992, ki so skupno predstavljale 50 % (n = 97) vseh izolatov.

Večkratno odporna (cefalosporini, ciprofloksacin, azitromicin) genska skupina G1407 (*tbpB* alel 110) je bila v Sloveniji prvič osamljena leta 2008 (en izolat) in je postala prevladujoča genska skupina v naslednjih treh letih z deleži 48 % (n = 10/21), 30 % (n = 8/27) in 28 % (n = 5/18) v letih 2009, 2010 in 2011. V letu 2012 so gensko skupino G1407 nadomestili za cefalosporine in ciprofloksacin večinoma dobro občutljivi izolati genskih skupin G21 (*tbpB* alel 33), G2997 (*tbpB* alel 21), G1195 (*tbpB* alel 29), G2992 (*tbpB* alel 29) in G5240 (*tbpB* alel 29), ki so skupno predstavljali 53 % (n = 25/47) vseh izolatov tega leta. Genska skupina G1407 je v letu 2012 predstavljala 9 % (n = 4/47) izolatov. Iz fenotipskih podatkov o odpornosti za leto 2013 lahko sklepamo, da je v tem letu genska skupina G1407 dodatno izgubila svoj delež med vsemi izolati. Podoben upad deleža genske skupine G1407 so opazili tudi v nekaterih drugih evropskih državah (8). Natančnega razloga za upad deleža genske skupine G1407 v Sloveni-

ji v letu 2012 in domnevno v letu 2013 ne poznamo. Najverjetneje igra pomembno vlogo pri tem hitra prilagoditev smernic zdravljenja gonoreje, ki prvič v zgodovini v izkustveno zdravljenje uvaja dvotirno antibiotično terapijo.

Fenotipske in genotipske značilnosti izolatov znotraj posamezne genske skupine so bile med slovenskimi izolati gonokokov zelo homogene (9). Med 28 izolatov gonokokov genske skupine G1407, ki smo jih osamili med letoma 2008 in 2012 so bile modalne vrednosti in razpon MIK penicilina, cefiksima, ceftriaksona, ciprofloksacina in azitromicina 2 mg/L (1–4 mg/L), 0,125 mg/L (0,032–0,25 mg/L), 0,064 mg/L (0,032–0,125 mg/L), > 32 mg/L (od 32 do več kot 32 mg/L) in 0,5 mg/L (0,125–8 mg/L). Noben izolat ni imel prisotne betalaktamaze. Odpornost in/ali zmanjšana občutljivost proti cefalosporinom je bila pri izolatih genske skupine G1407 posledica sočasne prisotnosti treh determinant odpornosti za cefalosporine – mozaičnega alela XXXIV gena *penA*, ki kodira spremenjen protein, ki veže penicilin tipa 2 (angl. *penicilin-binding protein 2*, PBP2), *mtrR*, mutacije v promotorju represorja efluksne črpalke *MtrCDE*, in *penB*, mutacije v genu za porin *PorB1b*.

Stabilnost fenotipa in genotipa znotraj genske skupine je pomembna, saj bi lahko to dejstvo s pridom izkoriščali za predvidevanje občutljivosti bakterije v okviru danes prevladujoče molekularne mikrobiološke diagnostike. Vendar tovrstne diagnostične aplikacije še niso na voljo.

SMERNICE ZDRAVLJENJA

Globalna epidemija gonokokov genske skupine G1407 in z njo povezana odpornost proti cefalosporinom se v klinični praksi zrcali v številnih primerih neuspešnega zdravljenja gonoreje s cefalosporini na globalni ravni v prvi vrsti s cefiksikom (oralnim cefalosporinom), pa tudi s ceftriaksomom (parenteralni cefalosporin

(10–18). Genska skupina G1407 je povzročila tudi enega izmed redkih dokazanih primerov neuspešnega zdravljenja faringevalne gonoreje s ceftriaksonom v Sloveniji (14).

Zaradi jasnih dokazov o neuspešnosti monoterapije s cefalosporini je bilo potrebno prilagoditi smernice za izkustveno zdravljenje gonoreje in prvič v zgodovini priporočiti dvotirno terapijo. Tako na primer najnovejše evropske smernice za zdravljenje gonoreje iz leta 2012 za izkustveno zdravljenje nezapletene urogenitalne gonoreje priporočajo kombinacijo ceftriaksona 500 mg intramuskularno in azitromicina 2 g oralno v enkratnem odmerku (19). Istega leta so spremenili tudi ameriške smernice za zdravljenje gonoreje, ki sedaj priporočajo kombinacijo ceftriaksona 250 mg intramuskularno in bodisi azitromicina 1 g oralno v enkratnem odmerku ali doksiciklina 2 x 100 mg oralno 7 dni (20). Predlog novih slovenskih nacionalnih smernic za diagnostiko in zdrav-

ljenje gonoreje je bil predstavljen širši strokovni javnosti julija 2014 in do določene mere povzema evropske smernice z upoštevanjem nekaterih novih dognanj molekularne epidemiologije gonokoka v Sloveniji.

ZAKLJUČEK

Gonokok je v zgodovini razvil odpornost proti vsem antibiotikom, s katerimi smo zdravili gonorejo in je nedavno postal odporen tudi proti cefalosporinom, zadnjim zdravilom izbora za zdravljenje gonoreje v monoterapiji. V Sloveniji so epidemijo povečane odpornosti gonokokov proti cefalosporinom povzročili gonokoki genske skupine G1407, globalno prisotnega večkratno odpornega klona gonokokov. S spremenjenimi smernicami zdravljenja in uvedbo dvotirnega izkustvenega zdravljenja smo morebiti zaustavili njegovo širjenje v Evropi. Ali smo s tem ukrepom trajneje zaustavili nevarnost, da bi gonoreja postala neozdravljiva bolezen, bo pokazal čas.

LITERATURA

1. World Health Organization (WHO). Global incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted infections - 2008. Geneva; 2012.
2. Potočnik M. Gibanje klasičnih spolno prenosljivih boleznih v Sloveniji od 1951 do 1994 in njihovi socialnomedicinski vidiki [Magistrska naloga]. Ljubljana: Univerza v Ljubljani; 1995.
3. Klavs I, Kustec T, Kastelic Z. Spolno prenesene okužbe v Sloveniji, letno poročilo 2011. Ljubljana: Inštitut za varovanje zdravja; 2012.
4. Klavs I, Kustec T. Spolno prenesene okužbe v Sloveniji, letno poročilo 2013. Ljubljana: Nacionalni inštitut za javno zdravje; 2014.
5. Martin IMC, Hoffmann S, Ison CA. European Surveillance of Sexually Transmitted Infections (ESSTI): the first combined antimicrobial susceptibility data for *Neisseria gonorrhoeae* in Western Europe. J Antimicrob Chemother. 2006; 58 (3): 587–93.
6. Tapsall J. Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. Geneva: World Health Organization; 2001.
7. Chisholm S, Unemo M, Quaye N, et al. Molecular epidemiological typing within the European Gonococcal Antimicrobial Resistance Surveillance Programme reveals predominance of a multidrug-resistant clone. Euro Surveill. 2013; 18 (3): 1–10.
8. Ison CA, Town K, Obi C, et al. Decreased susceptibility to cephalosporins among gonococci: data from the Gonococcal Resistance to Antimicrobials Surveillance Programme (GRASP) in England and Wales, 2007–2011. Lancet Infect Dis. 2013; 13 (9): 762–8.
9. Jeverica S, Golparian D, Matičič M, et al. Phenotypic and molecular characterization of *Neisseria gonorrhoeae* isolates from Slovenia, 2006–12: rise and fall of the multidrug-resistant NG-MAST genogroup 1407 clone? J Antimicrob Chemother. 2014; 69 (6): 1517–25.

10. Golparian D, Ohlsson A, Janson H, et al. Four treatment failures of pharyngeal gonorrhoea with ceftriaxone (500 mg) or cefotaxime (500 mg), Sweden, 2013 and 2014. *Euro Surveill.* 2014; 19 (30): 1–4.
11. Lewis DA, Sriruttan C, Müller EE, et al. Phenotypic and genetic characterization of the first two cases of extended-spectrum-cephalosporin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* infection in South Africa and association with cefixime treatment failure. *J Antimicrob Chemother.* 2013; 68 (6): 1267–70.
12. Camara J, Serra J, Ayats J, et al. Molecular characterization of two high-level ceftriaxone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* isolates detected in Catalonia, Spain. *J Antimicrob Chemother.* 2012; 67 (8): 1858–60.
13. Unemo M, Golparian D, Nicholas R, et al. High-level cefixime- and ceftriaxone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* in France: novel *penA* mosaic allele in a successful international clone causes treatment failure. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012; 56 (3): 1273–80.
14. Unemo M, Golparian D, Potočnik M, et al. Treatment failure of pharyngeal gonorrhoea with internationally recommended first-line ceftriaxone verified in Slovenia, September 2011. *Euro Surveill.* 2012; 17 (25): 1–4.
15. Unemo M, Golparian D, Sary A, et al. First *Neisseria gonorrhoeae* strain with resistance to cefixime causing gonorrhoea treatment failure in Austria, 2011. *Euro Surveill.* 2010; 16 (43): 1–3.
16. Ison CA, Hussey J, Sankar KN, et al. Gonorrhoea treatment failures to cefixime and azithromycin in England, 2010. *Euro Surveill.* 2011; 16 (14): 1–4.
17. Unemo M, Golparian D, Syversen G, et al. Two cases of verified clinical failures using internationally recommended first-line cefixime for gonorrhoea treatment, Norway, 2010. *Euro Surveill.* 2010; 15 (47): 1–3.
18. Allen VG, Mitterni L, Seah C, et al. *Neisseria gonorrhoeae* treatment failure and susceptibility to cefixime in Toronto, Canada. *JAMA.* 2013; 309 (2): 163–70.
19. Bignell C, Unemo M. 2012 European guideline on the diagnosis and treatment of gonorrhoea in adults. *Int J STD AIDS.* 2013; 24 (2): 85–92.
20. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Update to CDC's Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2010: oral cephalosporins no longer a recommended treatment for gonococcal infections. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2012; 60 (31): 590–4.

Irena Grmek Košnik¹, Urška Dermota², Helena Ribič³, Martina Kavčič⁴, Ljudmila Sarjanovič⁵, Andrej Golle⁶

Klinični pomen bakterije *Gardnerella vaginalis*, izolirane iz genitalnih vzorcev

The Clinical Significance of Bacteria Gardnerella vaginalis Isolated from the Genital Specimens

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: *Gardnerella vaginalis*, biofilm, bakterijska vaginoza

Bakterijska vaginoza je za klinike zanimiva predvsem zaradi možne vzročne povezave z zapleti v nosečnosti, po porodu ter z zapleti po operativnih posegih. Novejše študije kažejo, da je bakterijska vaginoza polimikrobna okužba z nastankom biofilma. *Gardnerella vaginalis* je prva bakterijska vrsta, ki se pritrdi na vaginalni epitelij in ustvari osnovo, na katero se pritrjujejo druge bakterijske vrste. Vsi sevi bakterije *G. vaginalis* ne tvorijo biofilmov. Bakterija je na celicah nožnice lahko prisotna v planktonski obliki ali tvori biofilm. Za leto 2013 smo retrogradno analizirali rezultate štirih mikrobioloških medicinskih laboratorijev. V genitalnih vzorcih so nas zanimali deleži osamljene bakterije *G. vaginalis*. V štirih mikrobioloških laboratorjih smo ugotovili prisotnost bakterije *G. vaginalis* v 7,93 % oz. od 7,09 % do 14,66 %. Dobljeni podatki so primerljivi z rezultati drugih študij, ki so uporabljali klinične kriterije. Za postavitev diagnoze bakterijske vaginoze se ponekod v praksi uporabljajo standardni klinični kriteriji ter laboratorijska metoda barvanja razmaza nožničnega izcedka po Gramu. Interpretacija razmazov po Nugatovem točkovnem sistemu kot barvanje po Gramu zahteva izkušeno laboratorijsko osebo. Rezultati študij potrjujejo, da tudi osamitev *G. vaginalis* in anaerobov pomaga potrditi diagnozo bakterijske vaginoze oz. omogoča ločevati od drugih možnih patologij.

ABSTRACT

KEY WORDS: *Gardnerella vaginalis*, biofilm, bacterial vaginosis

Bacterial vaginosis is of a clinical interest because of the possible causal relationship with complications during pregnancy, after childbirth and complications after surge-

¹ Prim. doc. dr. Irena Grmek Košnik, dr. med., Oddelek za nalezljive bolezni, Zavod za zdravstveno varstvo Kranj, Gosposvetska ulica 12, 4000 Kranj; irena.grmek-kosnik@zvv-kr.si

² Urška Dermota, univ. dipl. mikr., Zavod za zdravstveno varstvo Kranj, Gosposvetska ulica 12, 4000 Kranj

³ Asist. Helena Ribič, dr. med., Oddelek za medicinsko mikrobiologijo, Zavod za zdravstveno varstvo Kranj, Gosposvetska ulica 12, 4000 Kranj

⁴ Martina Kavčič, dr. med., Oddelek za medicinsko mikrobiologijo, Zavod za zdravstveno varstvo Koper, Vojkovo nabrežje 4a, 6000 Koper

⁵ Ljudmila Sarjanovič, dr. med., Oddelek za medicinsko mikrobiologijo, Zavod za zdravstveno varstvo Nova Gorica, Vipavska cesta 13, 5000 Nova Gorica

⁶ Asist. mag. Andrej Golle, dr. med., spec. klin. mikrobiol., Oddelek za medicinsko mikrobiologijo Maribor, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Prvomajska ulica 1, 2000 Maribor

ry. Recent studies suggest that bacterial vaginosis is a polymicrobial infection with the formation of biofilm. The bacterium may be present in the planktonic form or it forms a biofilm. *Gardnerella vaginalis* is the first bacterial species which is attached to the vaginal epithelium and creates a fundament on which other bacterial species attach. We retrospectively analyzed the results of four microbiological medical laboratories for the year 2013. We were interested in the proportion of the isolated bacteria *G. vaginalis* from the genital samples. We found *G. vaginalis* in 7.93% of specimens. The data are comparable with the results of other studies. For the diagnosis of bacterial vaginosis in clinical practice, standard clinical criteria and the Gram staining of vaginal discharge smear are used. The interpretation of smears according to Nugat scoring system and Gram staining require experienced laboratory personnel. The results of studies confirm that the isolation of *G. vaginalis* and anaerobes helps confirming the diagnosis of bacterial vaginosis and allows us to distinguish it from other pathologies.

UVOD

Bakterijska vaginoza je najpogostejši vzrok izcedka iz nožnice in predstavlja pomemben javnozdravstveni problem, saj je v povezavi s prezgodnjimi porodi, poporodno sepso, endometritisom, prenosom virusa človeške imunske pomanjkljivosti (angl. *human immunodeficiency virus*, HIV) in drugimi spolno prenosljivimi okužbami (1, 2). Številni raziskovalci so namreč našli statistično pomembne povezave med bakterijsko vaginozo in okužbo z virusom herpesa simpleksa kot tudi okužbo s človeškim papiloma virusom (3, 4).

Bakterijska vaginoza se sproži s spolnim prenosom bakterije *Gardnerella vaginalis*, ki ima virulenčne dejavnike, ki omogočajo pritrditev na epitelijske celice gostitelja in tvori biofilm (1).

Bakterijo *G. vaginalis* je prvi opisal Leopold leta 1953 in jo poimenoval *Haemophilus vaginalis*. Ime se je kasneje spremenilo v *Corynebacterium vaginale* in leta 1980 v *G. vaginalis* (5). Bakterija je po Gramu negativen bacil, ki raste počasi na običajnih gojiščih in ga je težko ločiti od drugih bakterij, ki živijo v vagini. Na ovčjem agarju raste v obliki drobcenih kolonij anaerobno ali v 5 % CO₂. Ustrezno gojišče za rast bakterije je agar Kolumbija s človeško krvjo, na katerem tvori beta hemolizo.

Preprost in izvedljiv test v identifikaciji te bakterije je aaminski test, kjer se po dodatku kalijevega hidroksida na vaginalni izloček pojavi smrad po ribah. Etiologija nespecifičnega vaginitisa s to bakterijo pa je postala dvomljiva. Bakterijo so namreč neredko osamili tudi pri ženskah brez znakov vnetja, simptomatika se je po zdravljenju z metronidazolom pogosto ponovila, pozitiven aaminski test pa je rezultat povečanega števila anaerobnih bakterij (6). Izraženi klinični simptomi (sivobel izcedek iz nožnice, ki ima pH večji od pet, pozitiven aaminski test, Clue celice, izolacija *G. vaginalis* in anaerobov) vsekakor pomagajo pri postavitvi prave diagnoze (6).

V nasprotju s tradicionalnim pojmovanjem, da nalezljiva bolezen nastane preko kolonizacije in z invadiranjem posamezne bakterijske vrste, je pri bakterijski vaginozi drugače. Molekularne tehnike so dokazale, da so v patogenezo bakterijske vaginoze vpletene številne bakterijske vrste. *G. vaginalis* je prva bakterijska vrsta, ki se pritrdi na vaginalni epitelij in ustvari osnovo, na katero se pritrjujejo druge bakterijske vrste. Vaginalne biopsije zdravih žensk so pokazale predvsem mlečnokislinske bakterije, vključno z *Lactobacillus* spp., *Streptococcus* spp. in *Enterococcus* spp. Biofilm, najden pri ženskah z bakterijsko vaginozo,

je povečini sestavljen iz *G. vaginalis*, medtem ko je *Atopobium vaginae* prisoten pri 80 % primerov in tvori do 40 % biofilma. Druge bakterijske vrste, kot so *Bacteroides* spp., *Corynebacterium* spp., *Lactobacillus* spp., *Veillonella* spp., *Ruminococcus* spp. in *Streptococcus* spp., najdemo redkeje (7).

Pri postavitvi diagnoze bakterijske vaginoze ima največji pomen direktni razmaz po Gramu z upoštevanjem Nugentovega točkovalnega sistema (8).

PREISKOVANCI IN METODE

V Laboratoriju Zavoda za zdravstveno varstvo Kranj smo v letu 2013 v mikrobiološko preiskavo prejeli vaginalne vzorce, povečini od žensk z izraženimi in opisanimi kliničnimi znaki. Vzorce smo prejeli iz ginekoloških dispanzerjev vseh zdravstvenih domov na Gorenjskem kot tudi iz Splošne bolnišnice Jesenice in Bolnišnice za ginekologijo in porodništvo Kranj. Od kolegov mikrobiologov iz Maribora, Kopra in Nove Gorice smo pridobili podatke o številu prejetih genitalnih vzorcev na patogene bakterije in številu izolatov *G. vaginalis* v letu 2013.

V dveh laboratorijih (Maribor, Kranj) smo za osamitev bakterije *G. vaginalis* uporabili človeški krvni agar. V Novi Gorici in Kopru so uporabili čokoladni agar. V vseh laboratorijih je potekala inkubacija v CO₂ atmosferi. Za identifikacijo smo v dveh laboratorijih uporabljali masno spektrome-

trijo (angl. *Matrix-assisted laser desorption/ionization*, MALDI TOF) (Brucker), v Kranju od julija 2013 dalje, pred tem API® Strip (Bio Mérieux), v Kopru so uporabljali VITEK® Compact in VITEK® GP kartice (Bio Mérieux), v Novi Gorici pa so uporabljali klasične metode, kot je barvanje po Gramu in hidroliza hipurata.

REZULTATI

Število prejetih genitalnih vzorcev na patogene bakterije in delež izolatov *G. vaginalis* v letu 2013 v posameznih Laboratorijih za medicinsko mikrobiologijo v Sloveniji podajamo v tabeli 1.

RAZPRAVA

Bakterijska vaginoza je stanje v nožnici, ko normalno prisotne *Lactobacillus* spp. zamenjajo močno pomnožene anaerobne bakterije. V naši retrogradni preiskavi za leto 2013 smo v štirih mikrobioloških laboratorijih ugotovili prisotnost bakterije *G. vaginalis* v povprečju v 7,93 % oz. v razponu od 7,09 % do 14,66 %. Pri tem je potrebno upoštevati, da se ginekologi pri preiskovankah odločijo za mikrobiološko preiskavo vaginalnega trakta le v primeru izraženih kliničnih težav. V primerjavi z drugo slovensko študijo, kjer so bakterijsko vaginozo določali klinično in mikroskopsko pri ženskah na treh oddelkih Ginekološke klinike v Ljubljani, so naši podatki dokaj primerljivi. Pri 75 nosečni-

Tabela 1. Število prejetih genitalnih vzorcev na patogene bakterije in delež izolatov *Gardnerella vaginalis* v letu 2013 v posameznih Laboratorijih za medicinsko mikrobiologijo v Sloveniji

Laboratorij	Št. preiskav genitalnih vzorcev na patogene bakterije	Število izolatov <i>Gardnerella vaginalis</i>	Deleži <i>G. vaginalis</i>
Maribor	2.709	192	7,09 %
Kranj	526	38	7,22 %
Koper	348	51	14,66 %
Nova Gorica	123	13	10,57 %
Skupaj	3.706	294	7,93 %

cah v Ambulanti za patološko nosečnost je bila pogostnost bakterijske vaginoze 5,5 %, pri 100 preiskovankah iz Dnevne klinike pred umetno prekinitvijo nosečnosti 14,0 % in pri 13 preiskovankah v Ambulanti za spolno prenosljive bolezni 23,0 %. Obstaja povezava med bakterijsko vaginozo in spolnim vedenjem. V študiji zaradi majhnega števila preiskovank niso mogli potrditi povezave med bakterijsko vaginozo in prezgodnjim porodom (9).

Etiologija nespecifičnega vaginitisa ali bakterijske vaginoze je nasprotujoča. Povzročitelji okužbe so mikroorganizmi, kot so *G. vaginalis*, *Mobiluncus* spp., *Mycoplasma hominis* in po Gramu negativni anaerobni bacili, najverjetneje preko sočasne okužbe ali razrasti teh bakterij. Diagnoza bakterijske vaginoze ne temelji na bakterijski kulturi, ker je rast teh bakterij počasna in težavna, identifikacija pa draga. Bakterijsko vaginozo zadovoljivo potrdimo z razmazom, barvanim po Gramu oz. s prisotnostjo Clue celic ali prisotnostjo po Gramu variabilnih ali zavitih majhnih bacilov ter z odsotnostjo *Lactobacillus* spp. (10). Bakterijska vaginoza je pogostejša v populaciji homoseksualnih žensk (11).

G. vaginalis je fakultativna anaerobna bakterija z negativnim testom oksidaze in katalaze. Je nesporogena, nekapsulirana, negibljiva, pleomorfna bakterija z variabilnim rezultatom barvanja po Gramu (12). Biološka niša bakterije je vagina, kjer jo najdemo v 15 % do 69 % žensk brez kliničnih znakov okužbe. Bakterijo pri bakterijski vaginozi skoraj vedno najdemo skupaj z različnimi anaerobnimi bakterijami (13). Za zdravljenje bakterijske vaginoze se uspešno uporablja metronidazol, kar kaže na pomen anaerobnih bakterij. Rutinsko zdravljenje spolnih partnerjev ni priporočljivo (14). Iskanje in zdravljenje bakterijske vaginoze je priporočeno pri ženskah, ki so nagnjene k prezgodnjemu porodu ter pri ženskah pred abortusom in pred histerektomijo (14).

G. vaginalis je na celicah nožnice lahko prisotna v planktonski obliki ali pa tvori biofilm. Gostota bakterije je v biofilmu 10^{10} – 10^{11} celic/gram, medtem ko je v planktonski obliki 10^6 – 10^8 celic/gram. Prisotnost planktonske oblike ali biofilma vidimo v sedimentu urina tako pri ženskah kot pri moških. Študije kažejo na popolno ujemanje klinično izražene bakterijske vaginoze pri ženskah s sevi *G. vaginalis*, ki tvori biofilm, ter njihovimi partnerji. Trenutno pri proučevanju bakterijske vaginoze še nimamo ustreznega *in vitro* modela biofilma (7).

Termin bakterijski vaginitis oz. kapseje bakterijska vaginoza (BV) je uvedla skupina raziskovalcev z Univerze Washington, ki je ugotovila, da je nespecifični vaginitis povezan z velikimi spremembami vaginalne flore oz. združbe bakterij, kar so dokazovali z molekularnimi metodami – sekvencioniranjem 16s RNA. Ta skupina raziskovalcev je določila klinične kriterije BV, ki se uporabljajo pri ženskah in so:

- pH vaginalnega izločka je večji od 4,5,
- vonj po ribah, ko vaginalnemu izločku dodamo 10 % KOH,
- najmanj 20 % delež vaginalnih epitelnih celic, prekritih z bakterijami (»Clue cells«) in
- bel mlečnat izcedek.

Za klinično diagnozo BV morajo biti izpolnjeni vsaj trije od štirih kriterijev (15). Kmalu po uvedbi teh kriterijev v klinično delo je Nugent s sodelavci spremenil kriterije barvanja po Gramu (16). Kriteriji so kvantitativno opredeljevali *Lactobacillus* spp. (po Gramu pozitivni bacili), *G. vaginalis* (po Gramu negativne kokobacile) in *Mobiluncus* spp. (po Gramu negativne zavite bacile). Točke 0 do 3 so se vrednotile kot normalna flora (prevladovanje *Lactobacillus* spp.), 4 do 6 vmesna flora oz. mešani morfotipi, 7 do 10 pa BV (odsotnost *Lactobacillus* spp., prevladovanje ostalih dveh bakterijskih vrst). Nugentovi krite-

riji so se več let uporabljali kot standardni kriteriji za diagnozo bakterijske vaginoze. Slabost metode je bila ta, da je bila dokaj zamudna in je zahtevala izurjeno osebo (17).

Pri bakterijski vaginozi so vidne tudi spremembe v vrsti *Lactobacillus* spp., *Lactobacillus iners* je pristoten pri bakterijski vaginozi, *Lactobacillus crispatus* pa prevladuje v flori vagine žensk brez simptomov BV. Nove laboratorijske tehnike omogočajo pogostejšo identifikacijo *G. vaginalis* in *A. vaginae*, kar omogoča zaznavanje nosečih žensk z BV in na ta način zdravljenje in preprečevanje tveganja prezgodnjega poroda. V preprečevanju ponovitev BV antibiotično zdravljenje ni preveč učinkovito, saj se pogosto pojavijo ponovitve. Večji učinek se pričakuje od uporabe novih probiotikov (18).

Pri otrocih so okuže z *G. vaginalis* redke. Invazivne okužbe se pojavljajo le pri novorojencih (2).

Kelsey s sodelavci je s študijo žensk v ginekološkem dispanzerju potrdil, da osamitev *G. vaginalis* in anaerobov pomaga potrditi diagnozo bakterijske vaginoze in jo omogoča ločevati od drugih možnih patologij. Primerjal je bolnice z bakterijsko vaginozo in zdrave preiskovanke. Pri bol-

nicah z bakterijsko vaginozo so bili rezultati testa osamitve *G. vaginalis* 100 % občutljivost in 77 % specifičnost, medtem ko je bil test osamitve anaerobov 93 % specifičen. Zaključki te študije so bili, da ima osamitev anaerobov (30,8 %) boljšo napovedno vrednost za postavitve diagnoze nespecifičnega vaginitisa kot osamitev *G. vaginalis* (18,9 %) oz. da je korist osamitve bakterije *G. vaginalis* v postavitvi diagnoze bakterijske vaginoze majhna in podraži diagnostiko, medtem ko poročanje prisotnosti številčne rasti anaerobov pomeni potrditev diagnoze brez podražitve (6).

ZAKLJUČEK

Glede na to, da je bakterijska vaginoza polimikrobna okužba s prevladovanjem anaerobnih bakterij v mikrobioloških laboratorijih, še naprej priporočamo natančno pregledovanje direktnih razmazov, barvanih po Gramu. Posamezni avtorji tega prispevka v prihodnosti priporočamo študijo kultivacije humanega krvnega agarja v anaerobnih pogojih, namesto v CO₂ atmosferi. Na ta način bomo dobili vpogled tudi v anaerobne bakterije in ojačali hemolizo, ki jo tvori bakterija *G. vaginalis*. Pri postavitvi diagnoze želimo bolj povezati klinične podatke.

LITERATURA

1. Schwebke JR, Muzny CA, Josey WE. Role of Gardnerella vaginalis in the pathogenesis of bacterial vaginosis: a conceptual model. J Infect Dis. 2014; 210: 338-43.
2. Amaya RA, Al-Dossary F, Demmler GJ. Gardnerella vaginalis bacteremia in a premature neonate. Journal of Perinatology. 2002; 22: 585-7.
3. Gottlieb SL, Douglas JM, Foster M et al. Incidence of herpes simplex virus type 2 infection in 5 sexually transmitted disease (STD) clinics and the effect of HIV/STD risk-reduction counseling. J Infect Dis 2004; 190: 1059-67.
4. Watts DH, Fazzari M, Minkoff H, et al. Effects of bacterial vaginosis and other genital infections on the natural history of human papillomavirus infection in HIV-1-infected and high-risk HIV-1-uninfected women. J Infect Dis. 2005; 191: 1129-39.
5. Leopold S. Heretofore undescribed organism isolated from genitourinary system. Us Armed Forces Med J. 1953; 4: 263-6.
6. Kelsey MC, Mann GK, Bangham AM, et al. Non-specific (anaerobic) vaginitis: relevance of clinical and laboratory studies in a practice population. J R Coll Gen Pract. 1987; 37: 56-8.

7. Verstraelen H, Swidsinski A. The biofilm in bacterial vaginosis: implications for epidemiology, diagnosis and treatment. *Curr Opin Infect Dis*. 2013; 26: 86–9.
8. Isenberg HD. *Clinical Microbiology procedures handbook*. 2nd ed. Washington: ASM Press; 2004.
9. Novak M, Prosen B. Pogostost bakterijske vaginoze in povezava s prezgodnjim porodom. *Med Razgl*. 1998; 37: 483–96.
10. Public Health England. UK Standards for Microbiology Investigations. Investigation of genital tract and associated specimens. *Bacteriology B28*. 2014; 4 (4): 1–38.
11. Marrazzo JM, Koutsky LA, Eschenbach DA, et al. Characterization of vaginal flora and bacterial vaginosis in women who have sex with women. *J Infect Dis*. 2002; 185: 1307–13.
12. Catlin BW. *Gardnerella vaginalis*: Characteristics, clinical consideration, and controversies. *Clin Microbiol Rev*. 1992; 5: 213–237.
13. Spiegel CA, Amsel R, Eschenbach D, et al. Anaerobic bacteria in nonspecific vaginitis. *N Engl J Med*. 1980; 303: 601–7.
14. CDC. Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines. *MMWR*. 2010; 59: 56–7.
15. Spiegel CA, Amsel R, Eschenbach D, et al. Anaerobic bacteria in nonspecific vaginitis. *New Eng J Med*. 1980; 303: 601–7.
16. Nugent RP, Krohn MA, Hillier SL. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of Gram stain interpretation. *J Clin Microb*. 1991; 29: 297–301.
17. Martin DH. The microbiota of the vagina and its influence on women's health and disease. *Am J Med Sci*. 2012; 343: 2–9.
18. Bohbot JM, Lepargneur JP. Bacterial vaginosis in 2011: a lot of questions remain. *Gynecol Obstet Fertil*. 2012; 40: 31–6.

Andrej Golle¹, Slavica Lorenčič Robnik², Sarah Dobnik³, Iztok Takač⁴

Osamitev bakterije *Streptococcus agalactiae* pri bolnicah s simptomi vnetja nožnice

Isolation of Streptococcus agalactiae from Women Diagnosed with Vaginitis

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: mikrobiološka diagnoza, *Streptococcus agalactiae*, normalna flora, laktobacili, aerobni vaginitis, bakterijska vaginoza

IZHODIŠČA. Bakterija *Streptococcus agalactiae* je pomemben povzročitelj okužb pri novorojenčkih. Povzroča okužbe porodnic in bolnikov z znanimi dejavniki tveganja. Osamimo jo lahko iz nožnice žensk s simptomi vaginitisa, vendar številni strokovnjaki menijo, da se pojavlja v nožnici izključno kot saprofit. Pojavljajo se posamična poročila in članki, ki *S. agalactiae* pripisujejo vlogo pri nastanku vaginitisa bodisi samostojno ali v sklopu diagnoze aerobnega vaginitisa. V prispevku prikažemo, kako pogosto osamitev *S. agalactiae* iz brisov nožnice, ki smo jih odvzeli bolnicam, zdravljenim na Kliniki za ginekologijo in perinatologijo Univerzitetnega kliničnega centra Maribor (UKC Maribor), spremlja tudi dokumentirana klinična diagnoza vnetja nožnice, in ali je bila ob tem bakterija *S. agalactiae* izolirana samostojno ali so jo spremljali še drugi potencialni povzročitelji vnetja nožnice. **METODE.** Iz informacijskega sistema mikrobiološkega laboratorija (MBL) smo pridobili podatke o osamitvi *S. agalactiae* iz brisov nožnic, ki so jih odvzeli bolnicam, zdravljenim na Kliniki za ginekologijo in perinatologijo UKC Maribor, in jih poslali na preiskavo na patogene bakterije v letih od 2009 do 2013. Primerjali smo jih s podatki v informacijskem sistemu UKC Maribor. **REZULTATI.** Pri 1.121 bolnicah, ki so se v tem obdobju zdravile na Kliniki za ginekologijo in perinatologijo UKC Maribor, smo osamili *S. agalactiae* iz brisov nožnice. Od tega smo zabeležili 542 epizod vnetja nožnice pri 503 bolnicah. Kot edini izolat se je *S. agalactiae* pojavil pri 216 epizodah vnetja nožnice. Pri 293 epizodah je bila hkrati osamljena še gliva *C. albicans*, pri 78 epizodah pa druge vrste bakterij. **ZAKLJUČKI.** Menimo, da je osamitev *S. agalactiae* pri ženskah s simptomi vnetja nožnice potrebno presojati v sklopu pregleda nativnega razmaza izcedka in celotne klinične slike. *S. agalactiae* sodi v skupino povzročiteljev t. i. aerobnega vaginitisa. Tega je zaradi različnih pristopov k zdravljenju potrebno ločiti od vaginitisa, ki ga povzročajo glive in bakterijske vaginoze.

¹ Asist. mag. Andrej Golle, dr. med., spec. klin. mikrobiol., Oddelek za medicinsko mikrobiologijo Maribor, Center za medicinsko mikrobiologijo, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Prvomajska ulica 1, 2000 Maribor; andrej.golle@nlzoh.si

² Slavica Lorenčič Robnik, dr. med., spec. klin. mikrobiol., Oddelek za medicinsko mikrobiologijo Maribor, Center za medicinsko mikrobiologijo, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Prvomajska ulica 1, 2000 Maribor

³ Sarah Dobnik, dr. med., specializantka ginek. in porodn., Klinika za ginekologijo in perinatologijo, Univerzitetni klinični center Maribor, Ljubljanska 5, 2000 Maribor

⁴ Prof. dr. Iztok Takač, dr. med., spec. ginek. in porodn., Klinika za ginekologijo in perinatologijo, Univerzitetni klinični center Maribor, Ljubljanska 5, 2000 Maribor; Medicinska fakulteta, Univerza v Mariboru, Taborska ulica 8, 2000 Maribor

ABSTRACT

KEY WORDS: microbiologic diagnosis, *Streptococcus agalactiae*, normal flora, lactobacilli, aerobic vaginitis, bacterial vaginosis

BACKGROUND. *Streptococcus agalactiae* is an important agent of severe bacterial infections in newborns. In addition, it is responsible for serious infections in pregnant women and in patients with known risk factors. Although *S. agalactiae* can be isolated from vaginal swabs, the bacterium is mostly considered as a saprophyte. We noted reports and articles describing *S. agalactiae* as a cause of vaginitis as a sole pathogen or as a member of a group of pathogens associated with aerobic vaginitis. Here we present how often is *S. agalactiae* isolated as a sole pathogen from vaginal swabs of the patients with documented vaginitis treated at the Clinic of Gynaecology and Perinatology of the University Clinical Centre Maribor (UCC Maribor). **METHODS.** We collected the data about *S. agalactiae* isolation in the period from 2009 to 2013 from the Laboratory information system MBL. Our data were compared with data about diagnosis of vaginitis obtained from the Hospital information system MEDIS. **RESULTS.** Bacteria *S. agalactiae* were isolated from vaginal swabs of 1,121 women treated in the testing period at the Clinic of Gynaecology and Perinatology of the UCC Maribor. We documented 542 episodes of vaginitis from 503 patients and isolated *S. agalactiae* as a sole pathogen in 216 episodes of vaginitis. In 293 episodes, we concomitantly isolated *Candida albicans* and in 78 episodes another bacterial species. **CONCLUSIONS.** Isolation of *S. agalactiae* from vaginal swabs in patients with vaginitis has to be always considered together with wet mount of vaginal discharge and clinical situation. *S. agalactiae* is one of the pathogens associated with aerobic vaginitis. Due to different approaches to treatment, it is important to distinguish aerobic vaginitis from bacterial vaginosis and vaginitis caused by fungi.

UVOD

Zgodnji opisi bakterije *Streptococcus agalactiae* kot povzročitelja okužb pri ljudeh segajo v prvo polovico 20. stoletja. Leta 1935 sta jo Lancefield in Hare osamila pri več nosečnicah, od tega je pri treh povzročila poporodno vročico (1). Danes vemo, da je *S. agalactiae* najpomembnejši povzročitelj zgodnje sepse, pljučnice in meningitisa pri novorojenčkih (2, 3). Prav tako je jasna njegova vloga pri okužbah porodnic in okužbah imunsko oslabeledih bolnikov in bolnikov z znanimi dejavniki tveganja (4–6). Znano je tudi, da lahko povzroča ponavljajoče se bakteriurije (6). Bakterijo *S. agalactiae* pogosto osamimo tudi iz nožnice žensk, ki imajo simptome vaginitisa, vendar številni strokovnjaki vlogo *S. agalactiae* pri vnetju nožnice zavračajo in menijo, da

se pojavlja v nožnici izključno kot saprofit oziroma da nožnico le prehodno kolonizira (7, 8). Soglasno se kot najpogostejši povzročitelji vnetja nožnice danes navajajo glive iz rodu *Candida* in parazit *Trichomonas vaginalis* (9). Temu navkljub pa se pojavljajo posamična poročila in članki, ki *S. agalactiae* pripisujejo vlogo pri nastanku vaginitisa bodisi samostojno bodisi v sklopu diagnoze aerobnega vaginitisa (10–13).

Aerobni vaginitis je vnetje nožnice, pri katerem ugotavljamo neravnovesje v normalni flori nožnice, odsotnost laktobacilov, povečano število levkocitov in porast aerobnih mikroorganizmov, ki imajo svoj izvor v prebavilih in jih tradicionalno pojmujejo kot kolonizatorje (13–15).

V našem prispevku bi radi prikazali, kako pogosto osamitev *S. agalactiae* iz bri-

sov nožnice, ki smo jih odvzeli bolnicam zdravljenim na Kliniki za ginekologijo in perinatologijo Univerzitetnega kliničnega centra Maribor (UKC Maribor), spremlja tudi dokumentirana klinična diagnoza vnetja nožnice, ter ali je bila ob tem bakterija *S. agalactiae* izolirana samostojno ali so jo spremljali še drugi potencialni povzročitelji vnetja nožnice.

METODE

Podatki

Podatke o osamitvi bakterije *S. agalactiae* iz brisov nožnic, ki so jih odvzeli bolnicam, zdravljenim na Kliniki za ginekologijo in perinatologijo UKC Maribor in jih poslali na preiskavo na patogene bakterije v letih od 2009 do 2013, smo pridobili iz laboratorijskega informacijskega sistema MBL.

Laboratorijske podatke o bolnicah, pri katerih smo osamili *S. agalactiae*, smo primerjali s podatki o teh bolnicah v MEDI-SU – informacijskem sistemu UKC Maribor. Zanimalo nas je, kdaj je osamitev *S. agalactiae* iz brisa nožnice spremljala tudi klinična slika vnetja nožnice. Ob tem smo bili pozorni še na to, kdaj je bil *S. agalactiae* edini izolat oz. kdaj smo ob *S. agalactiae* izolirali še druge morebitne povzročitelje vnetja nožnice.

Mikrobiološka diagnostika

Brise nožnic, ki jih preiskujemo na patogene bakterije, cepimo v skladu z navodili za delo Centra za mikrobiologijo, Nacionalnega laboratorija za zdravje, okolje in hrano v Mariboru (CMM NLZOH, Mb). Vsak bris nožnice nacepimo na gojišča: čokoladni agar in krvni agar s stafilokokno črto, ki jih inkubiramo pri 5 % CO₂ za obdobje 24 ur, ter tekoča gojišča (obogatitveno tioglikolatno gojišče in selektivno gojišče po Todd-Hewitu). Plošče nato pregledamo in jih inkubiramo še za nadaljnjih 24 ur. Tekoča gojišča po 24 urah precepimo na krvni agar s stafilokokno črto. Za osamitev in preliminarno identifikaci-

jo *S. agalactiae* uporabljamo kromogeno selektivno in diferencialno gojišče.

Kadar je zahtevana še preiskava na glive, nacepimo gojišča, namenjena osamitvi gliv (trdo gojišče po Saboraud-u), ki jih inkubiramo pri 30 °C za obdobje 7 dni. V primerih, ko naročnik preiskave na glive ni posebej zahteval, prisotnost gliv v kužnici izključujemo tako, da po 48 urah napravimo mikroskopski razmaz iz obogatitvenega tioglikolatnega gojišča, v katerem glive dobro uspevajo. Če v razmazu opazimo blastokonidije, gojišče precepimo na selektivno in diferencialno trdo gojišče za preliminarno identifikacijo kvasovk.

Na bakterioloških gojiščih porasle bakterije in glive identificiramo po standardnih laboratorijskih postopkih.

Klinična diagnostika

Klinična diagnoza vaginitisa se postavi na podlagi anamneze ženske, kliničnega pregleda in morebitnih dodatnih preiskav (16). Za oceno vaginalnega izcedka je potrebno poznavanje fiziološkega vaginalnega izcedka, ki je bel, nehomogen in grudičast, in normalnega pH vagine, ki je med 3,8 in 4,5 (16). Le tako bomo lahko normalen izcedek ločili od patološkega (17). Vrste vaginitisa se med seboj v prvi vrsti razlikujejo po značilnostih izcedka: pri glivičnem vnetju je izcedek bele barve in spominja na sesirjeno mleko; pri trihomonoznem vnetju se pojavi obilen zelenorumen izcedek s sladkastim vonjem; pri bakterijski vaginozi pa je izcedek siv, voden, homogen in z vonjem po ribah. Posebna entiteta je atrofični vaginitis, ki se pojavi po menopavzi z značilnim gnojnim, krvavkastim obarvanim izcedkom (16, 17). V primeru postavitve diagnoze vaginitisa glede na klinično oceno vaginalnega izcedka se brez dodatnih preiskav odločimo za zdravljenje s primernimi zdravili glede na izcedek, torej antimikotiki, antibiotiki ali estrogenskimi preparati (16). Kljub temu pa pri vseh ženskah, ki se pritožuje-

jo nad vaginalnimi težavami, ne najdemo značilnega izcedka (18). V tem primeru bi lahko šlo za netradicionalne povzročitelje vaginitisa (*S. agalactiae*, *E. coli* itd.), ki povzročajo tako imenovani aerobni vaginitis z značilnim gnojnim izcedkom. V pomoč pri postavljanju diagnoze nam je tudi test z lakmusovim papirjem. Izguba kislosti in vrednosti pH vagine nad 4,5 nam nakazuje bakterijski ali pa aerobni vaginitis (19). Poslužujemo pa se tudi mikroskopskega pregleda, pri katerem lahko pri različnih povzročiteljih opazimo prisotnost različnih celic, ki so nam prav tako lahko v pomoč pri postavitvi diagnoze (16, 17). Z mikroskopskim pregledom fiziološkega vaginalnega izcedka vidimo številne laktobacile in posamezne druge bakterije, epitelne celice ter posamezne levkocite (16). Mikroskopski pregled trihomonoznega izcedka nam razkrije nekaj več levkocitov in značilnega bičkarja (*Trichomonas vaginalis*) (19). Razlika med mikroskopskim pregledom izcedkov pri bakterijskem in aerobnem vaginitisu pa je v tem, da so pri aerobnem vaginitisu v izcedku prisotni levkociti in koki ali bacili, pri bakterijskem vaginitisu pa clue celice (14). Če kljub dodatnim hitrim preiskavam ne moremo določiti povzročitelja, se odločimo za empirično zdravljenje. V primeru neučinkovitosti in ponavljajočih se vaginitisov se odločimo za bris nožnice in mikrobiološko preiskavo (19).

REZULTATI

V obdobju od leta 2009 do leta 2013 smo pri 1.121 bolnicah, ki so se zdravile na Kliniki za ginekologijo in perinatologijo UKC Maribor, osamili *S. agalactiae* iz brisov nožnice.

Pri 503 bolnicah, pri katerih smo osamili *S. agalactiae*, smo zabeležili 542 primerov vnetja nožnice. Pri 216 epizodah vnetja je bil *S. agalactiae* edini izolat, pri 293 primerih je osamitev *S. agalactiae* spremljala še osamitev *C. albicans*, drugi

potencialno patogeni mikroorganizmi so se pojavili pri 78 epizodah vaginitisa. Podrobnejše rezultate prikazuje tabela 1.

RAZPRAVA

Izcedek iz nožnice in spremljajoče simptome lahko povzročajo mikroorganizmi, lahko pa so vzrok tudi drugi dejavniki. V 80–90 % je izcedek iz nožnice povezan z mikrobiološkimi povzročitelji (15). Ekosistem nožnice je zapleten in dinamičen sistem. Nanj vplivajo starost, hormonski status in številni drugi dejavniki, ki lahko premaknejo mikrobnoravnovesje in tako povečajo tveganje za okužbo (15, 20). Pri zdravih ženskah v rodnem obdobju med nožnično floro prevladujejo mlečnokislinske bakterije, zlasti laktobacili, ki pri ženskah kavkaškega porekla predstavljajo 50–90 % flore (21, 22). Neredko najdemo tudi predstavnike nekaterih anaerobnih bakterij, kot so bakterije iz rodov *Bacteroides* spp., *Prevotella* spp., *Clostridium* spp., pa tudi nekatere fakultativno anaerobne bakterije, kot so *E. coli* in različne vrste stafilokokov (13). Laktobacili živijo v simbiozi s svojo gostiteljico in so pomembni za lokalno odpornost sluznice, ker izločajo mlečno kislino, ki ustvarja nizek pH nožnice. Določeni sevi laktobacilov izločajo H_2O_2 , drugi bakteriocine, ki skupaj z nizkim pH zavirajo rast ter preprečujejo razmnoževanje in adherenco potencialnih patogenov (20, 22). Vaginitis se razvije, kadar iz različnih vzrokov pride do porušitve normalne mikrobne flore, temu pa sledi kolonizacija z oportunističnimi patogeni (19). Do neravnovesja nožnične flore lahko pride zaradi neustrezne higijene, širokospektralnega protimikrobnega zdravljenja in različnih spolnih praks (22).

Tradicionalno se med vnetji nožnice, ki jih povzročajo mikroorganizmi, navajajo trije tipi vaginitisa, to so vaginitis, ki ga povzročajo glive iz rodu *Candida*, vaginitis, ki ga povzroča parazit *T. vaginalis* in bakterijska vaginoza (15, 20).

Tabela 1. Število bolnic, pri katerih smo osamili *S. agalactiae*; število epizod vnetja nožnice in število bolnic z vnetjem nožnice, pri katerih smo osamili *S. agalactiae*; število epizod vnetja, kjer je bil *S. agalactiae* edini izolat in število epizod vnetja, kjer je osamitev bakterije *S. agalactiae* spremljala še osamitev drugih potencialnih povzročiteljev.

Leto	Število bolnic, pri katerih smo osamili <i>S. agalactiae</i>	Število epizod vnetja nožnice, ob katerih je bil izoliran <i>S. agalactiae</i> (število bolnic/povprečna starost)	Število epizod vnetja nožnice, ob katerih je bil <i>S. agalactiae</i> edini izolat	Število epizod vnetja nožnice, ob katerih je bila istočasno osamljena še gliva <i>C. albicans</i>	Drugi povzročitelji, ki smo jih osamili hkrati s <i>S. agalactiae</i> (število epizod)
2009	223	105 (100/35,5 let)	47	51	<i>S. aureus</i> (9) <i>G. vaginalis</i> (3) <i>E. coli</i> (1)
2010	250	142 (127/35 let)	56	79	<i>S. aureus</i> (7) <i>G. vaginalis</i> (1) <i>K. pneumoniae</i> (2) <i>A. baumannii</i> (1) <i>S. pyogenes</i> (2) <i>C. glabrata</i> (1) <i>C. krusei</i> (1)
2011	235	113 (103/32,4 let)	40	62	<i>S. aureus</i> (10) <i>G. vaginalis</i> (5) <i>S. cerevisiae</i> (2) <i>E. coli</i> (1) <i>E. aerogenes</i> (1) <i>K. pneumoniae</i> (1) <i>P. mirabilis</i> (1)
2012	194	82 (77/34,5 let)	38	45	<i>S. aureus</i> (9) <i>G. vaginalis</i> (5) <i>P. aeruginosa</i> (2)
2013	219	100 (96/34,4 let)	35	56	<i>S. aureus</i> (7) <i>E. coli</i> (1) <i>G. vaginalis</i> (3) <i>P. mirabilis</i> (1) <i>C. koseri</i> (1)
Skupaj	1.121	542 (503/34,3 let)	216	293	<i>S. aureus</i> (42) <i>G. vaginalis</i> (17) Enterobakterije (10) <i>S. pyogenes</i> (2) <i>P. aeruginosa</i> 2 <i>A. baumannii</i> (1) kvasovke (ne- <i>C. albicans</i>) (4)

Vloga *S. agalactiae* pri vnetju nožnice je slabo opredeljena (19). Po mnenju nekaterih ima *S. agalactiae* pri vnetju nožnice sekundarno vlogo, ker samo kolonizira zaradi glivne okužbe oz. dermatoze predhodno okvarjen epitelij (23, 24). Bakterija *S. agalactiae* kolonizira tudi ženske, ki nimajo težav, takšno kolonizacijo ugotovljajo med 10–40 % žensk (25–27). Stop-

nja kolonizacije med nosečimi in neno-sečimi ženskami v rodnem obdobju je podobna (27, 28). Drugi ugotovljajo povečano stopnjo kolonizacije s *S. agalactiae* pri bolnicah z gnojnim izcedkom iz nožnice (10, 12, 25, 29). Opisana sta tudi dva primera uspešnega zdravljenja vaginitisa, ki naj bi ga povzročil *S. agalactiae*, s protimikrobnimi zdravili, ki učinkujejo

na *S. agalactiae* (11). Ugotavljajo tudi, da pri bolnicah, pri katerih so osamili *S. agalactiae*, v nativnem razmazu izcedka vidijo številne levkocite (12). Tako Maniatis v svoji raziskavi, kjer je poskušal oceniti vlogo *S. agalactiae* pri vnetju nožnice, ugotavlja, da je bil *S. agalactiae* osamljen pri 10,1 % bolnicah, kjer je bilo prisotnih več kot 10 levkocitov na vidno polje velike povečave (aktivno vnetje), oziroma pri 4,3 % bolnic, kjer je bilo prisotnih manj kot 10 levkocitov na vidno polje velike povečave (ni vnetja) (12). Prav tako meni, da osamitev *S. agalactiae* kot edinega povzročitelja pri klinično potrjenem vnetju nožnice govori za streptokokno etiologijo le-tega. V svojem članku poroča, da so *S. agalactiae* osamili kot edinega povzročitelja v 83 % primerov (12).

Za naše bolnice podatka o nativnem razmazu izcedka nimamo. Ugotavljamo pa, da smo *S. agalactiae* osamili pri 1.121 bolnicah, od katerih je 503 imelo simptome vnetja nožnice (44,8 %). V celotnem obdobju smo zabeležili 542 epizod vnetja nožnice, pri tem je bil v 216 primerih *S. agalactiae* osamljen kot edini povzročitelj (39,8 %). Večji delež osamitve *S. agalactiae* pri bolnicah s simptomi vnetja nožnice pri nas bi lahko pripisali izboru bolnic pri katerih na Kliniki za ginekologijo in perinatologijo UKC Maribor odvzamejo kužnine za mikrobiološke preiskave. Maniatis je v svojo raziskavo vključil vse ženske, ki so imele simptome vnetja nožnice, kot so izcedek, srbenje in pekoče bolečine, medtem ko so pri naših bolnicah brise odvzeli selektivno (kadar zdravljenje ni učinkovito ali se vnetje nožnice ponavlja).

V novejših člankih se *S. agalactiae* pojavlja v sklopu povzročiteljev aerobnega vaginitisa. V svojem prispevku iz leta 2000 Donders ugotavlja, da se ob porušenju nožnične flore lahko razvije bodisi bakterijska vaginoza, kjer kot nespecifični povzročitelji prevladujejo anaerobni

mikroorganizmi, ali pa aerobni vaginitis, kjer se kot povzročitelji pojavljajo aerobne bakterije, ki izvirajo iz prebavil (30). Zaradi različnih pristopov k zdravljenju je bistveno, da znamo ločiti med bakterijsko vaginozo (BV) in aerobnim vaginitisom (AV). V obeh primerih izmerimo zvišan pH in znižane vrednosti laktata, bistvena razlika pa je prisotnost levkocitov v izcedku pri AV ter prisotnost clue celic in bakterijskih morfotipov, značilnih za *Mobiluncus* spp. in *Gardnerella* spp. pri BV (14, 15, 20, 30). Diagnoza AV je utemeljena na bakterioloških, kliničnih in imunoloških značilnostih. Pri AV pogosto osamimo aerobne po Gramu pozitivne koke, kot so *S. agalactiae*, različne vrste stafilokokov in enterokoke ter po gramu negativne bacile, med njimi najpogosteje *E. coli*. Osamitev *S. agalactiae* je zelo pogosto povezana z AV, saj se pojavlja pri 0,7 do 77,9 % AV, sledijo mu *S. aureus*, koagulazno negativni stafilokoki in enterokoki (13, 31). Enterokokom večina avtorjev ne pripisuje pomembnejše vloge (20). Bakterije, ki jih osamimo pri AV, so pravzaprav odraz kolonizacije s floro prebavil, ki se razvije zaradi motene mikrobne ekologije nožnice (20). Klinično je za AV značilen izcedek neprijetnega vonja, vendar se ob dodatku KOH ne razvije značilen »ribji vonj«, pH izcedka je povišan – 5 ali več. Prisotne so pekoče bolečine, srbež in bolečine ob spolnih odnosih, lahko so vidne razjede na materničnem vratu (14, 20).

AV je povezan z zapleti v nosečnosti in ob porodu (33).

Samo na osnovi kliničnih simptomov AV ne moremo ločiti od drugih okužb, pogoste so tudi mešane okužbe oz. hkratne okužbe z glivami oz. trihomonasom (34). Mi smo se osredotočili na kolonizacije oz. okužbe s *S. agalactiae*. Ugotovili smo, da smo pri 293 primerih vnetja nožnice sočasno z bakterijo *S. agalactiae* osamili še *C. albicans* (54 %) oz. pri 78 primerih še sočasno osamili drugo bakterijo (14 %).

Za natančno diagnozo AV je ob upoštevanju kliničnih simptomov zelo pomemben nativni razmaz, ki ga opazujemo s fazno-kontrastnim mikroskopom pri veliki povečavi (400-krat). V razmazu vidimo koke, koke v verižicah, velike bacile, številne levkocite, med njimi granulirane – toksične levkocite, epitelijske in parabazalne celice, število laktobacilov je nižano ali pa so povsem odsotni (14, 20). Na osnovi izgleda nativnega razmaza lahko po kriterijih, ki jih je predlagal Donders, ocenimo, kako močno je prizadeto ravnovesje normalne nožnične flore (14, 15). Pomembno je tudi število levkocitov na vidno polje. Na teh kriterijih temelji točkovanjski sistem, s katerim lahko postavi mo diagnozo AV (14).

ZAKLJUČKI

Na osnovi naših podatkov in pregleda literature menimo, da je osamitev *S. agalactiae* pri ženskah s simptomi vnetja nožnice potrebno presoati v sklopu pregleda nativnega razmaza izcedka in celotne klinične slike.

Zaradi različnega pristopa k zdravljenju se nam zdi še posebej pomembno, da vnetja nožnice iz skupine aerobnih vaginitisov, kamor spadajo tudi vnetja nožnice, ki jih povzroča *S. agalactiae*, ločimo od bakterijske vaginoze in vaginitisa, ki ga povzročajo glive iz rodu kandida.

Hkrati pa se moramo zavedati, da je vnetje nožnice rezultat neravnovesja v normalni nožnični flori in da s protimikrobnim zdravljenjem ne smemo prizadeti normalne bakterijske flore.

LITERATURA

1. Eren A, Kucukercan M, Oguzoglu N, et al. The carriage of group B streptococci in Turkish pregnant women and its transmission rate in newborns and serotype distribution. *Turk J Pediatr* 2005; 47: 28–33.
2. Zangwill KM, Schuchat A, Wenger JD. Group B streptococcal disease in the United States, 1990: report from a multistate active surveillance system. *MMWR* 1992; 41: 25–32.
3. Center for Disease Control and prevention. Decreasing incidence of perinatal group B streptococcal disease--United States, 1993–1995. *MMWR* 1997; 41: 473–7.
4. Schuchat A. Epidemiology of group B streptococcal disease in the United States: shifting paradigms. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11: 497–513.
5. Yancey MK, Duff P, Clark P, et al. Peripartum infection associated with vaginal group B streptococcal colonization. *Obstet Gynecol* 1994; 84: 816–9.
6. Wang YH, Chen HM, Yang YH, et al. Clinical and microbiological characteristics of recurrent group B streptococcal infection among non-pregnant adults. *Int J Infect Dis* 2014; 26: 140–5.
7. Farley MM, Harvey RC, Stull T, et al. A population-based assessment of invasive disease due to group B *Streptococcus* in nonpregnant adults. *N Engl J Med* 1993; 328: 1807–11.
8. Gupta R, Das A, Krishna PS. *Streptococcus agalactiae* causing pyometra in an elderly female with cervical cancer. *J Infect Dev Ctries* 2012; 6: 891–4.
9. Savini V, Marrollo R, D'Antonio M, et al. *Streptococcus agalactiae* vaginitis: nonhemolytic variant on the Liofilchem(R) Chromatic StreptoB. *Int J Clin Exp Pathol* 2013; 6: 1693–5.
10. Regan JA, Klebanoff MA, Nugent RP. The epidemiology of group B streptococcal colonization in pregnancy. Vaginal Infections and Prematurity Study Group. *Obstet Gynecol* 1991; 77: 604–10.
11. Honig E, Mouton JW, van der Meijden WJ. Can group B streptococci cause symptomatic vaginitis? *Infect Dis Obstet Gynecol* 1999; 7: 206–9.
12. Maniatis AN, Palermos J, Kantzanou M, et al. *Streptococcus agalactiae*: a vaginal pathogen? *J Med Microbiol* 1996; 44: 199–202.
13. Tansarli GS, Kostaras EK, Athanasiou S, et al. Prevalence and treatment of aerobic vaginitis among non-pregnant women: evaluation of the evidence for an underestimated clinical entity. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2013; 32: 977–84.

14. Donders GG, Vereecken A, Bosmans E, et al. Definition of a type of abnormal vaginal flora that is distinct from bacterial vaginosis: aerobic vaginitis. *BJOG* 2002; 109: 34–43.
15. Jahic M, Mulavdic M, Nurkic J, et al. Clinical Characteristics of Aerobic Vaginitis and Its Association to Vaginal Candidiasis, Trichomonas Vaginitis and Bacterial Vaginosis. *Med Arh.* 2013; 67: 428–430.
16. Borko E, Takač I, But I, eds. *Ginekologija. 2. dopolnjena izdaja.* Maribor: Visoka zdravstvena šola; 2006.
17. Carr PL, Felsenstein D, Friedman RH. Evaluation and management of vaginitis. *J Gen Intern Med* 1998; 13: 335–346.
18. Schwiertz A, Taras D, Rusch K, et al. Throwing the dice for the diagnosis of vaginal complaints? *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2006; 5: 4.
19. Leclair CM, Hart AE, Goetsch MF, et al. Group B streptococcus: prevalence in a non-obstetric population. *J Low Genit Tract Dis* 2010; 14: 162–6.
20. Tempera G, Furneri PM. Management of aerobic vaginitis. *Gynecol Obstet Invest* 2010; 70: 244–9.
21. Zhou X, Brown CJ, Abdo Z, et al. Differences in the composition of vaginal microbial communities found in healthy Caucasian and black women. *ISME J* 2007; 1: 121–33.
22. Razzak MS, Al-Charrakh AH, Al-Greitty BH. Relationship between lactobacilli and opportunistic bacterial pathogens associated with vaginitis. *N Am J Med Sci* 2011; 3: 185–92.
23. Sobel JD. Desquamative inflammatory vaginitis: a new subgroup of purulent vaginitis responsive to topical 2% clindamycin therapy. *Am J Obstet Gynecol* 1994; 171: 1215–20.
24. Sonnex C. Genital streptococcal infection in non-pregnant women: a case-note review. *Int J STD AIDS* 2013; 24: 447–8.
25. Honig E, Mouton JW, van der Meijden WI. The epidemiology of vaginal colonisation with group B streptococci in a sexually transmitted disease clinic. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology.* 2002; 105: 177–80.
26. Farrag OA, Gawad AA, Antar S. Group B-beta haemolytic streptococcal colonization in women using intrauterine contraceptive devices. *Contraception.* 1985; 31: 595–602.
27. Motlova J, Strakova L, Urbaskova P, et al. Vaginal & rectal carriage of *Streptococcus agalactiae* in the Czech Republic: incidence, serotypes distribution & susceptibility to antibiotics. *Indian J Med Res.* 2004; 119 Suppl: 84–7.
28. Brimil N, Barthell E, Heindricks U, et al. Epidemiology of *Streptococcus agalactiae* colonization in Germany. *Int J Med Microbiol.* 2006; 296: 39–44.
29. Jensen NE, Andersen BL. The prevalence of group B streptococci in human urogenital secretions. *Scandinavian journal of infectious diseases.* 1979; 11: 199–202.
30. Donders GG, Bosmans E, Dekeersmaecker A, et al. Pathogenesis of abnormal vaginal bacterial flora. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 182: 872–8.
31. Donders G, Bellen G, Rezeberga D. Aerobic vaginitis in pregnancy. *BJOG* 2011; 118: 1163–70.
32. Donders GG, Van Calsteren K, Bellen G, et al. Predictive value for preterm birth of abnormal vaginal flora, bacterial vaginosis and aerobic vaginitis during the first trimester of pregnancy. *BJOG: an international journal of obstetrics and gynaecology.* 2009; 116: 1315–24.
33. Donders G, Bellen G, Rezeberga D. Aerobic vaginitis in pregnancy. *BJOG* 2011; 118: 1163–70.
34. Fan A, Yue Y, Geng N, et al. Aerobic vaginitis and mixed infections: comparison of clinical and laboratory findings. *Arch Gynecol Obstet.* 2013; 287: 329–35.

Darja Keše¹, Slavica Lorenčič Robnik², Nina Gorišek Miksić³, Rok Kogoj⁴, Gorazd Košir⁵

Urogenitalne mikoplazme pregledno in prikaz primera izvengenitalne okužbe z bakterijo *Mycoplasma hominis*

*A Review of Urogenital Mycoplasmas and a Case Report of an
Extragenital Mycoplasma hominis Infection*

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: mikoplazma, ureaplazma, virulenčni dejavniki, epidemiologija, testiranje

Urogenitalne mikoplazme, med katere uvrščamo patogene vrste *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma parvum* in *Ureaplasma urealyticum*, pogosto naseljujejo sluznico genitourinarnega trakta. V tesnem stiku so vezane na gostiteljske epiteljske celice, od katerih pridobijo pomembna hranila. Zato so adhezijske molekule tudi glavni virulenčni dejavniki mikoplazem. Patogeneza urogenitalnih mikoplazem še ni povsem pojasnjena. Poškodbe, ki jih mikoplazme povzročijo, so bolj verjetno odraz imunskega in vnetnega odziva kot pa neposrednega toksičnega učinka mikoplazemskih celičnih sestavin. Z molekularnimi diagnostičnimi metodami so spoznali večji klinični pomen urogenitalnih mikoplazem tako pri moških uretritidih kot pri urogenitalnih okužbah nosečnic in novorojenčkov. Razsejane mikoplazemske in uroplazemske okužbe pri odraslih bolnikih so redke, poznane so predvsem pri imunokompromitiranih bolnikih. V prispevku predstavljamo tudi bolnika z dokazano izvengenitalno okužbo z bakterijo *M. hominis*.

ABSTRACT

KEY WORDS: mycoplasma, ureaplasma, virulence factors, epidemiology, testing

Urogenital mycoplasmas, including pathogenic *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma parvum* and *Ureaplasma urealyticum* commonly colonize urogenital tract of healthy persons. They are tightly attached to the host epithelium where they

¹ Doc. dr. Darja Keše, univ. dipl. biol., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana; darja.kese@mf.uni-lj.si

² Slavica Lorenčič Robnik, dr. med., Oddelek za medicinsko mikrobiologijo Maribor, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Prvomajska ulica 1, 2000 Maribor

³ Asist. mag. Nina Gorišek Miksić, dr. med., Oddelek za nalezljive bolezni in vročinska stanja, Univerzitetni klinični center Maribor, Ljubljanska ulica 5, 2000 Maribor

⁴ Asist. Rok Kogoj, univ. dipl. mikrobiol., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

⁵ Prim. Gorazd Košir, dr. med., Oddelek za kardiokirurgijo, Klinika za kirurgijo, Univerzitetni klinični center Maribor, Ljubljanska ulica 5, 2000 Maribor

get essential nutrients. Therefore, the cytoadherence proteins are the most important virulence factors of mycoplasmas. The pathogenesis of urogenital mycoplasmas is still poorly understood. Damage related to the infections of mycoplasma is more likely the result of the immune and inflammatory responses than the direct toxic effect of mycoplasmas components. The availability of molecular-based methods provided knowledge about greater clinical importance of mycoplasma infections in male urethritis, urogenital infections during pregnancy and in newborns. Urogenital mycoplasmas could be causally linked to disseminated infections in newborns but also in adults, mostly in immunocompromised patients. Finally, we report a case of *M. hominis* mediastinitis after aortic surgery.

UVOD

Rodova *Mycoplasma* in *Ureaplasma* spp. uvrščamo v razred *Mollicutes* in družino *Mycoplasmataceae*. Danes poznamo preko 200 vrst mikoplazem in 7 vrst ureaplazem. V človeku parazitira 17 vrst, ki so večinoma navzoče kot komenzalne bakterije v respiratornem in urogenitalnem traktu (tabela 1) (1). Sluznico ustnega dela žrela pogosto naseljujeta *M. orale* in *M. salivarium*. Najbolj poznana in preučena mikoplazma je *M. pneumoniae*, ki je pomemben respiratorni patogen in jo redko izoliramo iz kužnin zdravih oseb. Nedavno so opisali novo vrsto, *M. amphoriforme*, ki so jo izolirali iz spodnjih dihal bolnikov z imunsko pomanjkljivostjo in kronično infekcijo dihal, vendar je o njeni patogenosti še premalo podatkov (2). V urogenitalnem traktu najdemo sedem mikoplazemskih vrst, a so dokazano patogene le *M. hominis*, *M. genitalium* in *Ureaplasma* spp. in jih mnogokrat poimenujemo kar s skupnim imenom urogenitalne mikoplazme (3). Za rod *Ureaplasma* spp. je znano, da vsebuje 14 različnih serovarov, ki so bili do leta 2000 na podlagi analize 16S rRNA razdeljeni v dva gensko sorodna biovara, sedaj pa ju glede na filogenetske lastnosti označujemo kot dve ločeni vrsti. *Ureaplasma parvum* (*U. urealyticum*, biovar 1) vsebuje serovare 1, 3, 6 in 14, medtem ko *Ureaplasma urealyticum* (*U. urealyticum*, biovar 2) obsega preostale serovare 2, 4, 5, 7, 8,

9, 10, 11, 12 in 13. Zaenkrat je še premalo podatkov o možnih razlikah v patogenosti med posameznimi serovari (4).

MIKROBIOLOŠKE LASTNOSTI

Mikoplazme so filogenetsko sorodne po Gramu pozitivnim bakterijam, iz katerih naj bi se razvile z deležjo številnih genov. Po velikosti bakterijske celice in po velikosti genoma so to najmanjše bakterije, ki so sposobne samostojnega razmnoževanja. Ker nimajo celične stene, so pleomorfnih oblik, ne moremo jih barvati po Gramu niti jih ne moremo opazovati s svetlobnim mikroskopom, poleg tega pa so rezistentne na beta laktamske antibiotike. Bakterijsko celico obdaja le troslojna celična membrana z vgrajenimi steroli, ki jih mikoplazma pridobi od gostitelja in ji omogočajo večjo osmotsko stabilnost. Občutljive so na dehidracijo, kar jih tudi omejuje glede mesta parazitiranja (3, 5).

M. hominis uporablja arginin kot vir energije, in sicer preko arginin dihidrolazne poti, medtem ko ureaplazme kar 95 % energije pridobijo s hidrolizo sečnine do amoniaka (6). Nasprotno pa *M. genitalium* pridobiva ATP z razgradnjo glukoze po glikolitični poti (7).

Za urogenitalne mikoplazme je znano, da imajo zelo majhen genom z minimalnim številom genov. Zaradi tega imajo omejene biosintetske sposobnosti in so vezane na parazitski način življenja. Naj-

Tabela 1. Mikoplazme, ki parazitirajo v človeku (1).

Mikroorganizem	Primarno mesto kolonizacije		Patogena vloga ^a
	Respiratorni trakt	Urogenitalni trakt	
<i>Acholeplasma laidlawii</i>	+	-	Ne
<i>Mycoplasma amphoriforme</i>	+	-	?
<i>Mycoplasma buccale</i>	+	-	Ne
<i>Mycoplasma faucium</i>	+	-	Ne
<i>Mycoplasma fermentans</i>	+	+	?
<i>Mycoplasma genitalium</i>	-	+	Da
<i>Mycoplasma hominis</i>	-	+	Da
<i>Mycoplasma lipophilum</i>	+	-	Ne
<i>Mycoplasma orale</i>	+	-	Ne
<i>Mycoplasma penetrans</i>	-	+	?
<i>Mycoplasma pirum</i>	?	?	Ne
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	+	-	Da
<i>Mycoplasma primatum</i>	+	+	Da
<i>Mycoplasma salivarium</i>	+	-	Ne
<i>Mycoplasma spermatophilum</i>	-	+	Ne
<i>Ureaplasma parvum</i>	-	+	Da
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	-	+	Da

^a pri imunokompetentnih osebah

manjši bakterijski genom je spoznan pri *M. genitalium*; velik je le 580.000 bp s 482 kodirajočimi geni. Genom *M. hominis* je drugi najmanjši med bakterijami, ki se samostojno razmnožujejo, in sicer obsega 665.445 bp s 537 kodirajočimi sekvencami (angl. *coding DNA sequence*, CDS). Genom *U. parvum* je nekoliko večji, vsebuje 751.000 bp s 614 kodirajočimi geni. Primerjava genomov *M. hominis*, *M. genitalium* in *U. parvum* je pokazala, da imajo skupno 247 enakih genov, medtem ko je 220 CDS specifičnih za *M. hominis*, 172 za *M. genitalium* in 280 za *U. parvum* (7).

VIRULENČNI DEJAVNIKI IN PATOGENEZA

Sama patogeneza urogenitalnih mikoplazem še ni povsem pojasnjena. Poškodbe, ki jih mikoplazme povzročijo, so bolj ver-

jetno odraz imunskega in vnetnega odziva kot pa neposrednega toksičnega učinka mikoplazemskih celičnih sestavin (8). Znano je namreč, da mikoplazme sodelujejo s komponentami imunskega sistema, kar vodi do aktivacije makrofagov in monocitov ter tvorbe citokinov, predvsem α -TNF, IL-1, IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, IL-16 in γ -IFN. Lahko delujejo kot superantigen, kar poveča imunski odziv (9).

Večina mikoplazemskih okužb je omejena na površino sluznice urogenitalnega trakta, kjer so v tesnem stiku vezane na gostiteljske epiteljske celice, od katerih pridobijo pomembna hranila. Zato so adhezijske molekule tudi glavni virulenčni dejavniki mikoplazem (1).

M. hominis se pritrja na receptorje gostiteljske celice s površinskim lipoproteinom Vaa (angl. *variable adherence-associ-*

ated antigen), ki je zelo imunogen. Poleg te beljakovine pa ji služijo za pritrjanje še beljakovine P50, P60 in OppA (10). Na gostiteljske celice deluje toksično tudi amoniak, ki nastane v metabolnih procesih arginina. Ureaplazme se pritrjajo na gostiteljske celice s citoaderenčnimi beljakovinami MBA (angl. *multiple-banded antigen*) in prav tako lahko vzbudijo vnetni odziv (3). Z njimi se ureaplazme vežejo na epiteljske celice sečnice, na spermije, fibroblaste ter eritrocite gostitelja. Ureaplazme tvorijo tudi proteaze IgA in hidrolizirajo ureo v amoniak, kar vpliva toksično na gostiteljevo tkivo. Poleg tega so dokazali tudi aktivnost ureaplazemske fosfolipaze A in C, ki inducirata razpad membranskih fosfolipidov in sintezo gostiteljevih citokinov (4, 11).

Pomembni virulenčni dejavniki *M. genitalium* so adhezijske beljakovine MgPa, ki skupaj s P32 tvorijo terminalni organel na specializirani pritrjevalni konici. Z njimi se mikoplazma veže na receptorje epiteljske celice urogenitalnega trakta, lahko se veže tudi na eritrocite. Adhezinske beljakovine so imunogene in variabilne, kar omogoča izogibanje imunskemu sistemu in vpliva na trajnost okužbe (12). Na virulenčnost bakterije vpliva tudi njena sposobnost vstopanja v epiteljske celice in s tem znotrajcelično parazitiranje (13).

EPIDEMIOLOGIJA

Glede patogene vloge urogenitalnih mikoplazem ostaja kar nekaj odprtih vprašanj. Pogosto so namreč navzoče v spodnjem urogenitalnem traktu zdravih oseb, zato so bile in so še vedno predmet številnih raziskav. Na kolonizacijo z mikoplazmami vpliva starost bolnika, število spolnih partnerjev, hormonalne spremembe in socialno-ekonomski status. Običajno je pogostejša pri ženskah, posebno v času nosečnosti (14). Iz kužnin zdravih oseb ne izoliramo *M. genitalium*, medtem ko *M. hominis* izoliramo v manj kot 10 % (15).

Podatki kažejo, da je lahko z ureaplazmami v spodnjih genitalnih poteh koloniziranih od 40 do 80 % zdravih odraslih žensk. Nasprotno pa so pri moških asimptomatske okužbe z ureaplazmami redkejše (20–29 %) (16). V povišanih koncentracijah, nad 10^5 CCU/ml, jih dokažemo pri moških z uretritisom (17).

V zadnjih letih smo z molekularnimi diagnostičnimi metodami spoznali večji klinični pomen urogenitalnih mikoplazem pri urogenitalnih infekcijah nosečnic in novorojenčkov. Vedno več je namreč dokazov o povezavi mikoplazemske oz. ureaplazemske okužbe s horioamnionitisom, splavom, prezgodnjim porodom, poporodnim endometritisom in neplodnostjo. Pri novorojenčkih lahko taka okužba povzroči pljučnico, bakteriemijo in meningitis (tabela 2) (3, 18, 19). Prenos okužbe od okužene matere na otroka je lahko vertikalni in utero ali med porodom. Ugotovili so, da je kolonizacija respiratornega trakta z ureaplazmo pri prezgodaj rojenih otrocih z nizko porodno težo pogostejše povezana z razvojem pljučnice kot pri donošenih otrocih (20). Poleg tega domnevajo, da naj bi bila *U. urealyticum* vpletena v težje klinične slike kot *U. parvum* (14).

Bakterijo *M. hominis* se pogosteje omenja kot vzrok genitalnih infekcij pri ženskah, ne pa pri moških. Kolonizacija s to bakterijo je večkrat dokazana pri bolnicah z bakterijsko vaginozo, a je njen prispevek k patološkim procesom še vedno neznan. Ve pa se, da visoka koncentracija *M. hominis* v teh pogojih lahko vodi do invazije v zgornji genitalni trakt (15). Zanimivo je tudi medsebojno sodelovanje *M. hominis* s *Trichomonas vaginalis*. V tej biološki združbi lahko *M. hominis* parazitira celo znotraj trihomonasa, ki tako deluje kot »trojanski konj« za prenos mikoplazemske infekcije do gostitelja (21).

V urogenitalnem traktu parazitira tudi *M. genitalium*, ki je bila prvič izolirana leta 1981 iz brisa uretre bolnika z

uretritisom. Po morfologiji pritrjevalnega organela, antigeni strukturi, polzečem gibanju in sposobnosti vdora v epiteljske celice je podobna *M.pneumoniae*. Je pomembna povzročiteljica negonokoknega uretritisa pri moških in cervicitisa pri ženskah (1, 22). Epidemiološke raziskave kažejo, da je prevalenca okužb pri moških in ženskah, ki obiščejo ambulante za spolno prenosljive bolezni, med 3 in 13 %. Zadnje raziskave kažejo, da so okužbe z *M. genitalium* pogostejše pri homoseksualnih moških, posebno pri bolnikih z okužbo s HIV (13). Ker *M. genitalium* povzroča tudi kronične okužbe, to lahko vpliva na povečan imunski odziv za druge povzročitelje spolno prenosljivih okužb (23).

Urogenitalne mikoplazme redko povzročajo okužbe izven urogenitalnega trakta pri odraslih imunsko zmožnih osebah. Razsejane mikoplazemske in uroplazemske okužbe so poznane predvsem pri bolnikih s hipogamaglobulinemijo (24). Opisani so primeri septičnega artritisa, povzročenega z *U. urealyticum*, pri bolnikih s hipogamaglobulinemijo, pri bolnikih z drugimi pomankljivostmi limfocitov B ali po transplantaciji ledvic, limfomu (25). V zadnjem času se posveča več pozornosti raz-

iskavam o vplivu *U. urealyticum* na patogenezo revmatoidnega artritisa (24). Tudi *M. hominis* se lahko hematogeno razširi in povzroči izvengeneralne infekcije, kot so septični artritis, sepsa, retroperitonealni absces, peritonitis, hematoma, vaskularne in s katetrom povezane okužbe, endokarditis, okužbe po operacijskih posegih, možganski abscesi in pljučnica (15).

Izvengeneralne okužbe z *M. hominis* so pogosteje prepoznane kot ureaplazemske, ker lahko njihove zelo drobne kolonije opazimo tudi po podaljšanji inkubaciji na običajnih bakterioloških gojiščih, medtem ko ureaplazme dokažemo le s specializiranimi diagnostičnimi tehnikami (11).

Pogojno patogena vrsta je tudi *M. fermentans*, ki je bila dokazana v urogenitalnem traktu pri imunsko zmožnih in imunsko oslabljenih bolnikih in pri bolnikih z revmatoidnim artritisa (15, 26). Prav tako še ni pojasnjena patogena vloga *M. penetrans* in *M. pirum*, ki so ju izolirali iz urinskih vzorcev bolnikov z aidsom (27).

MIKROBIOLOŠKA DIAGNOSTIKA

Laboratorijska diagnostika mikoplazemskih okužb temelji na izolaciji in molekularni diagnostiki. Običajna bakteriološka

Tabela 2. Bolezni, ki jih povzročajo urogenitalne mikoplazme (1, 9, 13).

Bolezen	<i>Ureaplasma</i> spp.	<i>M. hominis</i>	<i>M. genitalium</i>
uretritis pri moških	+	-	+
pielonefritis	-	+	-
bakterijska vaginoza	-	+	-
cervicitis	-	-	+
vnetje v mali medenici	-	+	+
horioamnionitis	+	-	-
spontani splav	+	-	-
prezgodnji porod/nizka porodna teža	+	-	-
neonatalna respiratorna bolezen/meningitis	+	+	-
poporodna vročica	+	+	-
izvengeneralne okužbe (vključno artritis)	+	+	+

gojišča niso primerna za rast urogenitalnih mikoplazem, pač pa *M. hominis* in ureaplazme gojimo na posebnih obogatenih tekočih in trdnih gojiščih A7 oz. A8. Kolonije mikoplazem zrastejo na trdnem gojišču v 24–48 urah in so velike 200–400 µm, medtem ko ureaplazme tvorijo manjše kolonije, velike le 15–60 µm (17). Opazujemo jih s stereomikroskopom.

Na tržišču je na voljo več diagnostičnih presejalnih testov, ki omogočajo identifikacijo *M. hominis* in ureaplazme v 24–48 urah, in sicer če so v kužnini v koncentraciji $\geq 10^5$ CCU/ml. Prav tako nam ti testi omogočajo ugotavljanje občutljivosti izolirane bakterije za antibiotike iz skupin makrolidov, linkozamidov, streptograminov, tetraciklinov in fluorokinolonov glede na smernice, ki jih je leta 2012 pripravila in objavila mednarodna organizacija Clinical and Laboratory Standards Institute (28).

Hitrejša in občutljivejša metoda za diagnosticiranje mikoplazemskih okužb je metoda verižne reakcije s polimerazo (angl. *polymerase chain reaction*, PCR). Ker pa so ureaplazme in *M. hominis* pogosti komenzali v spodnjem urogenitalnem traktu zdravih ljudi, je vrednotenje pozitivnega rezultata PCR iz kužnin, dobljenih iz tega področja, težje. Rezultat se zato običajno obravnava v skladu s klinično sliko bolnika. Če pa je koncentracija *M. hominis* $\geq 10^4$ CFU/ml, ima tak rezultat diagnostičen pomen za urogenitalno infekcijo pri ženskah prav tako kot izolacija ureaplazme oz. pozitiven test PCR iz brisa sečnice pri moškem z uretritisom (29). Xiao s sodelavci je obravnaval 1061 kliničnih izolatov ureaplazem različnih populacij bolnikov in ugotovil, podobno kot drugi raziskovalci, da *U. urealyticum* povzroča uretritis pri moških, medtem ko tega ni dokazal za *U. parvum* (30). Dokaz urogenitalne mikoplazme z metodo izolacije ali s PCR iz aspirata traheje pri novorojencu z respiratorno stisko ali iz primarno sterilnih kužnin oz.

iz kužnin izvengentalnega trakta je seveda pomemben diagnostičen podatek (29).

Okužbe z *M. genitalium* dokazujemo le z molekularnimi testi, saj bakterijo zelo težko osamimo iz bolnikove kužnine. Priporoča se, da se za dokaz okužbe z *M. genitalium* testira moške z negonokoknim uretritisom, epidimitisom, prostatitisom in reaktivnim artritisom. Prav tako se priporoča testiranje pacientke s pelvično bolečino, cervicitisom ali endometritisom (31). Primerne kužnine so prvi curek urina pri moških, bris sečnice, medtem ko je pri ženskah primernejša kužnina bris cerviksa (22).

Serološki testi niso primerni za diagnosticiranje urogenitalnih mikoplazem.

PRIKAZ PRIMERA IZVENGENITALNE OKUŽBE Z MYCOPLASMA HOMINIS PRI ODRASEM BOLNIKU

V Univerzitetnem kliničnem centru Maribor smo v obdobju od januarja 2011 do maja 2014 obravnavali 5 imunsko zmožnih bolnikov z dokazano izvengentalno okužbo z bakterijo *M. hominis* (tabela 3). Bakterijo *M. hominis* smo nepričakovano osamili na običajnem krvnem agarju po 48–72 h inkubacije v anaerobnih pogojih in v atmosferi s CO₂, kjer je zrasla v zelo drobnih kolonijah. Bakterija se po Gramu ni obarvala, zato smo identifikacijo izvedli z molekularnim testom in določili občutljivost za antibiotike na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo v Ljubljani.

Prikaz primera aortitisa in mediastinitisa po kardiokirurškem posegu zaradi okužbe z bakterijo *Mycoplasma hominis*

Pri bolniku, starem 63 let, ki se je zdravil zaradi srčnega popuščanja ob aortni stenozni, anevrizmi ascendentne aorte in arterijski hipertenziji, je bila načrtno izvedena zamenjava ascendentnega dela prsne aor-

Tabela 3. Pregled bolnikov, ki so bili zdravljeni v Univerzitetnem kliničnem centru Maribor zaradi izvengentialne okužbe z bakterijo *Mycoplasma hominis* v obdobju od januarja 2011 do maja 2014.

Spol	Starost	Bakterija	Vrsta kužnine	Diagnoza	Pridružena obolenja	Izkustvena antibiotična terapija	Usmerjena terapija	izid zdravljenja
M	67 let	<i>Mycoplasma hominis</i>	mediastinum, hemokulture, bris sternotomijske rane	septični šok z večorgansko odpovedjo ob mediastinitisu (po obvodni operaciji na srcu)	miokardni infarkt, trožilna koronarna bolezen srca, insuficienca mitralne zaklopke	ceftazidim + vankomicin, nato meropenem	azitromicin, nato ciprofloksacin	Smrt
M	63 let	<i>Mycoplasma hominis</i>	hemokulture, bris mediastinuma, tkivni vzorci mediastinuma	sepsa ob mediastinitisu in aortitisu po operaciji na srcu z vstavitvijo	huda aortna stenoza in anevrizma ascendente aorte - operacija menjave aortne zaklopke in dela ascendente aorte	imipenem/cilastatin + vankomicin	doksiciklin + levofloksacin	Preživel
Ž	46 let	<i>Mycoplasma hominis, candida glabrata</i>	bris laparatomijske rane, vsebina intraabdominalnega drena	septični šok z večorgansko odpovedjo ob ishemijski tankega črevesja in benignem ginekološkem tumorju	novoodkrita AF s tahikardnim odgovorom prekotov	imipenem/cilastatin + azitromicin, nato dodatno vankomicin, piperacilin/tazobaktam, kasprofungin	azitromicin	Smrt
Ž	41 let	<i>Mycoplasma hominis</i>	bris abscesa ob vnetju kirurške rane po carskem rezu	vnetje kirurške rane po carskem rezu	zdrava	cefuroksim + klindamicin	nič*	Preživela
M	51 let	<i>Mycoplasma hominis</i>	Bris operativne rane na vratu	okužba kirurške rane po operaciji karcinoma hipofarinksa	zdrav	amoksicilin/klavulanska k., nato ciprofloksacin	nič*	Preživel

* Izkustvena terapija ni bila spremenjena, saj je že vključevala antibiotik, učinkovit proti bakteriji *M. hominis*.

te in vstavljena biološka aortna zaklopka ter opravljena tudi revaskularizacija miokarda. Petnajsti postoperativni dan je prišlo do zapleta – tamponade osrčnika, ki je terjal ponovni kirurški poseg. Bolnik je bil ves čas po kirurškem posegu zdravljen v enoti intenzivne terapije (EIT). Že dan pred ponovnim kirurškim posegom (14. postoperativni dan) so v EIT ugotavljali visoke kazalce vnetja (CRP 277 mg/l, L $14,9 \times 10^9/l$) in postavili diagnozo sepse ob okužbi kirurške rane na prsnem košu. Ob znani kolonizaciji z beta laktamazami razširjenega spektra (angl. *extended-spectrum beta-lactamase*, ESBL) *Enterobacter* spp. v blatu je bolnik takoj po odvzemu kužnin prejel izkustveno antibiotično terapijo z imipenemom/cilastatinom in vankomicinom. V naslednjih štirih dneh se klinično stanje bolnika kljub uvedeni terapiji ni bistveno izboljšalo. Glede na klinično sliko in slikovno diagnostiko je šlo za globoko okužbo kirurške rane z mediastinitisom. Opravili so ponoven kirurški poseg v prsnem košu z nekrektomijo in spiranjem medistinum, kar je bilo potrebno v naslednjih treh tednih zdravljenja še nekajkrat ponoviti. Zaradi okužbe je bila rana na prsnem košu zdravljena s pomočjo pripomočka z negativnim tlakom (Vista®) ter rednim izpiranjem prsne votline s fiziološko raztopino in dodatkom gentamicina. Kljub izkustveni dvotirni širokospektralni antibiotični terapiji (imipenem/cilastatin + vankomicin) v visokih odmerkih in skrbni kirurški oskrbi globoke okužbe prsnega koša pa se klinično stanje tudi v nadaljnjih sedmih dneh ni izboljševalo. Kazalci vnetja so ostajali vztrajno povišani (CRP > 150 mg/l, prisotna je bila tudi levkocitoza). Dodatne diagnostične preiskave (slikovna diagnostika CT, UZ srca) so izključile zaplet okužbe v smislu abscesa oziroma endokarditisa. Vse odvzete kužnine do 12. dne niso pojasnile vzroka za vztrajanje okužbe. Iz hemokultur in iz večih tkivnih vzorcev, odvzetih intraopera-

tivno v prsni votlini, so zrasle bakterije v zelo drobnih kolonijah na običajnem krvnem agarju po 48–72 h inkubacije v anaerobnih pogojih in v atmosferi CO₂. Ker se niso barvale po Gramu, je bila identifikacija izvedena z molekularnim testom, ki je potrdil okužbo z *M. hominis*. Bakterijo smo nato osamili še na specializiranem mikoplazemskem gojišču A8 in določili občutljivost za antibiotike (ELITech MICROBIO, Francija). Ob sumu na okužbo z *M. hominis* in ob odsotnosti drugih bakterij v odvzetih kužninah smo uknili terapijo z imipenemom/cilastatinom in namesto tega uvedli dvotirno terapijo z levofloksacinom 500 mg na 12h parenteralno ter doksicilinom 100 mg na 12 h per os (oz. sprva tigeciklin). Prehodno smo do končne identifikacije bakterije v terapiji pustili še vankomicin, nato pa ga ob potrjeni diagnozi okužbe z *M. hominis* uknili štiri dni kasneje. Glede na klinično sliko in dejstvo, da je imel bolnik implantat v predelu ascendentne aorte z okoliškim vnetjem, smo postavili diagnozo mediastinitisa in aortitisa na umetnem materialu, povzročenegega z bakterijo *M. hominis*.

Ob izboljšanju stanja je bil po 32 dneh bivanja v EIT premeščen na Oddelek za kardiokirurgijo, kjer je nadaljeval z antibiotičnim zdravljenjem peroralno.

Klinični znaki vnetja lokalno so se izboljšali, rana na prsnici se je postopoma zaprla. Kazalci vnetja so upadli. Po treh mesecih in pol je bil bolnik odpuščen iz bolnišnice. Nadaljeval je s peroralnim zdravljenjem z levofloksacinom in doksiciklinom, predvideno je bilo vsaj 12-mesečno antibiotično zdravljenje. Ob zadnji kontroli po 12 mesecih je bil klinično brez težav, zaključil je antibiotično terapijo. Slikovno diagnostika (CT angiografija) ni prikazala posebnosti v predelu vsadka.

V dostopni literaturi je opisan le en primer bolnika z okužbo aortnega vsadka po operaciji na ascendentni aorti (32). Etiološka diagnostika je pogosto pozna, saj

teh bakterij z običajnimi mikrobiološkimi metodami ne odkrijemo, zato je izjemno pomembno sodelovanje med mikrobiologom, infektologom oziroma lečečim zdravnikom.

ZAKLJUČEK

Mikoplazme in ureaplazme so še vedno predmet številnih raziskav, posebno glede njihove vloge pri infekcijah urogeni-

talnega trakta. Kljub temu da so pogosto navzoče v spodnjem urogenitalnem traktu zdravih oseb, lahko povzročijo lokalizirane okužbe s klinično sliko in kronična vnetja. V izvengitalnih kužninah jo redkokdaj iščemo, zato so verjetno okužbe z njimi izven genitalnega trakta podcenjene. Razvoj molekularnih metod je izboljšal in omogočil mikrobiološko diagnostiko teh posebnih bakterij.

LITERATURA

1. Waites KB, Katz B, Schelonka RL. Mycoplasmas and ureaplasmas as neonatal pathogens. *Clin Microbiol Rev.* 2005; 18 (4): 757-89.
2. Ling CL, Oravcova K, Beattie TF, et al. Tools for detection of *Mycoplasma amphoriforme*: a primary respiratory pathogen? *J Clin Microbiol.* 2014; 52 (4): 1177-81.
3. Waites KB, Schelonka RL, Xiao L, et al. Congenital and opportunistic infections: *Ureaplasma* species and *Mycoplasma hominis*. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2009; 14 (4): 190-9.
4. Kallapur SG, Kramer BW, Jobe AH. *Ureaplasma* and BPD. *Semin Perinatol.* 2013; 37 (2): 94-101.
5. Razin S, Hayflick L. Highlights of mycoplasma research--an historical perspective. *Biologicals.* 2010; 38 (2): 183-90.
6. Pollack DJ. *Ureaplasma urealyticum*: an opportunity for combinatorial genomics. 2001. *Trends Microbiol* 2001; 9 (4): 169-75.
7. Pereyre S, Sirand-Pugnet P, Beven L, et al. Life on arginine for *Mycoplasma hominis*: clues from its minimal genome and comparison with other human urogenital mycoplasmas. *PLoS Genet.* 2009; 5 (10): e1000677.
8. Redelinghuys MJ, Ehlers MM, Dreyer AW, et al. Antimicrobial susceptibility patterns of *Ureaplasma* species and *Mycoplasma hominis* in pregnant women. *BMC Infect Dis.* 2014; 14: 171. doi: 10.1186/1471-2334-14-171.
9. Taylor-Robinson D, Lamont RF. Mycoplasmas in pregnancy. *BJOG.* 2011; 118 (2): 164-74.
10. Hopfe M, Deenen R, Degrandi D, et al. Host cell responses to persistent mycoplasmas--different stages in infection of HeLa cells with *Mycoplasma hominis*. *PLoS One.* 2013; 8 (1): e54219.
11. Citti C, Blanchard A. Mycoplasmas and their host: emerging and re-emerging minimal pathogens. *Trends Microbiol.* 2013; 21 (4): 196-203.
12. Sethi S, Singh G, Samanta P, et al. *Mycoplasma genitalium*: an emerging sexually transmitted pathogen. *Indian J Med Res.* 2012; 136 (6): 942-55.
13. Cazanave C, Manhart LE, Bébéar C. *Mycoplasma genitalium*, an emerging sexually transmitted pathogen. *Med Mal Infect.* 2012; 42 (9): 381-92.
14. Jones JA, Chaban N, May M. Global Rates and Prevalence of Urogenital Mycoplasmosis: Assembly of a Dataset from Peer-Reviewed Literature. *Open J Med Microbiol.* 2013; 3: 105-24. doi: 10.4236/ojmm. 2013.32017.
15. Bébéar C, Bébéar CM, Dupon M. *Mycoplasma* species (*M. hominis*, *M. genitalium*, *M. fermentans*). In: Yu VL, Weber R, Raoult D, eds. *Antimicrobial therapy and vaccines*, 2nd ed. Vol 1 Microbes. New York: Apple Tree Productions, LLC; 2002. p. 955-61.
16. Song T, Ye A, Xie X, et al. Epidemiological investigation and antimicrobial susceptibility analysis of ureaplasma species and *Mycoplasma hominis* in outpatients with genital manifestations. *Clin Pathol* 2014; 67 (9): 817-820 doi:10.1136/jclinpath-2014-202248.
17. Hartmann M. Genital mycoplasmas. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2009; 7: 371-7.
18. Capoccia R, Greub G, Baud D. *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis* and adverse pregnancy outcomes. *Curr Opin Infect Dis.* 2013; 26 (3): 231-40.
19. Viscardi RM. *Ureaplasma* species: role in neonatal morbidities and outcomes. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2014; 99 (1): F87-92.

20. Gwee A, Curtis N. *Ureaplasma*--Are you sitting comfortably? J Infect. 2014; 68: S19–23.
21. Vancini RG, Benchimol M. Entry and intracellular location of *Mycoplasma hominis* in *Trichomonas vaginalis*. Arch Microbiol. 2008; 189 (1): 7–18.
22. Jensen JS. *Mycoplasma genitalium* infections. Diagnosis, clinical aspects, and pathogenesis. Dan Med Bull. 2006; 53 (1): 1–27.
23. Horner P, Blee K, Adams E. Time to manage *Mycoplasma genitalium* as an STI: but not with azithromycin 1g! Curr Opin Infect Dis. 2014; 27 (1): 68–74.
24. Fu M, Chen LH, Xia G, et al. Effects of *Ureaplasma urealyticum* lipid-associated membrane proteins on rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. J Int Med Res. 2013; 41(5): 1655–70.
25. Balsat M, Galicier L, Wargnier A, et al. Diagnosis of *Ureaplasma urealyticum* Septic Polyarthritits by PCR Assay and Electrospray Ionization Mass Spectrometry in a Patient with Acute Lymphoblastic Leukemia. J Clin Microbiol. 2014; 52 (9): 3456–8.
26. Rechnitzer H, Brzuszkiewicz E, Strittmatter A, et al. Genomic features and insights into the biology of *Mycoplasma fermentans*. Microbiology. 2011; 157(3): 760–73.
27. Wu JR, Wang B, Chen LS, et al. Alarming incidence of genital mycoplasmas among HIV-1-infected MSM in Jiangsu, China. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2014; 33 (2): 189–95.
28. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2012. Methods for antimicrobial susceptibility testing for human mycoplasmas. Approved Guideline M43-A. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
29. Waites KB, Xiao L, Paralanov V, et al. Molecular methods for the detection of *Mycoplasma* and *Ureaplasma* infections in humans: a paper from the 2011 William Beaumont Hospital Symposium on molecular pathology. J Mol Diagn. 2012; 14 (5): 437–50.
30. Xiao L, Paralanov V, Glass JI, et al. Extensive horizontal gene transfer in ureaplasmas from humans questions the utility of serotyping for diagnostic purposes. J Clin Microbiol. 2011; 49 (8): 2818–26.
31. Ross JD, Jensen JS. *Mycoplasma genitalium* as a sexually transmitted infection: implications for screening, testing, and treatment. Sex Transm Infect. 2006; 82 (4): 269–71.
32. Myers PD, Khabiri E, Greub G, et al. *Mycoplasma hominis* mediastinitis after acute aortic dissection repair. Interact Cardiovasc Thorac Surg 2010; 11: 857–8.

Maruška Marovt¹, Darja Keše², Tadeja Kotar³, Nina Kmet³, Mojca Matičič³

Kliničen pomen ureaplazem pri osebah z okužbo spodnjega urogenitalnega trakta: rezultati slovenske raziskave

Clinical Role of Ureaplasmas in Persons with Lower Urogenital Tract Infection: the Results of the Slovenian Study

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: ureaplazme, *Ureaplasma parvum*, *Ureaplasma urealyticum*

Spolno prenosljive okužbe (SPO) so okužbe, ki se primarno prenašajo s spolnim stikom. Pogosti simptomi in znaki prizadetosti urogenitalnega trakta so izcedek iz spolovil s pridruženim pekočim mokrenjem ali brez njega ter razjeda na spolovilu, vendar večina SPO poteka brezsimptomno. Med mikrobi, katerih dokončna vloga spolno prenosljivega patogena še ni povsem pojasnjena, so tudi ureaplazme (*Ureaplasma* spp.). Prisotne so na sluznici urogenitalnega trakta moških in žensk. Leta 2002 so 14 serovarov na podlagi fenotipskih in genotipskih značilnosti razdelili v dve ločeni vrsti, *Ureaplasma parvum* in *Ureaplasma urealyticum*. V preteklih letih so se diagnostične metode za dokaz ureaplazem zaradi razvoja učinkovitih molekularnih tehnik zelo izboljšale. S pomočjo metode verižne reakcije s polimerazo lahko danes iz vzorcev brisa sečnice in materničnega vratu ločeno odkrijemo in razpoznamo bakteriji *U. parvum* in *U. urealyticum*. Namen našega prispevka je pregledati epidemiološke in mikrobiološke značilnosti, diagnostične metode ter klinično vlogo novo diferenciranih bakterij *U. parvum* in *U. urealyticum* pri osebah z okužbo spodnjega urogenitalnega trakta ter predstaviti rezultate slovenske raziskave.

ABSTRACT

KEY WORDS: ureaplasmas, *Ureaplasma parvum*, *Ureaplasma urealyticum*

Sexually transmitted infections are primarily transmitted by sexual risk behaviour. The most common clinical signs and symptoms are urogenital discharge with or without disuria and genital ulcer, however, the vast majority is present with no symptoms. Ure-

¹ Maruška Marovt, dr. med., Oddelek za kožne in spolne bolezni, Univerzitetni klinični center Maribor, Ljubljanska ulica 5, 2000 Maribor

² Doc. dr. Darja Keše, univ. dipl. biol., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

³ Asist. mag. Tadeja Kotar, dr. med., Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Japljeva ulica 2, 1525 Ljubljana

⁴ Asist. Nina Kmet, dr. med., Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Japljeva ulica 2, 1525 Ljubljana

⁵ Izr. prof. dr. Mojca Matičič, dr. med., Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Japljeva ulica 2, 1525 Ljubljana; mojca.maticic@kclj.si

aplazmas (*Ureaplasma* spp.) belong to the group of sexually transmitted microbes whose role in the pathogenicity of sexually transmitted infections has not yet been established. They are known to invade male and female urogenital mucosa. In 2002, 14 known ureaplasma serovars have been divided into two species based on phenotypic and genotypic characteristics, *Ureaplasma parvum* and *Ureaplasma urealyticum*. In the past few years, molecular diagnostic methods have improved dramatically and polymerase chain reaction helps us to detect and distinguish between *U. parvum* and *U. urealyticum* from urethral and cervical swabs. The paper focuses on the epidemiological and microbiological characteristics, diagnostic methods and clinical role of newly differentiated *U. parvum* and *U. urealyticum* from lower urogenital tract of infected persons and presents the results of the Slovene study.

UVOD

Spolno prenosljive okužbe (SPO) so okužbe, ki se primarno prenašajo s spolnim stikom. Vsak dan se okuži več kot milijon ljudi (1). Pogosti simptomi in znaki prizadetosti urogenitalnega trakta so izcedek iz spolovil s pridruženim pekočim mokrenjem ali brez njega ter razjeda na spolovilu, vendar večina SPO poteka brezsimptomno. Neodkrite ali nezdravljene SPO lahko vodijo v resne posledice, ki nastanejo bodisi zaradi kronične neprepoznane okužbe ali zaradi prenosa okužbe z matere na plod oz. novorojenca (1). Med mikrobi, katerih dokončna vloga spolno prenosljivega patogena še ni povsem pojasnjena, so tudi ureaplazme (*Ureaplasma* spp.).

Ureaplazme so prisotne na sluznici urogenitalnega trakta moških in žensk. Leta 2002 so 14 serovarov na podlagi fenotipskih in genotipskih značilnosti razdelili v dve ločeni vrsti, *Ureaplasma parvum* in *Ureaplasma urealyticum* (2). S pomočjo metode verižne reakcije s polimerazo (angl. *polymerase chain reaction*, PCR) lahko danes iz vzorcev brisa sečnice in materničnega vratu ločeno odkrijemo in razpoznamo bakteriji *U. parvum* in *U. urealyticum*.

Nedavno opravljene raziskave govorijo v prid dejstvu, da *U. urealyticum* povzroča uretritis pri moških, *U. parvum* pa je komezal sluznice moške sečnice. Zaradi

pomanjkanja ustreznih raziskav pa je klinična vloga bakterij *U. urealyticum* in *U. parvum* na sluznici spodnjega urogenitalnega trakta žensk še dokaj nejasna.

MIKROBIOLOŠKE ZNAČILNOSTI UREAPLAZEM

Ureaplazme je prvi odkril Shepard leta 1954 v vzorcih urogenitalnega trakta moških (3). Sodijo v razred *Mollicutes*, ki vsebuje štiri rede, pet družin, osem rodov in več kot 200 različnih vrst; te najdemo pri ljudeh, vretenčarjih, členonožcih in rastlinah (4). Za vsaj 17 vrst smo ljudje prvotni gostitelj. Izoliramo jih prvotno na sluznici respiratornega in urogenitalnega trakta. Pet vrst iz razreda *Mollicutes* je znanih patogenov, to so *Mycoplasma pneumoniae*, ki je patogen dihalne sluznice, preostali štiri je, *U. parvum*, *U. urealyticum*, *Mycoplasma hominis* in *Mycoplasma genitalium*, pa so urogenitalni patogeni (5). *U. parvum* vsebuje serovare 1, 3, 6 in 14, *U. urealyticum* pa preostale serovare (2). Ureaplazme so izjemno majhne prokariotske celice brez celične stene, zaradi česar so neobčutljive na delovanje beta-laktamskih protimikrobnih zdravil in se ne barvajo po Gramu (6). So okrogle ali kokobacilarne oblike premera 0,1 do 1 μm (2). Kolonije ureaplazem imajo premer od 15 do 60 μm (6). So edini prokarioti, ki za rast nujno potrebujejo sečnino, skoraj celotna sinteza

ATP pa je posledica hidrolize sečnine (7). *U. parvum* je tretja izmed mikoplazem, ki je bila v celoti sekvenirana in ima za bakterijo *M. genitalium* najmanjši sekveniran prokariontski genom. *U. parvum* vključuje serovare z majhno velikostjo genoma (0,75–0,76 megabaznih parov (Mbp), medtem ko *U. urealyticum* vključuje serovare z večjo velikostjo genoma (0,88–1,2 Mbp) (7). Na virulenčnost najverjetneje vpliva pet proteinov, in sicer: ureaza, proteaza, immunoglobulin A (IgA), fosfolipazi A in C ter antigen s številnimi pasovi (angl. *multiple banded antigen*, MBA) (7).

DIAGNOSTIČNE METODE ZA DOKAZ UREAPLAZEM

V preteklih letih so se diagnostične metode za dokaz ureaplazem zaradi razvoja učinkovitih molekularnih tehnik močno izboljšale. Zaradi relativno hitre rasti ureaplazem v kulturi jih lahko razpoznamo po dveh do štirih dneh, vendar z metodo kulture ni mogoče ločiti med posameznima vrstama (6). S pomočjo molekularnih metod (npr. PCR) lahko dokažemo in identificiramo *U. parvum* in *U. urealyticum* ločeno. Kot tarčne sekvence se najpogosteje uporabljajo gen 16S rRNA, medgenska regija 16S rRNA do 23S rRNA, gen za ureazoin gen *mba* (8). Metoda PCR je občutljivejša v primerjavi s kulturo, vendar je slednja bolj ekonomična in praktična za dokaz ureaplazem v laboratorijih z manjšim številom vzorcev (8).

EPIDEMIOLOŠKE ZNAČILNOSTI UREAPLAZEM

Ureaplazme se prenašajo s tveganimi spolnimi odnosi z okuženo osebo in z matero na otroka (9). Naseljujejo urogenitalno sluznico desetine spolno aktivnih moških in več kot polovice spolno aktivnih žensk (9). Ureaplazme lahko dokažemo iz vzorcev brisov materničnega vratu in nožnice od 40 do 80 % spolno zrelih brezsimptomnih žensk (10). Kolonizacija je

pogostejša pri mlajših ženskah, ženskah z nižjim socialnoekonomskim statusom, s številnimi spolnimi partnerji, ženskah črne rase in tistih, ki prejemajo oralne kontraceptive (10). Najnovejše raziskave v populaciji domnevno zdravih žensk so dokazale prisotnost *U. parvum* pri 18–87 % in *U. urealyticum* pri 6–10 % (11–16).

KLINIČNA VLOGA UREAPLAZEM PRI ŽENSKAH

Številne raziskave so pokazale, da lahko ureaplazme povzročijo horioamnionitis ter pljučnico, bakteriemijo in meningitis pri novorojencih (4). Zaradi pomanjkanja epidemioloških in kliničnih raziskav je klinična vloga novo diferenciranih ureaplazem pri samih okuženih ženskah nejasna. Preliminarni rezultati najnovejše raziskave pa kažejo, da sta bili *U. parvum* in *U. urealyticum* prisotni v Douglassovem prostoru pri približno 60 % žensk, pri katerih so dokazali ureaplazme v vzorcih spodnjega urogenitalnega trakta (17). Cervikovaginalna kolonizacija torej lahko vodi v prehod ureaplazem v sterilni zgornji del reproduktivnega trakta žensk.

Raziskava McKechine in sod. ni pokazala statistično značilnih razlik v dokazu prisotnosti *U. parvum* in *U. urealyticum* bodisi pri simptomatskih bodisi pri brezsimptomnih Avstralkah (18). V hrvaški raziskavi prav tako niso dokazali statistično značilnih razlik med dokazom prisotnosti *U. parvum* in *U. urealyticum* ter pojavom kliničnih simptomov in znakov (19). Nasprotno pa so v raziskavi De Francese in sod. dokazali prisotnost serovara 3/14 bakterije *U. parvum* in bakterijo *U. urealyticum* statistično značilno pogostejše pri simptomatskih ženskah v primerjavi z brezsimptomnimi (20).

KLINIČNA VLOGA UREAPLAZEM PRI MOŠKIH

Klinično se uretritis pri moškem kaže z različnimi simptomi in znaki: izcedek iz

spolovila, pekoče in/ali pogosto mokrenje in/ali srbečica v končnem delu sečnice. Ločimo gonokokni uretritis, ki ga povzroča bakterija *Neisseria gonorrhoeae*, in negonokokni uretritis (NGU), pri katerem bakterije *N. gonorrhoeae* ne dokažemo. Pri moških je NGU najpogostejši klinični sindrom spodnjega urogenitalnega trakta. Najpogostejši povzročitelji so *Chlamydia trachomatis* (pri 15–40 %), *M. genitalium* (pri 15–25 %), *Trichomonas vaginalis* (pri 5–15 %), *U. urealyticum* (pri manj kot 15 %), virus herpesa simpleksa (angl. *herpes simplex virus*, HSV) (pri 2–3%), adenovirusi (pri 2–4 %) in *Haemophilus* spp. (redko) (21). Pri 20 do 40 % primerov vzrok NGU ostaja nepojasnen (21).

Raziskave, opravljene v 70-ih in 80-ih letih preteklega stoletja, so pokazale nasprotujoče si rezultate o povezavi NGU in ureaplazem. Nedavno je bilo opravljenih šest raziskav in pri vseh šestih je bila *U. parvum* pogosteje prisotna pri kontrolni skupini moških brez bolezenskih znakov kot pri tistih s kliničnimi simptomi in znaki, kar govori v prid dejstvu, da je *U. parvum* pri moških najverjetneje nepatogen komenzal sluznice sečnice (22–27).

Povlsen s sod. pa je dokazal statistično značilno pogostejšo prisotnost *U. urealyticum* pri bolnikih z NGU v primerjavi s kontrolami (18 % vs. 9 %; $p = 0,01$) (22), enako tudi Deguchi s sod. (16 % vs. 8 %; $p = 0,025$) (23). Couldwell s sod. je dokazal *U. urealyticum* pri 12,3 % bolnikov z NGU in pri 8,4 % kontrol, kar se izkaže kot statistično neznačilna povezava ($p = 0,158$), Ondondo s sod. pa pri 26 % bolnikov z NGU in pri 16 % kontrol (OR = 2,3 95 % CI 1,04 do 4,9) (24, 25). Wetmore s sod. je v raziskavi dokazala statistično mejno povezavo med NGU in bakterijo *U. urealyticum* (26). Nasprotujoč opisanim raziskavam pa raziskava Bradshawa s sod. ni pokazala povezave med NGU in prisotnostjo *U. urealyticum*, ki so jo dokazali le pri 13 % bolnikov z NGU in pri 18 % kontrol (27).

REZULTATI SLOVENSKE RAZISKAVE

Z našo raziskavo smo želeli opredeliti pogostost pojavljanja kliničnih simptomov in znakov, ki kažejo na okužbo spodnjega urogenitalnega trakta pri ženskah, pri katerih smo z metodo PCR opredelili ločeno vrsti *U. parvum* in/ali *U. urealyticum* in so predhodno že imele tam izolirano nedi-frencirano bakterijo *Ureaplasma* spp. Izključene so bile ženske z dokazano gonorejo, okužbo s HIV, anamnezo genitalnega herpesa in prejetjem antibiotika 14 dni pred odvzemom brisa. Uporabili smo vse vzorce brisov spolovil, ki so bili odvzeti v ambulantni za spolno prenosljive okužbe na Kliniki za infekcijske bolezni in vročinska stanja Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana v obdobju 2006–2012. Na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani je bila nato izvedena mikrobiološka diagnostika z metodo PCR (Seeplex® STD4D ACE Detection, Seegene, Korea). S pomočjo medicinske klinične dokumentacije smo zabeležili sociodemografske, klinične, in mikrobiološke značilnosti žensk z dokazano okužbo z novo klasificiranima bakterijama ter jih statistično obdelali.

Izmed 145 žensk, pri katerih smo s kulturo izolirali *Ureaplasma* spp., smo s PCR pri 129 (89 %) dokazali prisotnost *U. parvum*, pri 24 (16,6 %) *U. urealyticum* in pri 8 (5,5 %) obe bakteriji hkrati. Najpogostejše sočasne okužbe v vzorcih brisa materničnega vratu in sečnice žensk, vključenih v raziskavo, so bile sookužba *C. trachomatis* in *U. parvum* v 9,7 %, sookužba *M. hominis* in *U. parvum* v 6,2 % ter sookužba *U. urealyticum* in *U. parvum* v 5,5 %. *C. trachomatis* je bila statistično značilno povezana s sookužbo *U. urealyticum* in *U. parvum* ($p = 0,021$), mejno značilno povezana z *U. parvum* ($p = 0,063$), povezave z *U. urealyticum* pa nismo našli.

Med simptomatskimi ženskami smo *U. urealyticum* dokazali pri 14 in *U. par-*

vum pri 68 ženskah. Nismo dokazali statistično značilnih razlik med prisotnostjo *U. urealyticum* pri ženskah s simptomi okužbe spodnjega urogenitalnega trakta in ženskah brez simptomov (OR 1,38 (0,57; 3,34); $p = 0,478$). Prav tako nismo dokazali statistično značilnih razlik med prisotnostjo *U. parvum* pri simptomatskih in brezsimptomnih bolnicah (OR 1,4 (0,5; 4,1); $p = 0,500$).

Statistično značilne povezave med prisotnostjo kliničnih simptomov in prisotnostjo *U. urealyticum* ali *U. parvum* nismo našli. Ženske z različnimi kliničnimi simptomi so imele približno enake obete za prisotnost *U. urealyticum* ali *U. parvum* kot ženske brez kliničnih simptomov.

Statistično značilno več žensk, starih 25 let ali manj, je bilo okuženih z *U. urealyticum* v primerjavi z ženskami stariimi nad 25 let. Statistično značilno manjši delež žensk, starih 25 let ali manj, pa je bil okužen z *U. parvum* v primerjavi z ženska-

mi, stariimi nad 25 let. Gre za prvo raziskavo v svetu, v kateri so izčrpno predstavljene podatki o simptomih okužbe spodnjega urogenitalnega trakta pri ženskah z *U. parvum* in *U. urealyticum*. Rezultati naše raziskave o distribuciji *U. parvum* in *U. urealyticum* so konsistentni s predhodnimi raziskavami (20). Nismo dokazali morebitne povezave med *U. parvum* in *U. urealyticum* ter prisotnostjo ali odsotnostjo simptomov.

ZAKLJUČEK

Kljub razvoju novih diagnostičnih metod ureaplazme še vedno predstavljajo klinični in diagnostičen izziv, še posebej pri obravnavi ženske populacije. Potrebne so nove, široko zastavljene in kontrolirane raziskave, ki bodo razjasnile njihovo vlogo v klinični obravnavi in omogočile doslednejšo obravnavo v vsakodnevni klinični praksi oseb, ki obiskujejo ambulante za SPO.

LITERATURA

1. WHO. Sexually transmitted infections [internet]. Ženeva: World Health Organization; 2013 [citirano 2013 Nov 15]. Dosegljivo na: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs110/en/>
2. Robertson JA, Stemke GW, Davis JW, et al. Proposal of *Ureaplasma parvum* sp. nov. and emended description of *Ureaplasma urealyticum* (Shepard et al. 1974) Robertson et al. 2001. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2002; 52: 587-97.
3. Shepard MC. The recovery of pleuropneumonia-like organisms from Negro men with and without nongonococcal urethritis. *Am J Syph Gonorrhea Vener Dis.* 1954; 38: 113-24.
4. Waites KB, Katz B, Schelonka RL. Mycoplasmas and ureaplasmas as neonatal pathogens. *Clin Microbiol Rev.* 2005; 18: 757-89.
5. Paralanov V, Lu J, Duffy LB, et al. Comparative genome analysis of 19 *Ureaplasma urealyticum* and *Ureaplasma parvum* strains. *BMC Microbiol.* 2012; 12: 88.
6. Waites KB, Taylor-Robinson D. *Mycoplasma* and *Ureaplasma*. In: Versalovic J, ed. *Manual of Clinical Microbiology*. 10th ed. Washington DC: ASM Press; 2011. p. 970-85.
7. Glass JL, Lefkowitz EJ, Glass JS, et al. The complete sequence of the mucosal pathogen *Ureaplasma urealyticum*. *Nature.* 2000; 407: 757-62.
8. Waites KB, Xiao L, Paralanov V, et al. Molecular methods for the detection of *Mycoplasma* and *ureaplasma* infections in humans: a paper from the 2011 William Beaumont Hospital Symposium on molecular pathology. *J Mol Diagn.* 2012; 14: 437-50.
9. Ihan A, Avšič-Županc T. Mikoplazme. In: Gubina M, Ihan A, eds. *Medicinska bakterijologija z imunologijo in mikologijo*. Ljubljana: Medicinskizagledi; 2002. p. 329-32.
10. Cassell GH, Waites KB, Watson HL, et al. *Ureaplasma urealyticum* intrauterine infection: role in prematurity and disease in newborns. *Clin Microbiol Rev.* 1993; 6: 69-87.

11. McIver CJ, Rismanto N, Smith C, et al. Multiplex PCR testing detection of higher-than-expected rates of cervical mycoplasma, ureaplasma, and trichomonas and viral agent infections in sexually active australian women. *J Clin Microbiol.* 2009; 47: 1358–63.
12. Kong F, Ma Z, James G, et al. Species identification and subtyping of *Ureaplasma parvum* and *Ureaplasma urealyticum* using PCR-based assays. *J Clin Microbiol.* 2000; 38: 1175–9.
13. Kataoka S, Yamada T, Chou K, et al. Association between preterm birth and vaginal colonization by mycoplasmas in early pregnancy. *J Clin Microbiol.* 2006; 44: 51–5.
14. Yamazaki T, Matsumoto M, Matsuo J, et al. Frequency of *Chlamydia trachomatis* in *Ureaplasma*-positive healthy women attending their first prenatal visit in a community hospital in Sapporo, Japan. *BMC Infect Dis.* 2012; 12: 82.
15. Cao X, Wang Y, Hu X, et al. Real-time TaqMan polymerase chain reaction assays for quantitative detection and differentiation of *Ureaplasma urealyticum* and *Ureaplasma parvum*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2007; 57: 373–8.
16. Ekiel AM, Friedek DA, Romanik MK, et al. Occurrence of *Ureaplasma parvum* and *Ureaplasma urealyticum* in women with cervical dysplasia in Katowice, Poland. *J Korean Med Sci.* 2009; 24: 1177–81.
17. Urszula K, Joanna E, Marek E, et al. Colonization of the lower urogenital tract with *Ureaplasma parvum* can cause asymptomatic infection of the upper reproductive system in women: a preliminary study. *Arch Gynecol Obstet.* 2014; 289 (5): 1129–34.
18. McKechnie ML, Hillman RJ, Jones R, et al. The prevalence of urogenital micro-organisms detected by a multiplex PCR-reverse line blot assay in women attending three sexual health clinics in Sydney, Australia. *J Med Microbiol.* 2011; 60: 1010–6.
19. Hunjak B, Sabol I, Vojnovic G, et al. *Ureaplasma urealyticum* and *Ureaplasma parvum* in women of reproductive age. *Arch Gynecol Obstet.* 2014; 289: 407–12.
20. De Francesco MA, Negrini R, Pinsi G, et al. Detection of *Ureaplasma* biovars and polymerase chain reaction-based subtyping of *Ureaplasma parvum* in women with or without symptoms of genital infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2009; 28: 641–6.
21. Martin DH. Urethritis in males. In: Holmes KK, Sparling PF, Stamm WE, eds. *Sexually Transmitted Diseases.* 4th ed. New York: McGraw Hill; 2008. p. 1107–26.
22. Povlsen K, Bjornelius E, Lidbrink P, et al. Relationship of *Ureaplasma urealyticum* biovar 2 to nongonococcal urethritis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2002; 21: 97–101.
23. Deguchi T, Yoshida T, Miyazawa T, et al. Association of *Ureaplasma urealyticum* (biovar 2) with nongonococcal urethritis. *Sex Transm Dis.* 2004; 31: 192–5.
24. Couldwell DL, Gidding HF, Freedman EV, et al. *Ureaplasma urealyticum* is significantly associated with nongonococcal urethritis in heterosexual Sydney men. *Int J STD AIDS.* 2010; 21: 337–41.
25. Ondondo RO, Whittington WL, Astete SG, et al. Differential association of ureaplasma species with nongonococcal urethritis in heterosexual men. *Sex Transm Infect.* 2010; 86: 271–5.
26. Wetmore CM, Manhart LF, 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.
27. Bradshaw CS, Tabrizi SN, Read TR, et al. Etiologies of nongonococcal urethritis: bacteria, viruses, and association with orogenital exposure. *J Infect Dis.* 2006; 193: 336–45.

Miha Skvarč¹, Mojca Matičič², Barbara Šoba¹

***Trichomonas vaginalis*: zapostavljen povzročitelj spolno prenosljivih bolezni?**

***Trichomonas vaginalis*: a Neglected Sexually Transmitted Pathogen?**

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: *Trichomonas vaginalis*, PCR v realnem času, ženske v srednjih letih

Trichomonas vaginalis je najpogostejša nevirusna spolno prenosljiva okužba. Prevalenca okužbe je največja pri ženskah v srednjih letih. Moški so najpogosteje brezsimptomatski nosilci. Sodobna diagnostika v Sloveniji temelji na pomnoževanju DNK s testom verižne reakcije s polimerazo v realnem času. Če se v obravnavo bolnikov s sumom na spolno prenosljivo bolezen uvede molekularna diagnostika, se število novo odkritih bolnikov poveča.

ABSTRACT

KEY WORDS: *Trichomonas vaginalis*, real time PCR, middle-aged women

Trichomonas vaginalis is the most prevalent non-viral sexually transmitted disease and is predominant in middle-aged women while men are usually asymptomatic carriers. Molecular diagnostics changed our view on the trichomoniasis and increased the number of newly discovered infected individuals. In Slovenia, we use real time polymerase chain reaction as the most useful method.

¹ Dr. Miha Skvarč, dr. med., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana; miha.skvarc@mf.uni-lj.si

² Izr. prof. dr. Mojca Matičič, dr. med., Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Japljeva ulica 2, 1000 Ljubljana

¹ Asist. dr. Barbara Šoba, univ. dipl. mikr., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

UVOD

Trichomonas vaginalis je najpogostejša ne-virusna spolno prenosljiva okužba s podcenjeno razširjenostjo, saj samo 20 % koloniziranih oseb razvije klinično sliko. Okužijo se lahko samo ljudje, okužba pa je pogostejša pri starejših ženskah. Prenos parazita je mogoč skoraj izključno z nezaščitenim spolnim odnosom z okuženo osebo (1–3).

ŽIVLJENJSKI CIKEL

T. vaginalis je svoj življenjski prostor našel v ženskem spodnjem genitalnem traktu ter v moški prostati in sečnici, kjer se razmnožuje s pomočjo podolžne (binarne) delitve. Po vsej verjetnosti parazit nima cistične oblike, v izločkih ga najdemo kot trofozoita. Težko preživi zunaj genitalnega ali sečnega trakta (1).

MORFOLOGIJA

Trofozoit *T. vaginalis* je hruškaste oblike, dolg od 7 μm do 30 μm in širok od 5 μm do 15 μm . Ima pet flagel. Štiri so na sprednjem ali anteriornem koncu, peta pa poteka proti posteriornem koncu po zunanji, valoviti (ondulirajoči) membrani. Pri korenu valovite membrane izhaja bazalna nit, imenovana rebro. Po sredini telesca poteka palička ali aksostil, ki štrli iz telesca. Veliko jedro je nameščeno na širšem sprednjem delu parazita in vsebuje veliko kromatinskih zrn in mali kariosom. Parazit se v sluznici prehranjuje z bakterijami in levkociti, katerim je sam ob zaokrožitvi in odmrtnju zunaj telesa zelo podoben. V seču ali izločkih genitalnega trakta lahko najdemo tudi *Pentatrichomonas hominis*, ki je del normalne flore debelega črevesja. Po obliki je zelo podoben *T. vaginalis*. Je le malo manjši in ima bazalno nit, ki sega po vsej dolžini telesca. Biček, ki je pripet ob valovito membrano, se prosto nadaljuje (1).

EPIDEMIOLOGIJA

Svetovna zdravstvena organizacija (angl. *World Health Organization*, WHO) oce-

njuje, da se s *T. vaginalis* letno na novo okuži 248 milijonov ljudi, od tega polovico moških, ki pa so v veliki večini brezsimptomni. Preko 80 % vseh simptomatskih okužb odkrijejo pri ženskah. Število okužb s *T. vaginalis* naj bi za dvakrat presegalo število okužb z bakterijo *Chlamydia trachomatis*. Število okuženih moških naj bi predstavljalo le eno desetino okuženih žensk (4, 5).

Več dejavnikov je prispevalo k spremembi pogleda na okužbo s *T. vaginalis*. Pojavile so se molekularne diagnostične metode, kot je pomnoževanje DNK parazita, ki so vse bolj v praktični uporabi. Poleg tega je bilo priznano dejstvo, da so moški brezsimptomni nosilci ter da je več žensk okuženih v srednjih in ne v mlajših letih, kar je običaj pri okužbi s *C. trachomatis* (6).

V večih raziskavah je bilo ugotovljeno, da je na splošno vsaj 80 % okužb s *T. vaginalis* brezsimptomnih. V raziskavi so dokazali, da imajo okuženi s *T. vaginalis* 2,7-krat večjo možnost, da se okužijo z virusom človeške imunске pomanjkljivosti (HIV) (4–7). Okužene noseče ženske imajo 1,3-krat večjo možnost, da pride do prezgodnjega poroda in 4,7-krat večjo možnost, da pride do vnetja v mali medenici (7–10).

V Združenih državah Amerike so v obsežni raziskavi ugotovili prevalenco okužbe s *T. vaginalis* v 8,7 %, s *C. trachomatis* v 6,7 % in z bakterijo *Neisseria gonorrhoeae* v 1,7 %. *T. vaginalis* je bil od vseh naštetih najpogostejše odkrit v vseh starostnih skupinah razen v starostni skupini od 18 do 19 let, kjer sta prevladovali *C. trachomatis* in *N. gonorrhoeae*. *T. vaginalis* je največkrat prisoten v starostni skupini nad 40 let, in sicer nad 11 %. V starostni skupini pod 30 let je prevalenca *C. trachomatis* znašala 9,2 % in *N. gonorrhoeae* 2,2 %. Prevalenca okužbe s *T. vaginalis* je bila največja v populaciji z nižjimi dohodki in večimi spolnimi partnerji. V zaključku raziskave so predlagali, da bi testiranju žensk na *C. trachomatis* in *N. gonorrhoeae* morali pri-

družiti tudi testiranje na *T. vaginalis*, ne glede na prisotnost oz. odsotnost kliničnih simptomov (11).

V evropski raziskavi, v kateri so primerjali prevalenco okužbe s spolno prenosljivimi mikrobi pri nosečnicah med Zahodno Evropo in Ukrajino, so ugotovili, da je bil *T. vaginalis* prisoten v 12,1 % (95 % CI 10,2–14,2), lezije, povezane s človeškim papilomavirusom (HPV), pa so bile prisotne v 8,6 % (95 % CI 6,9–10,4). Samske HIV-seropozitivne ženske v Ukrajini z več partnerji, ki so živele z injicirajočim uživalcem drog in so imele < 200/ml CD4 limfocitov, so imele večjo verjetnost, da so okužene s *C. trachomatis*, *Treponema pallidum* ali *T. vaginalis* (12).

V Veliki Britaniji so naredili presečno prevalenčno raziskavo in ugotovili, da je največ okuženih s *T. vaginalis* v Londonu in v pokrajini West Midlands. Pri obeh spolih je bil *T. vaginalis* prisoten v starejši starostni skupini, pogosteje pri črni rasi in pri rojenih na Karibih in ne v Veliki Britaniji. Gonoreja in klamidijska okužba sta bili povezani s prisotnostjo *T. vaginalis* pri ženskah (13).

MIKROBIOLOŠKA DIAGNOSTIKA

Okužba s *T. vaginalis* je lahko brezsimptomna, lahko pa jo spremlja spekter kliničnih simptomov in znakov, ki so pogosti tudi pri drugih spolno prenosljivih okužbah (SPO), zato zanesljiva klinična diagnostika trihomonoze ni mogoča. V laboratorijski oz. mikrobiološki diagnostiki trihomonoze so na voljo različni testi, od najosnovnejših, kot je mikroskopija, do kompleksnejših, ki vključujejo pomnoževanje nukleinske kisline parazita. Laboratorijski testi se razlikujejo po specifičnosti in občutljivosti ter po zahtevnosti izvedbe, pomemben dejavnik pri izbiri najprimernejšega pa predstavlja tudi njihova cenovna ugodnost (14). Mikrobiološka diagnostika trihomonoze še vedno močno šepa pri ugotavljanju okužbe pri

moških, vendar se le-ta z razvojem visoko občutljivih molekularno-bioloških testov v zadnjih letih močno izboljšuje. Osnovne značilnosti testov, ki se uporabljajo v laboratorijski diagnostiki trihomonoze, so zajete v tabeli 1.

Mikroskopija

Tradicionalna in najširše uporabljena metoda za diagnostiko trihomonoze je mikroskopski pregled nativnega preparata, pripravljenega iz vaginalnega izcedka ali brisa, izcedka ali brisa sečnice ali izcedka iz prostate. V preparatih opazujemo mikrobe hruškaste oblike z značilnim prekopicavajočim gibanjem in drugimi značilnimi lastnostmi trihomonasa. Uspešnost metode pogojuje prisotnost približno 100 mikrobov v ml vzorca kužnine (14). Občutljivost metode je 44–68 % (najnižja za vzorce, ki jih odvezamo moškimi), medtem ko je njena specifičnost 100 %. Preparate je potrebno pregledati v 10–20 minutah po odvzemu vzorca. Kasneje paraziti niso več gibljivi in jih je mikroskopsko zelo težko opaziti, kar zniža že tako precej nizko občutljivost metode. Občutljivost znatno zniža tudi neprimerno hranjenje in transport vzorcev do mikrobiološkega laboratorija, npr. pri temperaturi nižji od 22 °C (15).

Trihomonas lahko naključno najdemo pri citološkem pregledu brisa materničnega vratu, barvanega po Papanicolaou (test Pap), in sicer pri 36–60 % okuženih žensk. Test Pap je manj specifičen (90 %) kot mikroskopija nativnega preparata, zato je rezultat priporočljivo potrditi z bolj specifičnim in občutljivim testom. Večjo specifičnost (98–100 %) in občutljivost (60–96 %) dosega novejša, t. i. tekočinska citologija, vendar se za enkrat v rutinski diagnostiki trihomonoze ne uporablja (16, 17).

Kultivacija

Kultivacija parazita v ustreznem tekočem gojišču je do nedavnega predstavljala zla-

ti standard v diagnostiki trihomonoze. Po priporočilih ameriškega Centra za nadzor in preprečevanje bolezni (angl. *Centers for Disease Control and Prevention*, CDC) naj kultivacija parazita sledi vsakemu negativnemu mikroskopskemu pregledu natiwnega preparata vaginalnega izcedka, če pri preiskovanki obstaja sum na trihomonozo (18). Občutljivost kultivacije (44–75 %) je večja od občutljivosti neposrednega mikroskopskega pregleda, vendar mora biti le-ta pravilno izvedena. Uspešnost kultivacije je pogojena s prisotnostjo vsaj 300–500 mikrobov v ml vzorca kužnine (14). Vzorce, običajno vaginalne brise, brise sečnice, pri moških lahko tudi sediment seča ali semensko tekočino, je potrebno cepiti v gojišče v < 1 uri po odvzemu. Gojišče izbora je modificirano gojišče po Diamondu, lahko pa uporabimo tudi komercialno dostopna gojišča, npr. InPouch TV® (Biomed Diagnostics, Oregon, ZDA), CAT broth® (Copan, Brescia, Italija), itd. Prednost slednjih je v tem, da jih do uporabe običajno ni potrebno hraniti pri 4 °C in nato tik pred uporabo segreti na sobno temperaturo, saj so več mesecev obstojna pri le-tej. Nacepljena jih lahko pred inkubacijo pri 37 °C še nekaj ur hranimo pri sobni temperaturi, zato so primerna tudi kot transportna gojišča. Vsa nacepljena gojišča hranimo pri 37 °C, vsebino pa dnevno pregledujemo na prisotnost gibljivih trihomonasov do pet dni, preden izdamo negativen izvid (15).

Hitri diagnostični testi

Prednost hitrih testov za ugotavljanje antigenov ali nukleinske kisline *T. vaginalis* je v tem, da niso omejeni s hitrim transportom in obdelavo vzorca, ki sta nujno potrebna za ohranitev živih, gibljivih parazitov. Antigenski test OSOM *Trichomonas Rapid Test*® (Sekisui Diagnostics, Framingham, ZDA), ki ga je odobrila Ameriška agencija za hrano in zdravila (angl. *Food and Drug Administration*, FDA),

je na trgu od leta 2003. Gre za imunokromatografski test, t. i. test ob preiskovanju (angl. *point-of-care test*) v obliki testnih lističev, ki na podlagi kapilarnega vleka omogočijo hitro vsrkanje ustrezno pripravljene vzorca (vaginalni izloček ali bris) in zaznavanje membranskih beljakovin *T. vaginalis* v 10 minutah. Test s 77–98 % občutljivostjo in 99–100 % specifičnostjo ni primeren za brezsimptomne preiskovanke in za testiranje moških, v populacijah z nizko prevalenco trihomonoze so možni lažno pozitivni rezultati (15,18). Med hitre teste uvrščamo tudi Affirm VPIII® (Becton Dickinson, Maryland, ZDA), hibridizacijski test za sočasno ugotavljanje okužbe s *T. vaginalis*, *Gardnerella vaginalis* in *Candida albicans*. Test temelji na zaznavanju nepomnožene nukleinske kisline navedenih mikroorganizmov s specifičnimi oligonukleotidnimi lovkami. Izvedba testa je precej bolj kompleksna od izvedbe zgoraj navedenih antigenih testov, rezultati pa niso na voljo prej kot v 45 minutah. Test je odobrila FDA, ima pa tudi oznako Conformité Européenne (CE) (18, 19).

Testi, ki temeljijo na pomnoževanju nukleinske kisline *T. vaginalis*

Z razvojem visoko občutljivih in specifičnih diagnostičnih testov, ki temeljijo na pomnoževanju nukleinske kisline *T. vaginalis*, kot sta npr. verižna reakcija s polimerazo (angl. *polymerase chain reaction*, PCR) in s transkripcijo posredovano pomnoževanje (angl. *transcription-mediated amplification*, TMA), se je pogled na diagnostiko trihomonoze pomembno spremenil. Ker imajo ti testi izredno visoko občutljivost, so primerni tudi za presejanje (npr. epidemiološke raziskave) in testiranje brezsimptomnih tako žensk kot moških. Zanje so primerni različni urogenitalni vzorci, tudi seč, brisi materničnega vratu in vaginalni brisi, ki si jih lahko preiskovanke odvzamejo same. Vzorce lahko sočasno upo-

Tabela 1. Osnovne značilnosti testov, ki se uporabljajo v laboratorijski diagnostiki trihomonoz (15,19).

Diagnostični test	Občutljivost (%)	Specifičnost (%)	Čas, potreben za izvedbo	Prednosti	Slabosti
Mikroskopija nativnega preparata	44-68	100	Nekaj minut	Nizka cena	Nizka občutljivost, potrebno izkušeno laboratorijsko osebje, manj primerna za testiranje moških
Test Pap	36-60	90	Več dni	Sočasnost s presejanjem za raka materničnega vratu	Nizka občutljivost in specifičnost, potrebno potrditveno testiranje, potrebno izkušeno laboratorijsko osebje, neprimeren za testiranje moških
Tekočinska citologija	98-100	60-96	Več dni	Višja občutljivost in specifičnost glede na Pap	Potrebno izkušeno laboratorijsko osebje, neprimerna za testiranje moških
Kultivacija	44-75	100	Do 5 dni	Višja občutljivost glede na mikroskopijo, nizka cena, možno testiranje protimikrobne učinkovitosti	Potrebno izkušeno laboratorijsko osebje, inkubator in nadzor temperature pri transportu vzorcev
Hitri Ag test OSOM	77-98	99-100	10 minut	Posebna dodatna oprema ni potrebna, enostavna izvedba, hiter transport vzorca ni nujno potreben	Test ob preiskovancu, neprimeren za testiranje moških in brezsimptomnih žensk
Test Affirm VPIII	64	100	45 minut	Sočasno ugotavljanje okužbe z <i>G. vaginalis</i> in <i>C. albicans</i> , hiter transport vzorca ni nujno potreben	Zmerno zahteven test, visoka cena, potrebna dodatna laboratorijska oprema in izkušeno laboratorijsko osebje, neprimeren za testiranje moških in brezsimptomnih žensk
Test APTIMA TV	95-100	95-100	Več dni	Visoka občutljivost in specifičnost, hiter transport vzorca ni nujno potreben, primeren za testiranje moških	Zahteven test, visoka cena, potrebna dodatna laboratorijska oprema in izkušeno laboratorijsko osebje, možni vztrajajoči pozitivni rezultati tudi po uspešno zaključnem zdravljenju
PCR	84-100	94-100	Več dni	Visoka občutljivost in specifičnost, hiter transport vzorca ni nujno potreben, primerna za testiranje moških	Zahteven test, visoka cena, potrebna dodatna laboratorijska oprema in izkušeno laboratorijsko osebje, možni vztrajajoči pozitivni rezultati tudi po uspešno zaključnem zdravljenju

rabimo še za testiranje prisotnosti drugih spolno prenosljivih patogenov. Podobno kot hitri diagnostični testi tudi testi, ki temeljijo na pomnoževanju nukleinske kisline *T. vaginalis*, niso ozko omenjeni s hitrim transportom in obdelavo vzorca, temperaturni razpon, pri katerem lahko hranimo vzorce, pa je bolj širok (15).

Od komercialno dostopnih testov, ki temeljijo na pomnoževanju nukleinske kisline *T. vaginalis*, je test TMA, poimenovan APTIMA *Trichomonas vaginalis* assay® (Hologic Inc., San-Diego, ZDA), kot prvi pridobil odobritev FDA in oznako CE za ugotavljanje trihomonoze pri ženskah (20). Občutljivost in specifičnost testa sta 95–100 %. V mednarodni literaturi je opisanih več testov PCR s 84–100 % občutljivostjo in 94–100 % specifičnostjo. Ker le-ti običajno niso komercialno dostopni in niso certificirani za rabo v diagnostiki, je njihova validacija v domeni laboratorija, ki jih uporablja (15).

Slabost testov, ki temeljijo na pomnoževanju nukleinske kisline *T. vaginalis*, je poleg visoke cene in zahtevnosti izvedbe še nezmožnost zaznavanja živih parazitov, zato jih ne moremo uporabiti pri sledenju uspešnosti zdravljenja trihomonoze. Čeprav lahko ti testi nemalokrat nadomestijo manj občutljive teste, pa pri ugotavljanju dolgotrajnih okužb in učinkovitosti zdravljenja ne morejo zamenjati kulture (15, 21).

KLINIČNA SLIKA

Klinični simptomi in znaki trihomonoze so odraz tropizma povzročitelja, ki se pri odraslih naseli znotraj nožnice oz. sečnice. Podobni so le-tem pri drugih SPO z izcedkom in so dostikrat povsem neznaki, lahko pa bolezen poteka brez prisotnosti simptomov, kar beležimo pri 70–80 % okuženih moških in približno 25–50 % okuženih žensk (22, 23).

Po inkubacijski dobi od 5 do 28 dni se pri ženskah lahko pojavi obilen, zaudar-

jajoč, belkasto-rumenkast izcedek iz nožnice s skelečim občutkom ali srbenjem (vaginitis), ki mu je lahko pridružno tudi pekoče in pogosto mokrenje (uretritis), redko s pridruženim občutkom nelagodja ali bolečine v spodnjem delu trebuha. Uretritis je vaginitisu pridružen kar v 90 %; le 5 % okuženih žensk pa ima prisoten zgolj uretritis, brez vaginitisa. Klinično je vulva močno eritematozna, z vidnim izcedkom iz nožnice. Ginekološki pregled redko (pri 2 %) pokaže na ekto cerviksu pikčaste krvavitve, t. i. »jagodast cerviks« (cervicitis), ki pomagajo klinično ločevati trihomonozo od cervicitisov druge etiologije (24, 25). Vaginalno lahko trihomonoza vodi v kronično pelvično vnetje, povezujejo pa jo tudi z zapleti v nosečnosti, predvsem s prezgodnjim razpokom plodovih ovojev, prezgodnjim porodom in z nizko porodno težo novorojenca (24, 25).

Če se pri okuženih moških pojavijo simptomi, se kažejo kot vnetje sečnice s pekočim in pogostim mokrenjem, lahko pa tudi z bolečino v testisih. Redko se pojavi balanopostitis, ki je lahko edini odraz okužbe s *T. vaginalis* (15, 23). Resnejši zaplet je kronični prostatitis, ki naj bi povzročil 11 % vseh spolno prenesenih prostatitisov (26).

ZDRAVLJENJE

Zdravilo izbire za zdravljenje spolno prenosljive trihomonoze je metronidazol, z zaužitjem enkratnega odmerka 2 g ali tinidazol (prav tako 2 g oralno enkrat), ki pa v Sloveniji ni na voljo. Alternativa je metronidazol v dveh dnevnihi odmerkih po 500 mg oralno za sedem dni (27). Zdravljenje kroničnega prostatitisa, ki ga povzroča *T. vaginalis*, traja od šestih tednov do treh mesecev (26). V času zdravljenja in še nekaj dni zatem odsvetujejo uživanje alkohola.

V raziskavah je bil metronidazol učinkovit v 90–95 %, tinidazol pa v 86–100 %. Odpornost trihomonasa proti metronida-

zolu je bila opisana že leta 1962 in je še vedno relativno majhna, v različnih raziskavah odkrita v 2–5 % (28). V tem primeru svetujejo večje odmerke metronidazola ali tinidazol. Topična uporaba metronidazola ni priporočljiva.

Zaradi možnosti ponavljajočih se vnetij svetujejo predvsem pri ženskah kontrolni pregled tri mesece po zaključku zdravljenja (24). Svetuje se pregled in po potrebi zdravljenje spolnih partnerjev okuženih.

Metronidazol ni teratogen ali mutagen, raziskav s tinidazolom pa ni na voljo. Rezultati raziskav kažejo, da zdravljenje nosečnic z metronidazolom ni zmanjšalo vpliva trihomonoze na perinatalno obolenost. Druge raziskave nakazujejo, da bi bilo uživanje metronidazola v času nosečnosti lahko povezano s prezgodnjim porodom ali nizko porodno težo. Vendar se presejalno testiranje žensk v rodni dobi na *T. vaginalis* ne priporoča. Nekateri avtorji pri brezsimptomno okuženih nosečnicah svetujejo odložitev zdravljenja z metronidazolom do 37. tedna gestacijske starosti (24).

NAŠE IZKUŠNJE PRI ODKRIVANJU OKUŽBE S *T. VAGINALIS* Z METODO VERIŽNE REAKCIJE S POLIMERAZO

V obdobju od začetka februarja do konca septembra 2014 smo v Laboratoriju za parazitologijo Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo (IMI) Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani v sodelovanju s Kliniko za infektivne bolezni in vročinska stanja Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana testirali 95 urogenitalnih vzorcev. Pregledali smo 42 (44,2 %) vaginalnih brisov in 53 (55,8 %) brisov sečnice bolnikov, ki so v tem času obiskali Ambulanto za spolno prenosljive okužbe na sodelujoči kliniki in so bili zaradi suma na prisotnost tovrstnih okužb (prisotnost simptomov in znakov, tvegano spolno vedenje, potrjena SPO pri spolnem partnerju

oz. partnerki) rutinsko testirani. Povprečna starost bolnikov je bila 34,9 let.

Brisi so bili takoj po odvzemu vstavljeni v gojišče CAT broth®, nato pa pri sobni temperaturi v manj kot dveh urah preneseni na IMI. Takoj po prevzemu smo na IMI vsako gojišče z brisom dobro pretresli, odstranili bris in gojišče centrifugirali. Iz dela sedimenta smo pripravili nativni preparat in ga mikroskopsko pregledali na prisotnost *T. vaginalis*. Gojišče s preostalim sedimentom smo tri dni inkubirali pri temperaturi 37 °C, nato pa sediment ponovno mikroskopsko pregledali. Vse vzorce smo testirali tudi na prisotnost DNK *T. vaginalis* s PCR v realnem času, pri čemer smo prav tako uporabili del sedimenta nacepljenega gojišča. Iz tega smo najprej osamili celokupno DNK, nato pa PCR v realnem času izvedli po postopku, kot ga opisujejo Pillay in sodelavci (21).

Od skupno 95 urogenitalnih vzorcev so bili ob prvem mikroskopskem pregledu vsi (100 %) negativni. Po tridnevni kultivaciji pri temperaturi 37 °C je bilo 94 (98,9 %) vzorcev mikroskopsko negativnih, eden (1,1 %), in sicer vzorec, vzet s pomočjo vaginalnega brisa, pa je bil pozitiven. S PCR v realnem času smo prisotnost DNK *T. vaginalis* ugotovili v šestih (6,3 %) vzorcih. Pet vaginalnih brisov je pripadalo ženskam, starim 50, 23, 26, 30 in 28 let (povprečna starost 31,4 leta), bris sečnice pa moškemu, staremu 31 let. Med vzorci, pozitivnimi s PCR v realnem času, je bil tudi vzorec, v katerem smo *T. vaginalis* ugotovili že z mikroskopiranjem po tridnevni kultivaciji. Rezultati testiranja pri pozitivnih bolnikih so prikazani v tabeli 2.

PCR v realnem času se je po naših izkušnjah izkazala kot pomembna izboljšava rutinske mikrobiološke diagnostike trihomonoze, ki v Laboratoriju za parazitologijo, IMI, danes temelji na mikroskopiji nativnega preparata in kultivaciji parazita. Glede na to, da je preiskava v primerjavi s slednjima bistveno dražja in zahteva pre-

Tabela 2. Podatki o bolnikih, pozitivnih na *T. vaginalis*, in rezultati testiranja njihovih vzorcev; Ž – ženska, M – moški, Neg – negativen rezultat testiranja, Poz – pozitiven rezultat testiranja, PCR – angl. *polymerase chain reaction*.

Zaporedna št. bolnika	Spol	Starost (leta)	Vzorec	Mikroskopija 1. dan	Mikroskopija po kultivaciji	PCR
1	Ž	50	Vaginalni bris	Neg	Poz	Poz
2	Ž	23	Vaginalni bris	Neg	Neg	Poz
3	M	31	Bris sečnice	Neg	Neg	Poz
4	Ž	26	Vaginalni bris	Neg	Neg	Poz
5	Ž	30	Vaginalni bris	Neg	Neg	Poz
6	Ž	28	Vaginalni bris	Neg	Neg	Poz

cej daljši operativni čas izkušenega laboratorijskega osebja, bi bilo smiselno razmisliti o enotnem odvzemu in obdelavi ter tudi o združenem molekularno-biološkem testiranju vzorcev bolnikov na več spolno prenosljivih povzročiteljev.

ZAKLJUČEK

Okužba s *T. vaginalis* je »sirota« v družini SPO. Njegovo prepoznavanje v vlogi povzročitelja trihomonoze je zanemarjeno iz večih razlogov. Prvi je ta, da mu je zelo podoben komezal v debelem črevesju *Pentatrichomonas hominis*, ki lahko zaide v genitouretralni trakt, a ne povzroča bolezni in ga lahko zamenjamo s *T. vaginalis*. Drugi razlog je, da so klinični simptomi in znaki pogostejši pri ženskah po 30. letu, ki

ne predstavljajo najznačilnejše populacije za prisotnost SPO, moški pa so v večjem deležu kot ženske brezsimptomni nosilci okužbe. In tretjič, s *T. vaginalis* in posledicami okužbe se pri ženskah običajno najprej soočijo ginekologi, ki prej kot na *T. vaginalis* pomislijo na bakterijsko vaginozo, katero pa na srečo zdravimo enako kot trihomonozo. Opremljeni s tem znanjem moramo izboljšati svojo ozaveščenost, da je *T. vaginalis* pomemben povzročitelj SPO pri ženskah v srednjih letih. Iskati moramo prisotnost DNK *T. vaginalis* s PCR v realnem času. Ciljna populacija so tudi moški, ki so v večini primerov brezsimptomni nosilci in možni prenašalci okužbe, ki bi v takih primerih potrebovala ustrezno obravnavo in zdravljenje.

LITERATURA

1. Logar J. Parazitologija človeka. Radovljica: Didakta, 2010.
2. Madico G, Quinn TC, Rompalo A, et al. Diagnosis of *Trichomonas vaginalis* Infection by PCR Using Vaginal Swab Samples. *J Clin Microbiol*. 1998; 36 (11): 3205-10.
3. Andrea SB, Chapin KC. Comparison of Aptima *Trichomonas vaginalis* Transcription-Mediated Amplification Assay and BD Affirm VPIII for Detection of *T. vaginalis* in Symptomatic Women: Performance Parameters and Epidemiological Implications. *J Clin Microbiol* 2011; 49 (3): 866-9.
4. World Health Organization. Global prevalence and incidence of selected curable sexually transmitted infections: overview and estimates. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2001.
5. World Health Organization. Prevalence and incidence of selected sexually transmitted infections, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, syphilis, and *Trichomonas vaginalis*: methods and results used by the WHO to generate 2005 estimates. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2011.
6. Allsworth JE, Ratner JA, Peipert JF. Trichomoniasis and other sexually transmitted infections: results from the 2001-2004 National Health and Nutrition Examination Surveys. *Sex Transm Dis* 2009; 36: 738-44.
7. Sutton M, Sternberg M, Koumans EH, et al. The prevalence of *Trichomonas vaginalis* infection among reproductive-age women in the United States, 2001-2004. *Clin Infect Dis* 2007; 45: 1319-26.
8. Laga M, Manoka A, Kivuvu M, et al. Non-ulcerative sexually transmitted diseases as risk factors for HIV-1 transmission in women: results from a cohort study. *AIDS* 1993; 7: 95-102.
9. McClelland RS, Sangare L, Hassan WM, et al. Infection with *Trichomonas vaginalis* increases the risk of HIV-1 acquisition. *J Infect Dis* 2007; 195: 698-702.
10. Van Der Pol B, Kwok C, Pierre-Louis B, et al. *Trichomonas vaginalis* infection and human immunodeficiency virus acquisition in African women. *J Infect Dis* 2008; 197: 548-54.
11. Ginocchio CC, Chapin K., Smith JS, et al. Prevalence of *Trichomonas vaginalis* and Coinfection with *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in the United States as Determined by the Aptima *Trichomonas vaginalis* Nucleic Acid Amplification Assay. *J Clin Microbiol* 2012, 50 (8): 2601-8.
12. Landes M, Thorne C, Barlow P, et al. Prevalence of sexually transmitted infections in HIV-1 infected pregnant women in Europe. *Eur J Epidemiol* 2007; 22 (12): 925-36.
13. Mitchell HD, Lewis DA, Marsh K, et al. Distribution and risk factors of *Trichomonas vaginalis* infection in England: an epidemiological study using electronic health records from sexually transmitted infection clinics, 2009-2011. *Epidemiology and Infection* 2014; 142: 1678-87.
14. Harp DF, Chowdhury I. Trichomoniasis: evaluation to execution. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2011; 157: 3-9.
15. Hobbs MM, Seña AC. Modern diagnosis of *Trichomonas vaginalis* infection. *Sex Transm Infect* 2013; 89: 434-8.
16. Aslan DL, Gulbahce HE, Stelow EB, et al. The diagnosis of *Trichomonas vaginalis* in liquid-based Pap tests: correlation with PCR. *Diagn Cytopathol* 2005; 32: 341-4.
17. Lara-Torre E, Pinkerton JS. Accuracy of detection of *trichomonas vaginalis* organisms on a liquid-based papanicolaou smear. *Am J Obstet Gynecol* 2003; 188: 354-6.
18. Centers for Disease Control and Prevention. Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines, 2006. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2006; 55: 52-4.
19. Huppert JS. Trichomoniasis in teens: an update. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2009; 21: 371-8.
20. Schwabke JR, Hobbs MM, Taylor SN, et al. Molecular testing for *Trichomonas vaginalis* in women: results from a prospective U.S. clinical trial. *J Clin Microbiol* 2011; 49: 4106-11.
21. Pillay A, Radebe F, Fehler G, et al. Comparison of a TaqMan-based real-time polymerase chain reaction with conventional tests for the detection of *Trichomonas vaginalis*. *Sex Transm Infect* 2007; 83: 126-9.
22. Adu-Sarkodie Y, Nemo M, Van Der Pol B. Trichomoniasis. In: Laboratory diagnosis of sexually transmitted infections including human immunodeficiency virus. Geneva: World Health Organization (WHO); 2013.
23. Muzny CA, Schwabke JR. The clinical spectrum of *Trichomonas vaginalis* infection and challenges to management. *Sex Transm Infect* 2013; 89: 423-5.
24. Sherrard J, Donders G, White D, et al. European IUSTI Int J STD AIDS. European (IUSTI/WHO) guideline on the management of vaginal discharge, 2011. *Int J STD AIDS* 2011; 22: 421-9.
25. Seña AC, Bachmann LH, Hobbs MM. Persistent and recurrent *Trichomonas vaginalis* infections: epidemiology, treatment and management considerations. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2014; 12: 673-85.

26. Skerk V, Schönwald S, Granić J, et al. Chronic prostatitis caused by *Trichomonas vaginalis* - diagnosis and treatment. *J Chemother* 2002; 14: 537-8.
27. Centers for Disease Control and Prevention. Sexually transmitted infections treatment guidelines, 2010. *MMWR* 2010; 59: 1-110.
28. Bachman LH, Hobbs MM, Sena AC, et al. *Trichomonas vaginalis* genital infections: progress and challenges. *Clin Infect Dis* 2011; 53 (Suppl3): 160-72.

Andraž Dovnik¹, Andrej Golle², Dušan Novak³, Darja Arko⁴, Iztok Takač⁵

Glive in vnetje nožnice

Yeast Infection of the Vagina

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: glivična okužba, zunanje spolovilo, nožnica, povzročitelji, lokalni antimikotiki, sistemsko zdravljenje, probiotiki

Glivične okužbe so drugi najpogostejši vzrok vnetja zunanjega spolovila in nožnice, njihov najpogostejši povzročitelj pa je *Candida albicans*. Pogostnost glivičnih vnetij nožnice je glede na visoko stopnjo samozdravljenja težko določiti. *Candida albicans* je del normalne nožnične mikroflore in lahko ob porušenem razmerju med gostiteljem in mikroorganizmom povzroča klinično vnetje. Diagnozo največkrat postavimo klinično, za potrditev diagnoze pa je priporočljivo napraviti test s kulturo. Vnetje v večini primerov pozdravimo z enim odmerkom ali kratkotrajno terapijo z lokalnim ali sistemskim protiglivičnim zdravilom. Najdostopnejše zdravljenje predstavljajo lokalni azoli. V primeru zapletene oblike vnetja je lahko zdravljenje dolgotrajnejše. Korist probiotikov pri zdravljenju glivičnih vnetij še ni bila dokazana.

ABSTRACT

KEY WORDS: fungal infection, vulva, vagina, pathogens, local azoles, systemic treatment, probiotics

Fungal infection is the second most common cause of vulvar and vaginal inflammation and *Candida albicans* is the most common pathogen. The exact incidence of fungal infections is unknown due to the high rate of self-treatment. *Candida albicans* is a part of normal vaginal microflora. When the balance between vaginal microorganisms and host immune system is disrupted, *Candida albicans* can cause clinical inflammation. Diagnosis is usually based on the typical clinical picture and can be confirmed with culture. In most cases the inflammation can be cured with one dose or short term antimycotic therapy with local azoles being the most available treatment. Treatment is prolonged in case of complicated inflammation. The role of probiotics in treatment of fungal infections is yet to be determined.

¹ Andraž Dovnik, dr. med., specializant ginek. in porodn., Klinika za ginekologijo in perinatologijo, Univerzitetni klinični center Maribor, Ljubljanska ulica 5, 2000 Maribor; andrazdovnik@gmail.com

² Asist. mag. Andrej Golle, dr. med., spec. klin. mikrobiol., Oddelek za medicinsko mikrobiologijo Maribor, Center za medicinsko mikrobiologijo, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Prvomajska ulica 1, 2000 Maribor; Medicinska fakulteta Univerze v Mariboru, Taborska ulica 8, 2000 Maribor

³ Dušan Novak, prof. biol., spec. klin. mikrobiol., Oddelek za medicinsko mikrobiologijo Maribor, Center za medicinsko mikrobiologijo, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Prvomajska ulica 1, 2000 Maribor

⁴ Doc. dr. Darja Arko, dr. med., Klinika za ginekologijo in perinatologijo, Univerzitetni klinični center Maribor, Ljubljanska ulica 5, 2000 Maribor; Medicinska fakulteta Univerze v Mariboru, Taborska ulica 8, 2000 Maribor

⁵ Prof. dr. Iztok Takač, dr. med., svetnik, spec. ginek. in porodn., Klinika za ginekologijo in perinatologijo, Univerzitetni klinični center Maribor, Ljubljanska ulica 5, 2000 Maribor; Medicinska fakulteta Univerze v Mariboru, Taborska ulica 8, 2000 Maribor

UVOD

Izcedek iz nožnice je pogost simptom, s katerim se srečujejo zdravniki družinske medicine in ginekologi na primarni ravni (1). Povečan izcedek iz nožnice je največkrat znak vnetja, kljub temu pa ima približno desetina žensk povečan izcedek, ki je posledica fiziološkega dogajanja, na primer med nosečnostjo, ovulacijo ali spolnimi odnosi (2). Ocenjujejo, da je glivična okužba zunanega spolovila in nožnice drugi najpogostejši vzrok vnetja, takoj za bakterijsko vaginozo (3).

EPIDEMIOLOGIJA

Vsaj eno epizodo glivičnega vnetja nožnice ima v svoji rodni dobi okoli 75 % žensk, približno polovica pa ima dve ali več epizod (1). Najpogostejši povzročitelj glivičnega vnetja je *Candida albicans*, ki predstavlja 85–90 % vseh primerov (3). Kolonizacija s kandido je pogosto asimptomatska. Bauters in sod. so na vzorcu 612 žensk ugotovili 20 % stopnjo kolonizacije z glivami, med katerimi je bila najpogosteje izolirana *C. albicans* (4). V drugi raziskavi so kandido iz nožnice v enoletnem opazovalnem obdobju izolirali pri 70 % žensk (5). Glivična vnetja nožnice in zunanega spolovila lahko razdelimo na zapletena in nezapletena. Zapletena vnetja predstavljajo težje primere vnetij, ki jih povzročajo druge oblike kandidate, vnetja v nosečnosti, pri bolnicah z oslabiljeno imunostjo ali sladkorno boleznijo ter ponavljajoča se vnetja pri bolnicah z ohranjenim imunskim odzivom. Ponavljajoča se vnetja so definirana kot štiri ali več epizod vnetja na leto, takšnih primerov naj bi

bilo 5–8 % (6, 7). Nezapletena vnetja predstavljajo sporadične epizode blagih vnetij, povzročenih s *C. albicans* (8). Glede na visoko stopnjo samozdravljenja je natančno prevalenco glivičnih vnetij nožnice težko določiti (9).

Podatki o pogostnosti glivičnih vnetij in akutnih vaginitisov na oddelkih in dispanzerjih Klinike za ginekologijo in perinatologijo Univerzitetnega kliničnega centra (UKC) Maribor so navedeni v Tabeli 1.

ETIOLOGIJA

Glavni povzročitelj glivičnega vnetja nožnice je *C. albicans* (5). Ta oportunistična polimorfna gliva je normalni del nožnične mikroflore (6). Do kliničnega vnetja pride, če je razmerje med kolonizacijo in gostiteljem začasno moteno (5). Pomemben element nožnične mikroflore so laktobacili, ki s tvorbo mlečne kisline vzdržujejo kisli pH v nožnici in s tem preprečujejo razrast patogenih mikroorganizmov (10). Kljub temu pa z raziskavami ni bilo dokazano, da ob odsotnosti jemanja antibiotikov spremenjena nožnična mikroflora vodi v kandidozo zunanega spolovila in nožnice (11, 12).

Dejavniki tveganja za glivična vnetja zunanega spolovila in nožnice so sladkorna bolezen, uporaba sistemskih antibiotikov in nosečnost (3). Kolonizacija nožnice s kandido, predvsem s *C. albicans*, se ob uporabi antibiotikov poveča za 10–30 %, ob tem pa se vnetje zunanega spolovila in nožnice pojavi v 28–33 % (13). Način življenja, kot na primer pogosti, predvsem oralni spolni odnosi, hormonska kontracepcija z visokim odmerkom

Tabela 1. Število bolnic z diagnozo glivičnega vnetja in akutnega vaginitisa na oddelkih in dispanzerjih Klinike za ginekologijo in perinatologijo Univerzitetni klinični center Maribor med leti 2009 in 2013.

DIAGNOZA	2009	2010	2011	2012	2013
Glivično vnetje B37.3	15	17	24	15	3
Akutni vaginitis N76.0	691	716	629	540	585

estrogenov ter uporaba spermicidov in kondomov, je prav tako povezan s povečanim tveganjem za vnetja nožnice in zunanje spolovila (5).

Pri ponavljajočih vnetjih so v 10–20 % izolirane *C. glabrata* in druge glive (1). Tudi pri teh vnetjih obstajajo enaki dejavniki tveganja. Dejavniki tveganja je tudi imunska pomanjkljivost, kot na primer pri okužbi z virusom HIV, vnetje kože zunanjega spolovila pa je povezano z lichen sclerosusom. Opisana je bila tudi povezava med alergijskim rinitisom in ponavljajočim se vnetjem nožnice in zunanjega spolovila (1). Povzročitelji glivičnih vnetij nožnice pri bolnicah, pregledanih v UKC Maribor v letih 2009–2013, so navedeni v Tabeli 2.

KLINIČNA SLIKA

Glavna simptoma glivičnega vnetja sta pekoč občutek v nožnici in srbenje v predelu zunanjega spolovila, ki ju spremljata bolečina in draženje vnetega področja (3, 5). Ti simptomi lahko vodijo do bolečih

spolnih odnosov (dispareunija) in bolečega odvajanja vode (dizurija) (5). Značilni klinični znaki so oteklina in rdečina prizadetega predela z značilnim belkastim izcedkom, podobnim skuti. Ob pregledu v zrcalih je navadno viden belkast izcedek z belkastimi oblogami na steni nožnice, ki se lahko spreminja od bolj vodenege do gostejšega. Izgled materničnega vratu je normalen (2, 7).

DIAGNOSTIKA

Diagnozo največkrat postavimo na podlagi klinične slike (7). Pri diagnostiki nam je v pomoč pregled na vaginalno čistočo oz. mikroskopski pregled izcedka. Izcedek pri kandidozi uvrstimo v VI. razred vaginalne čistoče, za katerega so značilne micelijске niti ob redkih levkocitih in epiteljskih celicah (2). Micelije ima ob mikroskopskem pregledu izcedka z dodano fiziološko raztopino prisotne približno 50–80 % bolnic (7, 13). V pomoč nam je tudi Whiffov test, kjer vaginalnemu izcedku dodamo 10 % kalijeve hidroksid. Test je v prime-

Tabela 2. Glive, izolirane iz brisov nožnice na Kliniki za ginekologijo in perinatologijo Univerzitetnega kliničnega centra Maribor med leti 2009 in 2013.

PATOGENI	2009	2010	2011	2012	2013
<i>Candida albicans</i>	328 (89,6 %)	408 (89,6 %)	361 (91,1 %)	308 (89,3 %)	383 (90,0 %)
<i>Candida glabrata</i>	15 (4,1 %)	30 (6,5 %)	27 (6,8 %)	22 (6,3 %)	23 (5,4 %)
<i>Candida guilliermondii</i>	1 (0,3 %)	0	0	0	0
<i>Candida krusei</i>	4 (1,1 %)	3 (0,7 %)	0	2 (0,6 %)	3 (0,7 %)
<i>Candida parapsilosis</i>	4 (1,1 %)	3 (0,7 %)	0	3 (0,9 %)	1 (0,2 %)
<i>Candida spherica</i>	1 (0,3 %)	0	1 (0,3 %)	0	0
<i>Candida tropicalis</i>	3 (0,8 %)	1 (0,2 %)	1 (0,3 %)	0	0
<i>Candida utilis</i>	1 (0,3 %)	1 (0,2 %)	0	1 (0,3 %)	0
<i>Candida lusitanae</i>	0	0	1 (0,3 %)	4 (1,1 %)	2 (0,5 %)
<i>Candida kefyr</i>	0	1 (0,2 %)	0	1 (0,3 %)	2 (0,5 %)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6 (1,6 %)	7 (1,5 %)	4 (1,0 %)	4 (1,1 %)	9 (2,1 %)
Kvasovke	3 (0,8 %)	1 (0,2 %)	1 (0,3 %)	0	0
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	0	0	0	0	1 (0,2 %)
Skupaj	366	455	396	345	424

ru kandidoze negativen, pozitiven pa je v primeru bakterijske vaginoze, ko dodatek kalijevega hidroksida (KOH) sprosti ribji, amonijev vonj (7). Pri glivični okužbi nožnice je vaginalni pH normalen med 4,0 in 4,5, medtem ko je v primeru bakterijske vaginoze in okužbe s *Trichomonas vaginalis* pH nad 4,5 (5). Za potrditev diagnoze je priporočljivo opraviti test s kulturo (7). V primeru normalnega kliničnega izgleda in negativne mikroskopije bolnic ni potrebno zdraviti empirično, razen v primeru pozitivne kulture (7).

ZDRAVLJENJE

Zdravljenje glivičnih okužb nožnice razlikujemo glede na to, ali gre za zapleteno ali nezapleteno obliko vnetja. (14, 15).

Pri nezapletenih oblikah vnetje v 90 % uspešno pozdravimo z enim odmerkom zdravila ali kratkotrajno terapijo. Na voljo so številna oralna zdravila ali zdravila za lokalno uporabo, vendar ni jasno, katero je najprimernejše (5). Najbolj dostopno zdravljenje predstavljajo lokalni azoli, ki vodijo v izboljšanje simptomov v 80–90 % primerov. Priporočamo kratkotrajne režime jemanja teh zdravil, pri čemer se simptomi navadno izboljšajo v dveh do treh dneh (7). Različni intravaginalni azoli, kot na primer klotrimazol, mikonazol, butokonazol, imajo podoben učinek (3). Intravaginalni azoli, ki jih uporabljamo v krajših režimih zdravljenja, imajo višjo koncentracijo zdravila, zato zaviralni učinek na glive traja dalj časa (7). Lokalni azoli so bolj učinkoviti pri zdravljenju vnetij, kot je nistatin (5, 7). Lokalni preparati klotrimazola so dostopni v lekarnah brez recepta.

Peroralno zdravljenje nezapletenih oblik vnetij predstavlja flukonazol v enkratnem odmerku 150 mg. Učinkovitost tega načina zdravljenja je podobna kratkotrajnim lokalnim azolom, bolnice pa je potrebno opozoriti, da lahko simptomi vztrajajo še nekaj dni po zdravljenju (7).

Bolnice z zapletenimi vnetji je potrebno zdraviti dalj časa. Uporabljajo se oralni flukonazol (v treh odmerkih po 150 mg na 72 ur) ali pa lokalni azoli, ki jih je potrebno prejemati vsaj sedem dni (16). Verjetnost ponavljanja vnetja zmanjšamo z vzdrževalnim odmerkom 150 mg flukonazola na teden po režimu s tremi odmerki tega zdravila (17). Pri tem ni jasno dokazano, da bi se ob tem dolgotrajnem zdravljenju razvila rezistenca na flukonazol ali superinfekcija z drugimi oblikami kandid. Pri ponavljajočih oblikah vnetij je dolgotrajna zaviralna terapija s flukonazolom učinkovita v več kot 90 % (17).

Pri zdravljenju ponavljajočih se glivičnih vnetij je podobno učinkovita tudi zaviralna terapija z itrakonazolom (dve dozi po 200 mg na dan enkrat na mesec) in ketokonazolom, vendar slednjega zaradi jetrne toksičnosti ne priporočamo (18–20).

Azoli so manj učinkoviti pri vnetjih, ki jih ne povzroča *C. albicans*. Pri zdravljenju okužbe z drugimi vrstami kandid, neodzivnih na azole, je po raziskavah v 70 % učinkovit amfotericin B (v odmerku 50 mg 14 dni) (21). Podobno je pri okužbi s *C. glabrata* učinkovita tudi borova kislina (odmerek 600 mg dnevno 14 dni) (22).

Izsledki raziskav o uporabi probiotikov in alternativnih metod pri zdravljenju ponavljajočih se glivičnih vnetij zunanjege spolovila in nožnice niso enotni. Večina probiotikov vsebuje laktobacile, ki naj bi zavirali rast kandidate. Različne klinične raziskave so dokazale učinkovito delovanje laktobacilov proti kandidam, vendar so preučevale majhen vzorec žensk in niso bile kontrolirane s placebom. Poleg tega so v teh raziskavah proučevali različne seve laktobacilov, ki pa imajo različne učinke na kandido (23). Vujić in sod. so na vzorcu 544 bolnic z glivičnim in drugimi vrstami vnetja nožnice primerjali probiotik z dvema vrstama laktobacilov in placebo. Po šestih tednih zdravljenja so po-

novno vzpostavitev normalne nožnične mikroflore dosegli pri 61,5 % bolnic, ki so prejemale probiotik, in le pri 26,9 % bolnic, ki so prejemale placebo (24). Na manjši skupini 55 bolnic z mikrobiološko dokazano simptomatsko okužbo s kandido pa so Martinez in sod. ugotovili statistično značilno pogostejše klinično in mikrobiološko izboljšanje pri bolnicah, ki so poleg enega odmerka oralnega flukonazola štiri tedne prejemale probiotik, v primerjavi s tistimi, ki so namesto laktobacilov

dobivale placebo (25). Po drugi strani pa Witt s sod., ki je na 150 bolnicah primerjal šestmesečno zdravljenje ponavljajočih se glivičnih okužb samo z vzdrževalnim itrakonazolom, itrakonazolom z laktobacili in homeopatskim zdravljenjem, ni ugotovil dodatnega izboljšanja v skupini z dodanimi laktobacili v primerjavi z itrakonazolom brez probiotika. Zdravljenje pa je v prvih dveh skupinah bistveno uspešnejše od homeopatskega zdravljenja brez azola (18).

LITERATURA

- Mitchell H. Vaginal discharge-causes, diagnosis, and treatment. *BMJ*. 2004; 328 (7451): 1306–8.
- Reljič M. Vnetja ženskih spolovil. In: Borko E, Takač I, eds. *Ginekologija*. Maribor: Univerza v Mariboru, Visoka zdravstvena šola; 2006. p. 143–57.
- Spence D. Candidiasis (vulvovaginal). *Clin Evid (Online)*. 2010. pii: 0815.
- Bauters TG, Dhont MA, Temmerman MI, et al. Prevalence of vulvovaginal candidiasis and susceptibility to fluconazole in women. *Am J Obstet Gynecol*. 2002; 187(3): 569–74.
- Achkar JM, Fries BC. Candida infections of the genitourinary tract. *Clin Microbiol Rev*. 2010; 23 (2): 253–73.
- Peters BM, Yano J, Noverr MC, et al. Candida vaginitis: when opportunism knocks, the host responds. *PLoS Pathog*. 2014; 10 (4): e1003965. doi: 10.1371/journal.ppat.1003965. eCollection 2014.
- Soper DE. Genitourinary infections and sexually transmitted diseases. In: Berek JS, eds. *Berek & Novaks Gynecology*. Philadelphia: Lipincott, Williams & Wilkins; 2012. p. 557–74.
- Sobel JD, Faro S, Force RW, et al. Vulvovaginal candidiasis: epidemiologic, diagnostic, and therapeutic considerations. *Am J Obstet Gynecol*. 1998; 178 (2): 203–11.
- Kitič T. Glivično vnetje spolovil [internet]. Združenje zdravnikov družinske medicine. Zavod za razvoj družinske medicine [citirano 2014 sep 23]. Dosegljivo na: <http://www.drmed.org/wp-content/uploads/2014/06/VII-73.pdf>.
- Ronnqvist PD, Forsgren-Brusk UB, Grahn-Hakansson EE. Lactobacilli in the female genital tract in relation to other genital microbes and vaginal pH. *Acta Obstet*. 2006; 85(6): 726–35.
- Vitali B, Pugliese C, Biagi E, et al. Dynamics of vaginal bacterial communities in women developing bacterial vaginosis, candidiasis, or no infection, analyzed by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and real-time PCR. *Appl Environ Microbiol*. 2007; 73 (18): 5731–41.
- Sobel JD, Chaim W. Vaginal microbiology of women with acute recurrent vulvovaginal candidiasis. *J Clin Microbiol*. 1996; 34 (10): 2497–9.
- Sobel JD. Vulvovaginal candidosis. *Lancet*. 2007; 369(9577): 1961–71.
- Workowski KA, Berman SM. Sexually transmitted diseases treatment guidelines. *MMWR Recommend Rep*. 2006; 55 (R-11): 1–94.
- Pappas PG, Kauffman CA, Andes D, et al. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2009; 48 (5): 503–35.
- Sobel JD, Kapernick PS, Zervos M, et al. Treatment of complicated Candida vaginitis: comparison of single and sequential doses of fluconazole. *Am J Obstet Gynecol*. 2001; 185 (2): 363–9.
- Sobel JD, Wiesenfeld HC, Martens M, et al. Maintenance fluconazole therapy for recurrent vulvovaginal candidiasis. *N Engl J Med*. 2004; 351(9): 876–83.
- Witt A, Kaufmann U, Bitschnau M, et al. Monthly itraconazole versus classic homeopathy for the treatment of recurrent vulvovaginal candidiasis: a randomised trial. *BJOG*. 2009; 116 (11): 1499–1505.

19. Sobel JD. Management of recurrent vulvovaginal candidiasis with intermittent ketoconazole prophylaxis. *Obstet Gynecol.* 1985; 65 (3): 435–40.
20. Lewis JH, Zimmerman HJ, Benson GD, et al. Hepatic injury associated with ketoconazole therapy. Analysis of 33 cases. *Gastroenterology.* 1984; 86 (3): 503–13.
21. Phillips AJ. Treatment of non-albicans *Candida* vaginitis with amphotericin B vaginal suppositories. *Am J Obstet Gynecol.* 2005; 192 (6): 2009–13.
22. Sobel JD, Chaim W, Nagappan V, et al. Treatment of vaginitis caused by *Candida glabrata*: use of topical boric acid and flucytosine. *Am J Obstet Gynecol.* 2003; 189 (5): 1297–1300.
23. Falagas ME, Betsi GI, Athanasiou S. Probiotics for prevention of recurrent vulvovaginal candidiasis: a review. *J Antimicrob Chemother.* 2006; 58 (2): 266–72.
24. Vujic G, Jajac Knez A, Despot Stefanovic V, et al. Efficacy of orally applied probiotic capsules for bacterial vaginosis and other vaginal infections: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2013; 168 (1): 75–9. doi: 10.1016/j.ejogrb.2012.12.031. Epub. 2013 Feb 7.
25. Martinez RC, Franceschini SA, Patta MC, et al. Improved treatment of vulvovaginal candidiasis with fluconazole plus probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *Lactobacillus reuteri* RC-14. *Lett Appl Microbiol.* 2009; 48(3): 269–74. doi: 10.1111/j.1472-765X.2008.02477.x. Epub 2009 Feb 2.

Jerneja Videčnik Zorman¹, Mojca Matičič², Samo Jeverica³, Tomaž Smrkolj⁴

Prostatitis kot spolno prenosljiva bolezen: pristop k diagnostiki in zdravljenju

Prostatitis as a Sexually Transmitted Disease: an Approach to Diagnosis and Treatment

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: prostatitis, diagnostika, zdravljenje

Vnetje prostate je pogosto predvsem pri moških, mlajših od 50 let. Prostatitis na temelju kliničnih in laboratorijskih meril razdelimo na akutni in kronični bakterijski prostatitis, kronični vnetni in nevnetni prostatitis oziroma kronični medenični bolečinski sindrom ter brezsimptomni vnetni prostatitis. Poleg dobro poznanih bakterijskih povzročiteljev se v zadnjem času kot povzročitelji kroničnega prostatitisa omenjajo tudi nekateri neznaki povzročitelji. Prostatitis je tudi spolno prenosljiva bolezen, saj so po nekaterih raziskavah *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum* in *Trichomonas vaginalis* najpogostejši povzročitelj kroničnega vnetja prostate. Diagnostika in zdravljenje prostatitisa sta lahko težavni.

ABSTRACT

KEY WORDS: prostatitis, diagnostic approach, treatment

Prostatic inflammation is a common syndrome especially in men younger than 50 years of age. Based on clinical and laboratory characteristics prostatitis is classified as acute and chronic bacterial prostatitis, chronic inflammatory and non-inflammatory prostatitis or chronic pelvic pain syndrome, and asymptomatic inflammatory prostatitis. In addition to well-known bacteria, atypical pathogens have been identified as causes of chronic prostatitis. According to the reports by several authors *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum* and *Trichomonas vaginalis* are one of the most common pathogens, which make chronic prostatitis a sexually transmitted disease. Diagnosis and treatment of bacterial prostatitis can be challenging.

¹ Dr. Jerneja Videčnik Zorman, dr.med., Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Japljeva ulica 2, 1000 Ljubljana; jerneja.videcnikzorman@kclj.si

² Izr. prof. dr. Mojca Matičič, dr.med., Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Japljeva ulica 2, 1000 Ljubljana

³ Asist. dr. Samo Jeverica, dr.med., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

⁴ Asist. dr. Tomaž Smrkolj, dr.med., Klinični oddelek za urologijo, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana

UVOD

Vnetje prostate predstavlja pomemben zdravstveni problem predvsem pri spolno aktivnih moških, saj je pojavnost velika, pogosto se ponavlja, zaradi bolečin in težav pri mokrenju in spolnosti pa lahko vpliva na kvaliteto življenja (1). Prevalenca prostatitisa je ocenjena na 8,2 %; verjetnost, da bo moški v življenju zbolel s simptomi prostatitisa, je kar 25 % (2–4). Pri moških, mlajših od 50 let, je prostatitis najpogostejši razlog za obisk urologa (5).

Naravni obrambni mehanizmi, ki prostate varujejo pred okužbo, so njeno izločanje protibakterijskih snovi ter spiranje prostatičnega dela sečnice z mokrenjem in semenskim izlivom. Zastajanje izločkov v oddaljenih izvodilih ali zatekanje seča v žlezno tkivo lahko povzročita okužbo, razraščanje veziva ali nastanek prostatičnih kamnov. Raziskave kažejo, da je bakterijski prostatitis najpogosteje posledica okužbe sečil (6, 7). Nevarnostni dejavniki za okužbo so invazivni posegi na sečilih (npr. transrektalna biopsija prostate), zožitev sečnice ali vnetje sečnice, povzročeno s spolno prenosljivimi povzročitelji (8, 9).

RAZVRSTITEV

S terminom prostatitis označujemo štiri različne klinične sindrome; od akutnega vročinskega obolenja, ki zahteva takojšnje protimikrobno zdravljenje, do naključne najdbe pri moškem brez simptomov. Za opredelitev prostatitisa uporabljamo razvrstitev, ki jo je leta 1995 izdal ameriški Nacionalni inštitut za zdravje (angl. *National Institutes of Health, NIH*) in vključuje klinične in laboratorijske značilnosti (tabela 1) (10):

Akutni bakterijski prostatitis

Akutni bakterijski prostatitis predstavlja manj kot en odstotek vseh primerov prostatitisa. Je akutno vročinsko obolenje, ki zahteva takojšnje protimikrobno zdravljenje. Bolnik ima simptome okužbe sečil (boleče mokrenje, pogosto ga sili na vodo) in vnetja prostate (bolečina v presredku, lahko v spolovilu ali zadnjiku) ter sistemske znake okužbe (vročino in splošno slabo počutje). Prostate je na otip otekla in boleča. Zaradi otekle prostate lahko pride do zapore seča, redka zapleta sta absces prostate ali vnetje obmodka. Ocenjujejo, da akutno vnetje v 5–10 % preide v kronično obliko (11).

Tabela 1. Razvrstitev prostatitisa po kriterijih ameriškega Nacionalnega inštituta za zdravje (National Institutes of Health, NIH) (10).

Vrsta	Značilnosti
I. Akutni bakterijski prostatitis	Akutno vnetje prostate z vidnimi vnetnicami in bakterijami v sedimentu seča
II. Kronični bakterijski prostatitis	Kronično vnetje prostate z vnetnicami in bakterijami v izcedku iz sečnice/seču po masaži prostate ali v semenski tekočini
III. Kronični prostatitis/kronični medenični bolečinski sindrom	Simptomi vnetja prostate in:
• vnetni	• vnetnice v izcedku iz sečnice/seču po masaži prostate ali v semenski tekočini
• nevnetni	• odsotnost vnetnic v izcedku iz sečnice/seču po masaži prostate ali v semenski tekočini
IV. Brezsíptomni vnetni prostatitis	Vnetne celice in/ali bakterije v izcedku iz sečnice/seču po masaži prostate, semenski tekočini ali vidne v tkivu prostate pri moškem brez simptomov

Kronični bakterijski prostatitis

Kronični bakterijski prostatitis predstavlja 5–10 % primerov prostatitisa. Simptomi prostatitisa so prisotni več kot tri mesece. Bolniki navadno tožijo, da jih sili na vodo, navajajo boleče mokrenje, imajo bolečino v presredku, spolnem udu ali celo v križu. Značilne so ponavljajoče okužbe sečil, ki jih povzročata isti povzročitelj, kar pa zasledimo pri manj kot polovici bolnikov (12). Med zagoni okužb sečil so bolniki kljub kroničnemu vnetju v žlezi lahko brez težav. Pri bolnikih s ponavljajočimi se okužbami je potrebno izključiti anatomske nepravilnosti v sečilih.

Kronični prostatitis oz. kronični medenični bolečinski sindrom

Kronični prostatitis oz. kronični medenični bolečinski sindrom (vnetni ali nevnetni) predstavlja kar 80–90 % vseh primerov prostatitisa. Bolniki tožijo za dolgotrajnimi bolečinami v mali medenici ali presredku, lahko navajajo tudi težave pri mokrenju. Glede na prisotnost vnetic v izcedku iz sečnice, v seču po masaži prostate ali v semenski tekočini razlikujemo vnetno in nevnetno obliko.

Brezsimptomni prostatitis

Brezsimptomni prostatitis predstavlja približno 10 % vseh prostatitisov. Gre za naključno najdbo pri moškem brez simptomov, ki smo ga pregledovali zaradi drugih težav (npr. biopsija prostate ob zvišani vrednosti prostatičnega antigena).

POVZROČITELJI VNETJA PROSTATE

Najpogostejši povzročitelji akutnega in kroničnega bakterijskega prostatitisa so enterobakterije (*Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Pseudomonas* spp.), manj pogosti pa *Enterococcus* spp. ali *Staphylococcus* spp.

Poleg aerobnih povzročiteljev lahko kronični prostatitis povzročajo tudi anaerobne bakterije (najpogosteje *Peptostrep-*

tococcus spp. in *Bacteroides* spp.), vendar je njihov delež zaradi posebnih pogojev rasti najverjetneje podcenjen (13, 14). Za poskus osamitve anaerobnih bakterij je potrebno vzorce seča, izcedka prostate in semenske tekočine zasejati na posebna anaerobna gojišča, prav tako je potrebna previdnost pri transportu vzorca v mikrobiološki laboratorij.

Pomemben delež kroničnih prostatitisov je posledica spolno prenosljive okužbe. V raziskavi Škerkove s sodelavci, v katero je bilo vključenih 1.442 moških s kroničnim prostatitisom, so kar pri polovici bolnikov dokazali okužbo z bakterijami *Chlamydia trachomatis* v 37,2 % vseh primerov kroničnih prostatitisov, *Trichomonas vaginalis* v 10,5 % ali *Ureaplasma urealyticum* v 5 % (15).

Prevalenca urogenitalne okužbe s *C. trachomatis* pri moških je podobna tisti pri ženskah in je pomemben povzročitelj obolevnosti (16). Prenaša se spolno, okuženi pa so mlajši odrasli, večinoma stari pod 35 let. Poleg vnetja sečnice lahko *C. trachomatis* povzroči tudi kronični prostatitis, raziskujejo pa tudi njen morebiten vpliv na zmanjšano plodnost moških (17–20). Na mišjem modelu so dokazali, da lahko *C. trachomatis* vztraja v tkivu prostate, kjer je deloma zaščitena pred imunskim odgovorom gostitelja. Kronično vnetja prostate tako predstavlja tudi rezervoar okužbe (21). Prostatitis, povzročen s *C. trachomatis*, dokažemo z molekularnimi metodami ali celično kulturo v vzorcu semenske tekočine ali izcedka prostate po masaži in v vzorcu seča po izlivu oz. masaži, ob odsotnosti bakterij v brisu sečnice, odvzetem pred izlivom oz. masažo prostate.

Vnetje prostate, povzročeno s *T. vaginalis*, je pogostejše pri mlajših spolno aktivnih moških s ponavljajočimi se okužbami sečnice (15, 21). Dokazovanje povzročitelja je težavno, potreben je direktni mikroskopski pregled svežih vzorcev in kultura na posebnih gojiščih. V

zadnjem času pride v poštev tudi molekularno dokazovanje povzročitelja.

Možen povzročitelj vnetja obsečnice je tudi *Neisseria gonorrhoeae* (15).

DIAGNOSTIČNI POSTOPKI PRI SUMU NA VNETJE PROSTATE

Za razlikovanje med različnimi vrstami vnetja prostate poleg kliničnih meril uporabljamo tudi laboratorijske preiskave.

Pri diagnostiki akutnega bakterijskega prostatitisa odvezamo seč za nativno preiskavo in kvantitativno urinokulturo; odvezamo tudi kri za hemokulturo ter vnetne kazalce (krvno sliko, C-reaktivni protein (CRP), prokalcitonin (PCT), prostatični antigen (PSA)). Ob sumu na akutno vnetje prostate je masaža prostate prepovedana!

V diagnostiki kroničnega vnetja prostate oz. kroničnega medeničnega bolečinskega sindroma uporabljamo posebne teste.

Test s štirimi čašami (Meares-Stamejev test)

Bolnik mesec dni pred preiskavo ne sme prejemati antibiotika in dva dni pred preiskavo ne sme imeti semenskega izliva, ob preiskavi naj ima poln mehur. Postopek:

- Spolovilo je potrebno dobro umiti, da se prepreči onesnaženje vzorca.
- Odvezamo 5–10 ml prvega curka seča (iz končnega dela sečnice).
- Bolnik iztoči prvih 100–200 ml seča, nato pa zberemo 5–10 ml srednjega curka seča (iz mehurja).
- Eno minuto skozi zadnjik masiramo prostato in v sterilno posodico zberemo izcedek iz prostate (masaža prostate je pogosto suha).
- Takoj po masaži prostate zberemo še 5–10 ml seča.

Vse tri vzorce seča pregledamo nativno in opravimo kvantitativno urinokulturo, ob sumu na neznačilne povzročitelje pa opravi-

vimo še dodatne mikrobiološke preiskave oz. seč zasejemo na posebna gojišča.

Prostatitis potrdimo, kadar je v mikroskopskem preparatu izcedka prostate vidnih ≥ 10 levkocitov v vidnem polju pri 400-kratni povečavi. Če izcedka po masaži ne dobimo, je za vnetje prostate povedno, kadar je v zadnjem vzorcu seča 10 levkocitov na vidno polje več kot v prvem in drugem vzorcu. Če je v izcedku iz prostate ali v tretjem vzorcu seča vsaj 10-krat več bakterijskih kolonij kot v prvem in drugem vzorcu seča, gre za bakterijski prostatitis (23).

Test z dvema čašama

Občutljivost testa je primerljiva s testom s štirimi čašami, ki se v klinični praksi redko uporablja, saj je težko izvedljiv, dolgotrajen in za bolnika neprijeten. Odvezamo vzorec seča pred masažo prostate in po njej (24).

Preiskava seča in semenske tekočine

Odvezamo prvi curek seča in semensko tekočino za nativno mikroskopsko preiskavo in mikrobiološko testiranje. Po raziskavi Budía s sodelavci je občutljivost tovrstne preiskave celo večja v primerjavi s testom s štirimi ali z dvema čašama; pri po Gramu negativnih povzročiteljih je bila občutljivost tega testa 97 % v primerjavi z 82,4 % občutljivostjo pri ostalih testih, pri po Gramu pozitivnih povzročiteljih pa kar 100 % v primerjavi s 16,1 % (25).

Dodatne preiskave

Pri vsakem sumu na spolno prenosljivo okužbo (predvsem pri bolnikih s prostatitisom, mlajših od 35 let, pri starejših z več spolnimi partnerkami/ji, ipd.) opravimo tudi presejalno testiranje na ostale spolno prenosljive okužbe, kot so *C. trachomatis*, urogenitalne mikoplazme, *N. gonorrhoeae*, *Treponema pallidum*, virus hepatitisa B in virus človeške imunske pomanjklivosti.

Vrednosti PSA so zvišane le pri 60 % bolnikov z akutnim in pri 20 % bolnikov s kroničnim vnetjem prostate. Zvišane vrednosti PSA se ob ustreznem zdravljenju in izboljšanju klinične slike premosorazmerno znižajo (26–28).

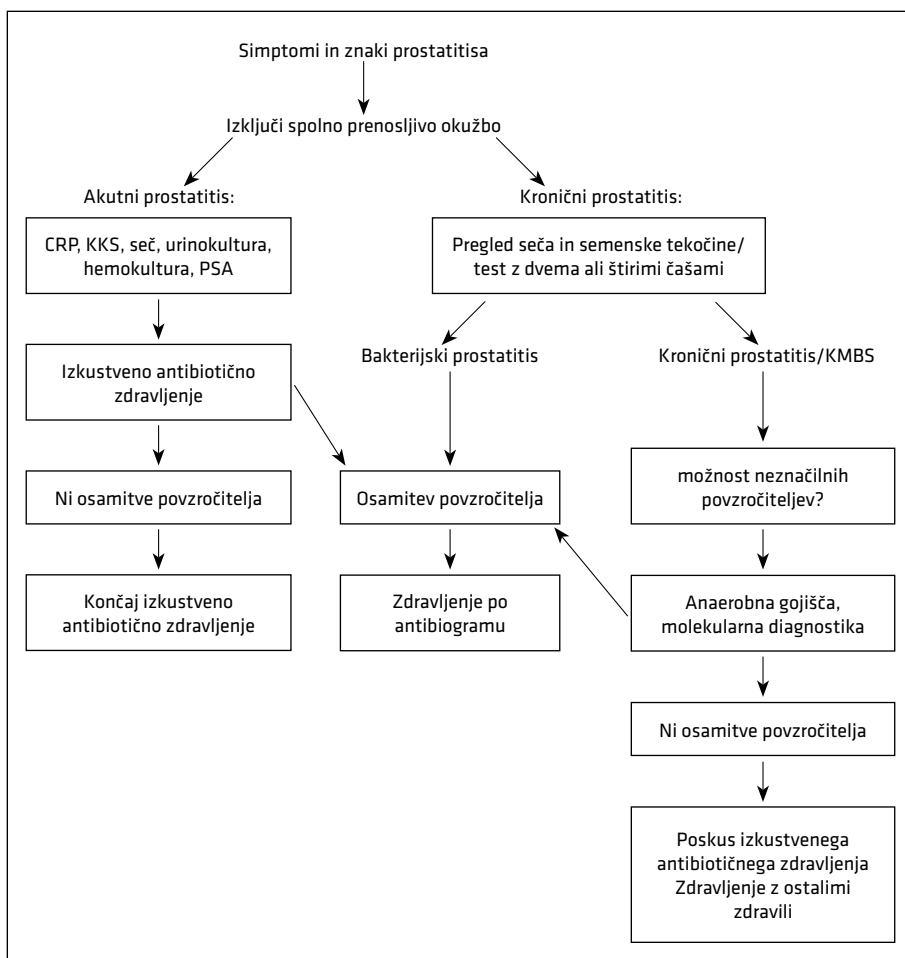
Kultura tkiva obsečnice, dobljenega z biopsijo, ima slabo občutljivost (ker je vnetje po žlezi posejano žariščno) in natančnost (29).

Pri sumu na zaplet akutnega vnetja prostate opravimo transrektalno ultrazvočno preiskavo ali slikanje prostate z ra-

čunalniško tomografijo. Pri kroničnem prostatitisu izključimo morebitne bolezni ali nepravilnosti sečil.

ZDRAVLJENJE

Zaradi posebnih lastnosti prostatičnega tkiva so za zdravljenje vnetja uporabne le nekatere protimikrobne učinkovine. Kapilare v prostati nimajo por ali aktivnega transportnega mehanizma za prenos antibiotikov, zato je ustrezno koncentracijo protimikrobne učinkovine v prostatičnem tkivu in žleznih izvodilih težko doseči. V



Slika 1. Algoritem obravnave bolnika s sumom na prostatitis. PSA – prostatični antigen, CRP – C-reaktivni protein, KMBS – kronični medenični bolečinski sindrom.

kolikšni meri bo antibiotik prodiral v tkivo, je odvisno le od koncentracije zdravila v krvi in njegove difuzije. Molekule učinkovin, ki dobro prehajajo v žlezno tkivo prostate, so majhne, se le v majhnem deležu vežejo na beljakovine, so topne v maščobah in imajo majhen naboj.

V akutno vneto tkivo prostate prodira večina antibiotikov, težavno je predvsem zdravljenje kroničnih oblik. Za zdravljenje bakterijskega prostatitisa so glede na farmakološke značilnosti najbolj primerni fluorokinoloni (ciprofloksacin, levofloksacin, moksifloksacin), saj je dosežena raven učinkovine v tkivu prostate 10–50 % tiste v serumu (30–32). V prostato dobro prodirajo tudi trimetoprim/sulfametoksazol, klindamicin, doksiciklin in azitromicin. Tudi cefalosporini, karbapenemi, piperacilin in nekateri aminoglikozidni antibiotiki dosežejo terapevtske ravni v prostati. Nitrofurantoin v tkivu prostate ne doseže terapevtske koncentracije (33–39). Veliko težavo pri zdravljenju prostatitisa predstavlja vse večja odpornost bakterij, predvsem na fluorokinolone.

Različna priporočila se nekoliko razlikujejo predvsem glede trajanja zdravlje-

nja akutnega in kroničnega prostatitisa (40–45). V primeru akutnega prostatitisa takoj po odvzemu kužnin pričnemo z izkustvenim antibiotičnim zdravljenjem, ki ga ustrezno prilagodimo glede na bolnikove epidemiološke okoliščine. Kadar pa gre za kronični prostatitis, antibiotično zdravljenje odložimo do prejema mikrobioloških izvidov, nato naj bo usmerjeno proti osamljenim povzročiteljem. Kadar je povzročitelj *N. gonorrhoeae*, hkrati zdravimo še verjetno okužbo s *C. trachomatis* ali z urogenitalnimi mikoplazmami. Pri spolno prenosljivih povzročiteljih je hkrati potrebno pregledati oz. zdraviti tudi spolno partnerko oz. partnerja.

V primeru prostatičnega abscesa, večjega od enega centimetra v premeru, je potrebna drenaža oz. transuretralna resekcija prizadetega dela žleze.

Zdravljenje kroničnega prostatitisa oz. kroničnega medeničnega bolečinskega sindroma, kjer morebitnega povzročitelja etiološko nismo opredelili, je težavno. V raziskavi Nickla s sodelavci so le pri tretjini tovrstnih bolnikov v enoletnem opazovalnem obdobju beležili blago izboljšanje (46). V večini primerov poskus

Tabela 2. Priporočeno zdravljenje bakterijskega prostatitisa (40–45). *TMP/SMX* - trimetoprim/sulfametoksazol, *ESBL* - beta laktamaze razširjenega spektra (angl. *extended-spectrum beta-lactamases*).

AKUTNI PROSTATITIS: zdravljenje 2–4 tedne

- Ciprofloksacin 400 mg/12 h iv ali 500 mg/12 h po
 - Levofloksacin 500 mg/24 h iv ali po
 - TMP/SMX 160/800 mg/12 h po
 - Gentamicin 5 mg/kg/24 h iv ± ampicilin 2g/6 h iv
-

KRONIČNI PROSTATITIS: zdravljenje od šest tednov do treh mesecev

- Ciprofloksacin 500 mg/12 h po
 - Levofloksacin 500 mg/24 h po
 - TMP/SMX 160/800 mg/12 h po
-

Po povzročiteljih:

- *Enterococcus* spp.: ampicilin/vankomicin/levofloksacin
 - *Pseudomonas aeruginosa*: ciprofloksacin/piperacilin-tazobaktam/imipenem
 - ESBL poz. enterobakterije: ertapenem
 - *Neisseria gonorrhoeae*: ceftriakson (+azitromicin/doksiciklin)
 - *Chlamydia trachomatis*, urogenitalne mikoplazme: azitromicin/doksiciklin
 - Anaerobi: klindamicin/azitromicin
 - *Trichomonas vaginalis*: metronidazol
-

zdravljenja s protimikrobnimi zdravili ni uspešen. Svetujejo dodatek zaviralca alfa, ki naj bi bil učinkovit predvsem pri bolnikih, ki te učinkovine predhodno še niso prejeli (47). Neposrednih dokazov o učinkovitosti nefarmakoloških metod, tudi kirurških posegov, ni na voljo (48).

ZAKLJUČEK

Prostatitis bolniku predstavlja resno oviro za polnovredno in aktivno življenje,

zdravniku pa nemalokrat težavo pri zdravljenju. Večji del kroničnih prostatitisov ostane etiološko neopredeljen. Kinoloni so zaradi svojih farmakoloških lastnosti najboljša izbira za zdravljenje bakterijskega prostatitisa, veliko težavo pa predstavlja vse večja odpornost bakterij proti tovrstnim antibiotikom. Po izsledkih nekaterih raziskav je lahko večji del kroničnih prostatitisov tudi spolno prenosljiva bolezen.

LITERATURA

1. McNaughton Collins M, Pontari MA, O'Leary MA, et al. Quality of life is impaired in men with chronic prostatitis: the chronic prostatitis collaborative research network. *J Gen Intern Med* 2001; 16: 656–62.
2. Krieger JN, Lee SW, Jeon J, et al. Epidemiology of prostatitis. *Int J Antimicrob Agents* 2008; 31: S85–90.
3. Mehik A, Hellstrom P, Lukkariinen O, et al. Epidemiology of prostatitis in Finish men: a population-based cross-sectional study. *BJU Int* 2000; 86: 443–8.
4. Rizzo M, Marchetti F, Travaglini F, et al. Prevalence, diagnosis and treatment of prostatitis in Italy: a prospective urology outpatient practice study. *BJU Int* 2003; 92: 955–9.
5. Collins MM, Stafford RS, O'Leary MA, et al. How common is prostatitis? A national survey of physician visits. *J Urol* 1998; 159: 1224–8.
6. Fair WR, Parrish RF. Antibacterial substances in prostatic fluid. *Prog Clin Biol Res* 1981; 75: 247–64.
7. Nickel JC, Olson ME, Barbas A, et al. Pathogenesis of bacterial prostatitis in an animal model. *Br J Urol* 1990; 66: 47–54.
8. Millan-Rodriguez F, Palou J, Bujons-Tur A, et al. Acute bacterial prostatitis: two different sub-categories according to a previous manipulation of the lower urinary tract. *World J Urol* 2006; 24: 45–50.
9. Pontari MA1, Joyce GF, Wise M, McNaughton-Collins M. Urologic Diseases in America Project. *Prostatitis. J Urol*. 2007; 177: 2050–7.
10. Krieger JN, Nyberg L Jr, Nickel JC. NIH consensus definition and classification of prostatitis. *JAMA* 1999; 281: 236–7.
11. Yoon BI, Han DS, Ha US, et al. Clinical courses following acute bacterial prostatitis. *Prostate Int* 2013; 1: 89–93.
12. Nickel JC, Moon T. Chronic bacterial prostatitis: an evolving clinical enigma. *Urology* 2005; 66: 2–8.
13. Magri V, Restelli A, Marras E, et al. A severely symptomatic case of anaerobic chronic bacterial prostatitis successfully resolved with moxifloxacin therapy. *Anaerobe* 2010; 16: 206–9.
14. Szöke L, Török L, Dósa E, et al. The possible role of anaerobic bacteria in chronic prostatitis. *Int J Androl* 1998; 21: 163–8.
15. Skerk V, Krhen I, Schonwald S, et al. The role of unusual pathogens in prostatitis syndrome. *Int J Antimicrob Agents* 2004; 24: S53–6.
16. Mackern-Oberti JP, Motrich RD, Bresler ML, et al. Chlamydia trachomatis infection of the male genital tract: an update. *J Reprod Immunol* 2013; 100: 37–53.
17. Skerk V, Krhen I, Cajić V, et al. The role of Chlamydia trachomatis in prostatitis syndrome--our experience in diagnosis and treatment. *Acta Dermatovenerol Croat* 2007; 15: 135–40.
18. Weidner W, Diemer T, Huwe P, et al. The role of Chlamydia trachomatis in prostatitis. *Int J Antimicrob Agents* 2002; 19: 466–70.
19. Ouzounova-Raykova V, Ouzounova I, Mitov IG. May Chlamydia trachomatis be an aetiological agent of chronic prostatic infection? *Andrologia* 2010; 42: 176–81.
20. Mazzoli S, Cai T, Addonisio P, et al. Chlamydia trachomatis infection is related to poor semen quality in young prostatitis patients. *Eur Urol* 2010; 57: 708–14.

21. Mackern Oberti JP, Motrich RD, Bresler ML, et al. Male rodent genital tract infection with *Chlamydia muridarum*: persistence in the prostate gland that triggers self-immune reactions in genetically susceptible hosts. *J Urol* 2011; 186: 1100–6.
22. Abdolrasouli A, Amin A, Baharsefat M, et al. Persistent urethritis and prostatitis due to *Trichomonas vaginalis*: a case report. *Can J Infect Dis Med Microbiol* 2007; 18: 308–10.
23. Meares EM Jr, Stamey TA. Bacterial localisation patterns in bacterial prostatitis and urethritis. *Invest Urol* 1968; 5: 492–518.
24. Nickel JC, Shoskes D, Wang Y, et al. How does the pre-massage and post-massage 2-glass test compare to the Meares-Stamey 4-glass test in men with chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome? *J Urol* 2006; 176: 119–24.
25. Budía A, Luis Palmero J, Broseta E, et al. Value of semen culture in the diagnosis of chronic bacterial prostatitis: a simplified method. *Scand J Urol Nephrol* 2006; 40: 326–31.
26. Schaeffer AJ, Wu SC, Tennenberg AM, et al. Treatment of chronic bacterial prostatitis with levofloxacin and ciprofloxacin lowers serum prostate specific antigen. *J Urol* 2005; 174: 161–4.
27. Sutcliffe S, Nevin RL, Pakpahan R, et al. Prostate involvement during sexually transmitted infections as measured by prostate-specific antigen concentration. *Br J Cancer*; 105: 602–5.
28. Bozeman CB, Carver BS, Eastham JA, et al. Treatment of chronic prostatitis lowers serum prostatespecific antigen. *J Urol* 2002; 167: 1723–6.
29. Lee JC, Muller CH, Rothman I, et al. Prostate biopsy culture findings of men with chronic pelvic pain syndrome do not differ from those of healthy controls. *J Urol* 2003; 169: 584–7.
30. Charalabopoulos K, Karachalios G, Baltogiannis D, et al. Penetration of antimicrobial agents into the prostate. *Chemotherapy* 2003; 49: 269–79.
31. Drusano GL, Preston SL, Van Guilder M, et al. A population pharmacokinetic analysis of the penetration of the prostate by levofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 2046–51.
32. Wagenlehner FM, Kees F, Weidner W, et al. Concentrations of moxifloxacin in plasma and urine, and penetration into prostatic fluid and ejaculate, following single oral administration of 400 mg to healthy volunteers. *Int J Antimicrob Agents* 2008; 31: 21–6.
33. Bergmann M, Lederer B, Takacs F. Tissue concentrations of sulfametrol-trimethoprim in the human prostate. *Urologe A* 1979; 18: 335–7.
34. Perletti G, Skerk V, Magri V, et al. Macrolides for the treatment of chronic bacterial prostatitis: an effective application of their unique pharmacokinetic and pharmacodynamic profile (Review). *Mol Med Rep* 2011; 4: 1035–44.
35. Klotz T, Braun M, Bin Saleh A, et al. Penetration of a single infusion of ampicillin and sulbactam into prostatic tissue during transurethral prostatectomy. *Int Urol Nephrol* 1999; 31: 203–9.
36. Goto T, Makinose S, Ohi Y, et al. Diffusion of piperacillin, cefotiam, minocycline, amikacin and ofloxacin into the prostate. *Int J Urol* 1998; 5: 243–6.
37. Nowick WJ Jr. Levels of cefotaxime in body fluids and tissues: a review. *Rev Infect Dis*. 1982; 4: S346–53.
38. Morita M, Nakagawa T, Suzuki K. Ceftazidime concentration in human prostatic tissue and serum following intravenous injection. *Hinyokika Kyo* 1991; 37 (6): 659–62.
39. Nishikawa G, Ikawa K, Nakamura K, et al. Prostatic penetration of meropenem in humans, and dosage considerations for prostatitis based on a site-specific pharmacokinetic/pharmacodynamic evaluation. *Int J Antimicrob Agents* 2013; 41: 267–71.
40. Lipsky BA, Byren I, Hoey CT. Treatment of bacterial prostatitis. *Clin Infect Dis* 2010; 50: 1641–52.
41. Grabe M, Bartoletti R, Bjerkklund-Johansen HM, et al. Guidelines on Urological Infections. European Association of Urology. 2010. Dosegljivo na: http://www.uroweb.org/guidelines/online-guidelines/?no_cache=1.
42. Sharp VJ, Takacs EB. Prostatitis: diagnosis and treatment. *A Fam Physician* 2010; 82: 397–406.
43. British Association for the Management of Sexual Health and HIV. United Kingdom National Guideline for the Management of Prostatitis 2008. Dosegljivo na: www.bashh.org/guidelines.
44. Čížman M, Beović B. Kako predpisujemo protimikrobna zdravila v bolnišnici. Druga dopolnjena izdaja. Ljubljana: Sekcija za kemoterapijo Slovenskega zdravniškega društva; 2013. p. 87–88.
45. Perletti G, Marras E, Wagenlehner FME, et al. Antimicrobial therapy for chronic bacterial prostatitis. *Cochrane Database Syst Rev* 2013; 8: CD009071.
46. Nickel JC, Downey J, Ardern D, et al. Failure of a monotherapy strategy for difficult chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome. *J Urol* 2004; 172: 551–4.
47. Murphy AB, Macejko A, Taylor A, et al. Chronic prostatitis: management strategies. *Drugs* 2009; 69: 71–84.
48. El-Hakim A, Shah DK, Smith AD. Advanced therapy for prostatitis: minimally invasive and invasive therapies. *Curr Urol Rep* 2003; 1: 44–50.

Miroslav Petrovec¹, Urška Glinšek Biškup², Tina Uršič³

Diagnostika in epidemiologija genitalnih okužb, povzročenih z virusom herpesa simpleksa 1 in 2

Diagnosis and Epidemiology of Herpes simplex 1 and 2 Genital Infections

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: genitalni herpes, virus herpesa simpleksa tipa 1 in 2, spolno prenosljiva bolezen, seroprevalenca

Virusa herpesa simpleksa tipa 1 in 2 sta glavni vzrok razjed na spolovilih po vsem svetu. Večina genitalnih herpetičnih obolenj je vzročno povezana z virusom herpesa simpleksa tipa 2, čeprav je v razvitih državah virus herpesa simpleksa tipa 1 dokazan pri polovici primarnih primerov genitalnega herpesa. Serološka prevalenca okužb z virusom herpesa simpleksa tipa 2 narašča s spolno aktivnostjo od pubertete vse do starosti. V večini primerov okužba poteka brez kliničnih znakov in simptomov. Primarna okužba spolovil z virusi herpesa simpleksa tipa 1 in 2 se lahko kaže s hudo klinično sliko, s pojavom mehurčastih sprememb in razjed na vulvi, nožnici in materničnem vratu pri ženski ter na širšem področju spolovil pri moškem. Neposredne mikrobiološke metode, predvsem dokazovanje genoma virusa herpesa simpleksa, so optimalne metode za dokaz okužb v akutnem obdobju primarnih in povratnih okužb, ko so prisotne razjede. Serološko testiranje je priporočljivo kot pomoč pri diagnozi genitalnega herpesa pri bolnikih s povratno okužbo, ki jo povzročata virusa herpesa simpleksa, pri netipičnih ali že ozdravljenih razjedah in v primeru negativnih rezultatov metod za neposredno določanje virusov herpesa simpleksa. V času, ko so prisotne herpetične razjede, je pomembno izogibanje vsem spolnim odnosom. S protivirusnimi zdravili lahko zmanjšamo izločanje virusa in s tem možnost za prenos okužbe.

¹ Prof. dr. Miroslav Petrovec, dr. med., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana, mirc.petrovec@mf.uni-lj.si

² Asist. dr. Urška Glinšek Biškup, univ. dipl. mikr., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

³ Asist. dr. Tina Uršič, univ. dipl. mikr., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

ABSTRACT

KEY WORDS: genital herpes, herpes simplex virus type 1 and 2, sexually transmitted infection, seroprevalence

Herpes simplex virus types 1 and 2 are the main cause of genital ulcers worldwide. Although herpes simplex virus type 2 is the major cause of genital lesions, herpes simplex virus type 1 accounts for half of new cases in developed countries. The herpes simplex virus type 2 seroprevalence increases with sexual activity from puberty to an old age. In most cases, genital herpes is asymptomatic without clinical signs and symptoms. The primary genital infection with herpes simplex virus types 1 and 2 can be manifested by a severe clinical picture; with the vesicular skin and mucosal changes and ulcerative lesions of the vulva, vagina and cervix in women and in genital region in men. Direct methods of viral genome detection are recommended in acute stage of primary and recurrent infections when ulcers or lesions are evident. Serological testing is recommended as an aid in the diagnosis of genital herpes in patients with reinfection caused by herpes simplex virus in atypical or already healed lesions and in case of negative direct virus detection methods. While herpes lesions are present, all sexual activities should be avoided to prevent the transmission of infection. Antiviral drugs can reduce viral shedding and thus reduce the risk for sexual transmission of the virus.

UVOD

Glavna povzročitelja razjed na spolovilih po vsem svetu sta virusa herpesa simpleksa tipa 1 in 2 (HSV-1 in/ali HSV-2). Večino primerov genitalnega herpesa povzroča HSV-2, čeprav je v razvitih državah pri polovici novoodkritih primarnih primerov genitalnega herpesa dokazan tudi HSV-1 (1). Neonatalna okužba s HSV je redka, vendar zelo resna bolezen, ki lahko privede do smrti novorojenčka. Večina okužb je posledica prenosa HSV-2. Večina genitalnih okužb s HSV je zaradi blagega ali celo brez simptomnega poteka neprepoznanih, kar je pomemben dejavnik tveganja za prenos okužbe. Zdravljenje okuženih in uporaba kondoma zmanjša možnost spolnega prenosa HSV (2).

VIRUS HERPESA SIMPLEKSA

HSV-1 in HSV-2 uvrščamo v družino človeških herpesvirusov in v poddružino alfa herpesvirusov. Genom je v obliki dvojno-vijačne DNA. Virion je sestavljen iz štirih osnovnih gradnikov: elektronsko goste sre-

dice, ki vsebuje DNK, ikozaedrične nukleokapside, tegumenta (matrične beljakovine), tj. amorfne plasti beljakovin, ki obdaja kapsido, in ovojnice z glikoproteini (3).

Genoma HSV-1 in HSV-2 sta si identična v 83 %, zato imata veliko skupnih imunogenih epitopov na zunanjih beljakovinah virusa (4). Virus se razlikujeta v ovojničnem glikoproteinu G (gG1 in gG2), ki izzove tipsko specifičen imunski odgovor. Ker se v telesu pojavijo specifična protitelesa proti HSV-1 (IgG1) in HSV-2 (IgG2), je glikoprotein G pri serološki diagnostiki najpomembnejši dejavnik za razlikovanje virusa herpesa simpleksa tipa 1 in tipa 2 (5).

EPIDEMIOLOGIJA

Okužbe, ki jih povzroča HSV, so razširjene povsod po svetu, pojavljajo se brez sezonskega nihanja. Edini gostitelj in rezervoar virusa je človek. Okužba se prenaša s tesnim stikom, predvsem z neposrednim stikom sluznice ali kože s kužnimi izločki. Virus lahko prenašajo oziroma predsta-

vljajo vir okužbe bolniki ali zdravi nosilci. Slednje je zelo pomembno, kadar poskušamo pojasniti vir prve akutne genitalne okužbe, še posebej kadar pride do okužbe v stabilnem partnerskem odnosu.

Pot prenosa virusa HSV-1 in HSV-2 je različna; povzročata okužbe na različnih delih telesa, vendar pa se lahko simptomi in klinični znaki pri okužbi prekrivajo (1). HSV-1 običajno povzroča okužbe, omejene na ustno-žrelni prostor. Te so najbolj pogoste pri otrocih, starih od šest mesecev do treh let. HSV-2 se ponavadi prenaša s spolnim stikom, zato je pojav protiteles pred puberteto redek (1). Narašča delež genitalnih okužb s HSV-1, vendar je pri genitalnih okužbah s HSV-1 klinični potek lažji, reaktivacije pa so redkejšje kot pri okužbi s HSV-2 (6).

Prekuženost prebivalstva s HSV je visoka. V neonatalnem obdobju se pojavlja predvsem okužba s HSV-2, do obdobja pubertete narašča prekuženost s HSV-1, po puberteti pa s HSV-2 (1).

Oblika okužbe s HSV je odvisna od imunskega statusa okužene osebe. Pri osebah, ki nimajo protiteles proti HSV, se kaže kot primarna okužba. O neprimarni okužbi govorimo, kadar se oseba okuži z enim od tipov HSV, ima pa protitelesa proti drugemu tipu HSV. Kadar pri osebi, ki ima protitelesa proti enemu tipu, dokažemo prisotnost enakega tipa HSV iz patološke spremembe, govorimo o povratni okužbi (1). Pri večini okuženih ostaja virus doživljenjsko v latentnem stanju. Občasno lahko pride do reaktivacije virusa, ki poteka z bolezenskimi znaki in simptomi ali brez njih, take osebe pa predstavljajo rezervoar za prenos okužbe (2). Povratna okužba kot posledica reaktivacije virusa se lahko izrazi s ponovnim zagonom boleznii ali pa poteka brez simptomov (1).

Neonatalna okužba s HSV-1 ali s HSV-2 je redka, vendar zelo resna, smrtno nevarna bolezen. Večina okužb je posledica prenosa HSV-2. Najpogostejši je prenos

pri porodu. Od 60 % do 80 % žensk z novorojenčkom, okuženih s HSV, nima kliničnih znakov genitalnega herpesa v času poroda, prav tako v anamnezi ni podatkov o genitalni okužbi ne pri nosečnici, niti pri partnerju. Tveganje za prenos okužbe HSV na otroka je največje pri ženskah, ki prebolevajo primarno genitalno okužbo s HSV v času poroda (7, 8).

Prevalenca genitalnega herpesa

Za prevalenco genitalnega herpesa in okužbo s HSV-2 in HSV-1 je pomembnih več dejavnikov. V razvitih državah je prekuženost s HSV-1 nižja kot v nerazvitih, zato so te osebe bolj dovzetne za genitalno okužbo s HSV-1 in prispevajo k naraščanju deleža genitalnih okužb s HSV-1 (6). K povečanemu deležu genitalnih okužb s HSV-1 prispeva tudi povečan delež orogenitalnih odnosov pri mladih, ki velja za varnejšega in ga ti dojemajo kot zaščito pred neželjeno nosečnostjo (9).

HSV-2 globalno ostaja še vedno glavni vzrok genitalnega herpesa. Serološka prevalenca HSV-2 se začne povečevati s spolno aktivnostjo v puberteti in narašča do odrasle dobe (10). Za okužbo so bolj sprejemljive ženske; pomembno je predvsem število spolnih partnerjev, ki najbolj vpliva na možnost izpostavitve okužbi. Okužba je bolj pogosta pri osebah, ki živijo v mestih, kot pri osebah, ki živijo na ruralnih področjih (6). Večina ljudi se ne zaveda, da so okuženi, in ti so najpogostejši prenašalci virusa (11). Največja prevalenca je dokazana pri spolnih delavkah in osebah, okuženih z virusom HIV (2). Pri nosečnicah je serološka prevalenca HSV-2 7–40 % (2). Slovenska raziskava iz leta 2003, ki je vključevala 4.000 nosečnic, je pokazala, da je 86,9 % nosečnic v Sloveniji prekuženih s HSV-1 in 9,9 % nosečnic prekuženih s HSV-2. Pri 7,1 % nosečnic so bila prisotna tako protitelesa razreda IgG proti HSV-1 kot tudi proti HSV-2, medtem ko je bilo 11 % nosečnic seronegativnih (12).

Med letoma 2006 in 2008 je na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani potekala raziskava, ki je vključevala 99 moških in 128 žensk, katerih serumi so bili zaradi suma na genitalni herpes poslani iz treh različnih ambulant za spolno prenosljive bolezni na preverjanje serološkega statusa. Rezultati raziskave so pokazali prisotnost protiteles razreda IgG proti HSV (ki vključuje tip 1 in tip 2) v serumih 197 oseb (86,8 %), v serumih 83 moških (83,8 %) in 114 žensk (89,1 %). Protitelesa razreda IgG proti HSV-1 so bila ugotovljena v 158 serumih (69,6 %), v serumih 71 moških (71,7 %) in 87 žensk (68,0 %). Protitelesa razreda IgG proti HSV-2 so bila ugotovljena pri 67 (29,5 %) osebah, v serumih 24 moških (24,2 %) in 43 žensk (33,6 %).

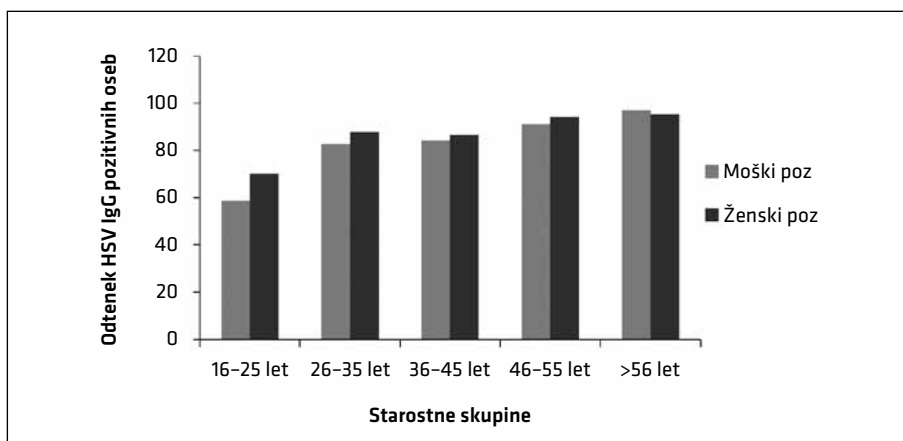
Po podatkih Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani je bilo v zadnjih petih letih (2009–2014) na serološko potrditev genitalnega herpesa iz slovenskih zdravstvenih ustanov, ki obravnavajo spolno prenosljive bolezni, poslanih 1.767 serumov oseb, ki so pripadali 1.528 ženskam in 239 moškim. Testirane ženske so bile v povprečju stare 31,4 let, moški pa

38 let. Protitelesa razreda IgG proti HSV (tipsko nespecifična) so bila dokazana pri 81,6 % moških in pri 85,8 % žensk. Seroprevalenca IgG proti HSV narašča s starostjo pri obeh spolih in pri osebah starejših od 56 let doseže 97 % (slika 1).

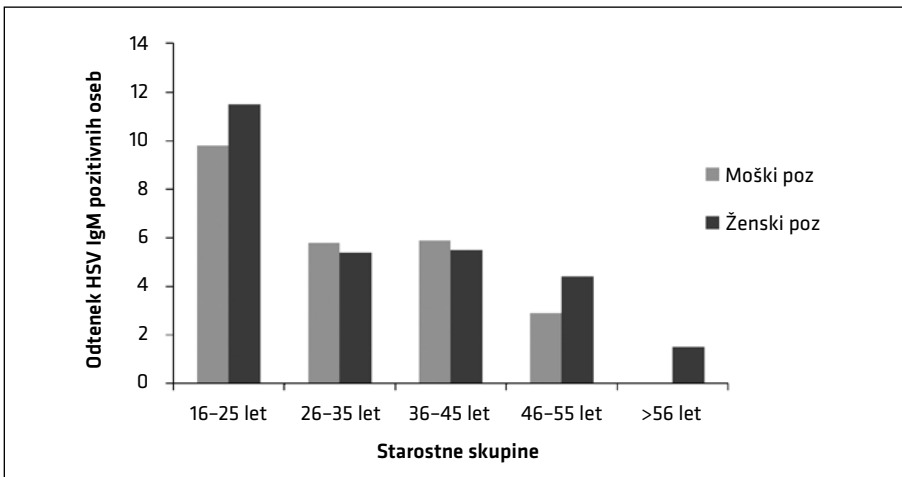
Akutno okužbo oziroma protitelesa razreda IgM proti HSV (tipsko nespecifična) dokažemo pri 14 % moških in 24 % žensk med 16 in 25 letom. Število akutnih okužb, ki jih povzroča HSV, se s starostjo zmanjšuje pri obeh spolih. Pri osebah, starejših od 56 let, protitelesa IgM dokažemo le redko (slika 2).

Prisotnost protiteles razreda IgG proti HSV-2 narašča s starostjo. V starostni skupini 16–25 let približno 95 % oseb obeh spolov nima prisotnih specifičnih protiteles razreda IgG proti HSV-2. S starostjo se prevalenca povečuje in pri osebah, starejših od 56 let, doseže 48,5 %, pri moških doseže 36 %, pri ženskah pa 55 % (slika 3).

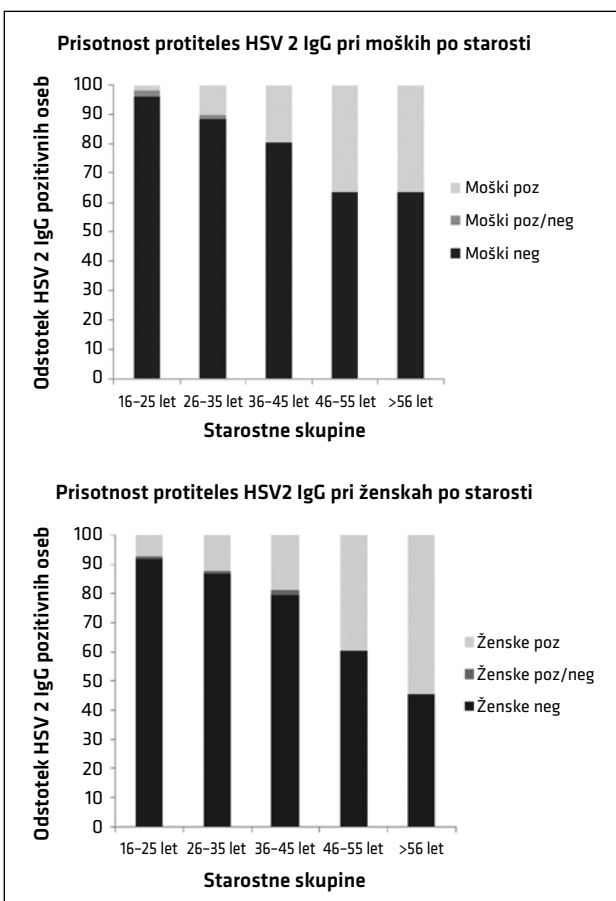
V zadnjih petih letih je bilo iz različnih zdravstvenih ustanov na Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani na molekularno diagnostiko genitalnega herpesa poslano samo 174 brisov vezikul, mehurčkov s sumom na genitalni herpes.



Slika 1. Prisotnost protiteles HSV IgG v serumu moških in žensk po starosti.



Slika 2. Prisotnost protiteles HSV IgM v serumu moških in žensk po starostnih skupinah.



Slika 3. Prisotnost protiteles HSV-2 IgG v serumu moških in žensk po starosti.

Od tega je bilo 59 brisov, ki so pripadali moškim, in 115 brisov, ki so pripadali ženskam. Ženske so bile v povprečju stare 42,4 let, moški pa 41,7 let. DNA HSV-1 smo dokazali pri 19 % oseb, pri 16,9 % moških in pri 20 % žensk. DNA HSV-2 smo dokazali pri 20,7 % oseb, pri 20,3 % moških in pri 20,9 % žensk. Moški, okuženi s HSV-1, so bili mlajši v primerjavi z moškimi, pri katerih smo v vzorcu dokazali prisotnost DNA HSV-2, vendar razlika ni bila statistično značilna (33 let proti 42,8 let; $P = 0,10$). Ženske, okužene s HSV-1, so bile statistično značilno mlajše od žensk, pri katerih smo v vzorcih dokazali DNA HSV-2 (povprečje 27,5 let proti 48,7 let; $P < 0,0001$).

Podatki Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo so zgolj ilustrativni in zanesljivo ne predstavljajo dejanskega stanja v splošni populaciji. Pri interpretaciji je potrebna previdnost, ker so to podatki, ki zajemajo samo visokorizično populacijo, pri katerih je bila klinična slika tudi mikrobiološko preverjena.

KLINIČNA SLIKA GENITALNEGA HERPESA

V večini primerov okužba poteka brez kliničnih znakov in simptomov. Primarna okužba spolovil s HSV-1 ali HSV-2 ima lahko hudo klinično sliko s pojavom mehurčastih sprememb in razjed na vulvi, nožnici in materničnem vratu pri ženski ter na razširjenem območju vratu spolovil pri moškem. Ponavadi se pojavijo 4–7 dni po prenosu virusa pri spolnem odnosu z okuženo osebo (8, 12). Spremembe so zelo boleče, spremlja jih povišana telesna temperatura, bolečine pri mokrenju, povečane in boleče dimeljske bezgavke ter slabo počutje. Bolezen traja do 3 tedne, virus pa se izloča še nadaljnje 3 tedne. Samo na osnovi kliničnih znakov ne moremo ločiti obeh tipov HSV, potrebna je laboratorijska določitev tipa virusa (2). Najpogostejši zaplet je meningitis. Ponovitve genitalne-

ga herpesa so pogoste predvsem v prvem letu po okužbi, so klinično blage in trajajo le nekaj dni (13). Pri moških, ki imajo spolne odnose z moškimi, so spremembe lokalizirane v anorektalnem predelu. Primarna okužba s HSV-2 pri osebi, ki že ima protitelesa proti HSV-1, se običajno kaže v milejši klinični obliki.

Okužba s HSV pri novorojenčku povzroča hude klinične slike z veliko smrtnostjo in hudimi nevrološkimi posledicami. Klinično je neonatalni herpes omejen na kožo, oči in sluznice. V najhujših primerih pride do razsoja virusa s prizadetostjo številnih organov, vključno z osrednjim živčevjem, pljuči, jetri in nadledvičnimi žlezami. Značilen je mehurčast izpuščaj na raznih delih kože. Smrtnost pri nezdravljenih novorojenčkih je okoli 50 % (14).

LABORATORIJSKA DIAGNOSTIKA GENITALNIH OKUŽB Z VIRUSI HERPESA SIMPLEKSA

Genitalni herpes zdravniki navadno prepoznajo na podlagi značilnih herpetičnih razjed na spolovilih. Laboratorijska diagnostika pa je kljub temu pogosto potrebna pri neznačilnih kliničnih znakih, saj lahko mehurčaste spremembe na spolovilih povzročajo tudi drugi povzročitelji. Laboratorijska diagnostika je premalo uporabljana, saj bolniki prihajajo na pregled v ambulantno v različnih stadijih bolezni in so klinični znaki lahko neznačilni. Po priporočilih različnih smernic za laboratorijsko diagnostiko genitalnega herpesa so za bolnike s simptomi najprimernejše metode pomnoževanja nukleinske kisline in osamitev virusa na celični kulturi. V primeru, da teh testov ne moremo izvajati, lahko določamo antigene virusa z metodo neposredne imunofluorescence ali testom ELISA, pomembno je, da določimo tudi tip HSV (15). Testiranje brisov oseb brez znakov okužbe zaradi preprečevanja prenosa virusa ni primerno, saj se virus ne izloča ves čas. Pri osebah, ki ne

kažejo znakov okužbe, in ostalih v tveganih skupinah (nosečnice pred porodom, ki so v nevarnosti za okužbo s HSV; moški, ki imajo spolne odnose z moškimi; okuženi z virusom HIV) je priporočena uporaba seroloških metod. Pomembno je, da le-te razlikujejo med obema tipoma HSV. Kombinacija neposrednih in seroloških metod omogoča ločevanje med primarnimi in povratnimi okužbami s HSV (16, 17). Citološki in neposredni mikroskopski pregledi vzorcev (PAP-test, Tzankov test) zaradi nizke občutljivosti in specifičnosti niso priporočljivi za diagnostiko okužbe s HSV (16–18).

Vsak diagnostični test mora biti v laboratoriju pred uporabo ustrezno preverjen (validiran), tj. narejena mora biti primerjava z že vpeljanim testom (t. i. »zlatim standardom«) (15).

Odvzem in transport vzorcev

Za diagnostiko genitalnih okužb s HSV pregledujemo vzorce aktivnih herpetičnih sprememb. Pred odvzemom brisa je potrebno z odvzemnega mesta odstraniti nekrotično tkivo, odvezamo lahko postržek ali bris spremembe. Ker izločanje virusa ni stalno, pregledovanje brisov pri osebah brez simptomov ni smiselno (16).

Pri svežih razjedah je najprimernejša kužnina tekočina iz mehurčkov, ki jo sterilno aspiriramo in z njo hkrati pošljemo še bris dna mehurčka. Pri starejših razjedah je najbolje, da počakamo na pojav svežih razjed ali mehurčkov in potem vzamemo vzorec (16).

Bris takoj po odvzemu vstavimo v posebno transportno gojišče za viruse (TGV) in ga prenesemo v laboratorij pri 4 °C. V primeru, da transport traja več kot 48 ur, je priporočljivo shranjevanje pri -70 °C, vzorce lahko pošljemo na ledu v hladilni torbi, vendar ne smejo zamrzniti (16). Aspirat tekočine mehurčkov vzamemo in pošljemo v sterilni brizgi. Kri odvezamo v epruveto z antikoagulantom EDTA.

Ostali primerni vzorci so še bris materničnega vratu, uretre in vagine (16).

Metode za neposredno določanje HSV

Neposredno lahko virusne antigene dokažemo z metodo direktne imunofluorescence, virusno nukleinsko kislino (virusno DNK) dokazujemo z molekularnimi metodami ali pa virus osamimo v celični kulturi, ki je zlati standard v laboratorijski diagnostiki HSV.

Za dokaz virusne DNK v vzorcih spolovil bolnikov s herpetičnimi razjedami so najprimernejše molekularne metode. Te metode so visoko občutljive in specifične, vendar so drage in zahtevajo dobro usposobljen kader. PCR v realnem času omogoča hiter dokaz, kvantifikacijo in tipizacijo HSV DNK (16, 17). Molekularne metode so uspešne tudi pri slabših pogojih transporta in manj kvalitetnih vzorcih. Izločanje virusa lahko dokažemo tudi pri osebah brez simptomov, vendar se moramo zavedati, da negativen rezultat ne pomeni, da okužbe s HSV ni, saj se virus ne izloča ves čas (16). V ZDA so s strani zvezne agencije za hrano in zdravila (FDA) odobrene tri metode z visoko specifičnostjo in občutljivostjo (18). Smernice Ameriškega centra za preprečevanje in obvladovanje bolezni (CDC) dovoljujejo tudi uporabo »in-house« PCR testov in ostalih komercialno dostopnih kompletov reagentov. Predpogoj je, da so testirani na že opredeljenih vzorcih, dobro optimizirani in preverjeni s strani laboratorija (16, 19).

Neposredna imunofluorescenca je hitra metoda, ki omogoča ločevanje tipov HSV. Slabosti metode so, da je draga in manj občutljiva kot molekularne metode (15, 16). V primerjavi s kulturo je občutljivost 70–90 % pri bolnikih, ki imajo klinične znake, in ni primerna pri osebah brez kliničnih znakov (16).

Osamitev virusa na celični kulturi se lahko izvaja le v posebej opremljenih la-

boratorijih. Izvedba je zahtevna in dolgotrajna, ima nizko občutljivost, je draga in uporabna predvsem za primarne okužbe. Najprimernejši vzorec je tekočina iz svežih mehurčkov. Za uspešno osamitev je zelo pomemben hiter transport vzorcev v primernem transportnem gojišču in neprekinjena hladna veriga, da ohranimo žive viruse in njihovo infektivnost (16, 18). Prednost osamitve je v visoki specifičnosti. Virusne izolate lahko uporabimo za tipizacijo in testiranje fenotipske občutljivosti na protivirusna zdravila (16).

Metode za posredno določanje HSV Serološke metode

Za dokazovanje protiteles proti HSV se običajno uporablja encimsko-immunski test (ELISA). Testi, ki temeljijo na tipsko specifičnem glikoproteinu G (gG-1 za HSV-1 in gG-2 za HSV-2), omogočajo ločevanje protiteles proti posameznemu tipu HSV, vendar pa ni mogoče določanje protiteles IgM. S testi, ki temeljijo na ostalih skupinah glikoproteinov (gA-gI), ne moremo ločiti protiteles proti posameznemu tipu HSV, lahko pa določamo tudi protitelesa IgM. Določeni epitopi na ostalih glikoproteinih (gB, gC, gD in gE) so skupni obema tipoma virusa, zato lahko prihaja do navzkrižne reaktivnosti (16).

Serološko testiranje splošne populacije za ugotavljanje imunskega statusa ni priporočljivo. Glede na smernice se serološko testiranje priporoča v naslednjih primerih (16, 17):

- kot pomoč pri diagnozi in razločevanju genitalnega herpesa pri bolnikih s primarno in povratno HSV okužbo,
- pri netipičnih ali že ozdravljenih lezijah in v primeru negativnih rezultatov metod za neposredno določanje HSV,
- za spremljanje spolnih partnerjih bolnikov z genitalnim herpesom zaradi nevarnosti prenosa virusa in
- za določanje imunskega statusa oseb v tveganih skupinah (okuženi z virusom

HIV, okuženi z ostalimi spolno prenosljivimi boleznimi in osebe, ki imajo več spolnih partnerjev).

Serološko testiranje je uporabno za potrditev primarne okužbe pri bolniku, ki ima herpetične razjede na spolovilih. Če mu v vzorcu razjede na spolovilih z neposrednimi metodami dokažemo HSV enega tipa, protitelesa proti istemu tipu HSV pa niso prisotna, je to dokaz primarne okužbe z določenim tipom HSV. Laboratorijsko lahko primarno okužbo s HSV dokažemo tudi s serokonverzijo protiteles. Vendar lahko za razliko od ostalih virusnih okužb do nastanka protiteles IgM proti HSV pride tudi do 3 mesece po okužbi, verjetno zaradi lokalizirane okužbe sluznic. Posledično serološko testiranje ni optimalno za dokaz akutne okužbe s HSV, hkrati pa so testi za dokazovanje IgM protiteles slabo občutljivi. Protitelesa IgM lahko dokažemo tudi pri povratni okužbi, zato ne moremo ločiti med primarno in povratno okužbo (16, 17).

Dokaz protiteles proti HSV-2 podpre diagnozo genitalnega herpesa, pri dokazu protiteles proti HSV-1 pa ne moremo vedeti, ali gre za spolno preneseno ali ustno-žrelno okužbo. Zaradi visoke prekuženosti prebivalstva s HSV-1, dokaz protiteles proti HSV-1 ni primeren za dokaz genitalnega herpesa povzročene s HSV-1 (16).

Pri nosečnicah rutinsko presejalno serološko testiranje ni priporočljivo. Če ima njen spolni partner zgodovino genitalnega herpesa, se tudi pri nosečnicah brez znakov okužbe priporoča serološko dokazovanje protiteles proti HSV (8). Ugotavljamo tudi ujemanje serološkega statusa s spolnim partnerjem. V kolikor se ne ujemata, svetujemo uporabo kondoma (pri partnerjih s protitelesi proti HSV-2) in odsvetujemo orogentialne odnose (pri partnerjih s protitelesi proti HSV-1). Serološko negativnim nosečnicam se svetuje previdnost zaradi možnosti okužbe v nosečnosti (16, 17). V primeru dokaza sero-

konverzije protiteles pred porodom lahko porod poteka vaginalno (20).

Pri novorojenčku serološka diagnostika okužbe s HSV ni primerna, ker ne moremo ločevati med materinimi protitelesi, prenesenimi preko posteljice, in njegovimi lastnimi protitelesi (16).

Za dokaz HSV-2 specifičnih protiteles so na voljo tudi hitri testi, ki temeljijo na lateralnem toku seruma skozi membrano, ki vsebuje antigene gG1 ali gG2. Prednost testa je hitrost, podobno kot test ELISA ima visoko občutljivost in specifičnost, je pa precej dražji (16).

PREPREČEVANJE

V času, ko so prisotne herpetične razjede, se svetuje izogibanje vsem spolnim odno-

som, če so prisotni ostali simptomi pa je obvezna uporaba kondomov. S protivirusnimi zdravili lahko zmanjšamo izločanje virusa in s tem možnost za prenos okužbe (2).

Če pride do okužbe nosečnice v zadnjem trimesečju in do pojava kliničnih znakov genitalnega herpesa, večina smer-nic priporoča porod s carskim rezom (20, 21). Pri ženskah s povratnim genitalnim herpesom je tveganje za okužbo plodu ali novorojenčka zelo majhno. Brezsimplomnih okužb pri nosečnicah v času poroda ne moremo diagnosticirati (14, 21).

Cepiva proti HSV so še v fazi preizkušanja, večina poskusnih cepiv je bilo ne-učinkovitih proti genitalnemu herpesu (14).

LITERATURA

1. Roizman B, Knipe DM, Whitley RJ. Herpes Simplex Viruses. In: Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields Virology*. 2. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer business; 2013. p. 1823– 97.
2. Gupta R, Warren T, Wald A. Genital herpes. *Lancet*. 2007; 370 (9605): 2127– 37.
3. Whitley RJ, Roizman B. Herpes simplex virus infections. *Lancet*. 2001; 357 (9267): 1513– 8.
4. Dolan A, Jamieson FE, Cunningham C, et al. The genome sequence of herpes simplex virus type 2. *Journal of virology*. 1998; 72 (3): 2010– 21.
5. Strick L, Wald A. Type-specific testing for herpes simplex virus. *Expert review of molecular diagnostics*. 2004; 4 (4): 443– 53.
6. Xu F, Sternberg MR, Kottiri BJ, et al. Trends in herpes simplex virus type 1 and type 2 seroprevalence in the United States. *Jama*. 2006; 296 (8): 964– 73.
7. Pirš M, Paro Panjan D. Okužbe z virusom herpes simpleks pri nosečnicah in novorojenčkih. *Medicinski raz-gledi*. 2006; 45: 53: 97– 108.
8. Garland SM, Steben M. Genital herpes. *Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology*. 2014.
9. Halpern-Felsher BL, Cornell JL, Kropp RY, et al. Oral versus vaginal sex among adolescents: perceptions, attitudes, and behavior. *Pediatrics*. 2005; 115 (4): 845– 51.
10. Xu F, Schillinger JA, Sternberg MR, et al. Seroprevalence and coinfection with herpes simplex virus type 1 and type 2 in the United States, 1988-1994. *The Journal of infectious diseases*. 2002; 185 (8): 1019– 24.
11. Mertz GJ, Benedetti J, Ashley R, et al. Risk factors for the sexual transmission of genital herpes. *Annals of internal medicine*. 1992; 116 (3): 197– 202.
12. Koren S, Meško Meglič K, Jeverica S. Herpesvirusi. In: Poljak M, Petrovec M, eds. *Medicinska virologija*. Lju-bljana: Medicinski razgledi; 2011. p. 15– 30.
13. Benedetti J, Corey L, Ashley R. Recurrence rates in genital herpes after symptomatic first-episode infection. *Annals of internal medicine*. 1994; 121 (11): 847– 54.
14. Kimberlin DW. Neonatal herpes simplex infection. *Clinical microbiology reviews*. 2004; 17 (1): 1– 13.
15. Domeika M, Bashmakova M, Savicheva A, et al. Guidelines for the laboratory diagnosis of genital herpes in eastern European countries. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = Europe-an communicable disease bulletin*. 2010;15 (44).

16. Belec A. Herpes simplex virus (HSV) infections. Laboratory diagnosis of sexually transmitted infections, including human immunodeficiency virus. World Health Organization. 2013. Dosegljivo na: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/85343/1/9789241505840_eng.pdf?ua=1
17. Patel R, Alderson S, Geretti A, et al. 2010 European guideline for the management of genital herpes. 2010. Dosegljivo na: http://www.iusti.org/regions/europe/pdf/2010/Euro_Guideline_2010_herpes.pdf.
18. Anderson NW, Buchan BW, Ledebner NA. Light microscopy, culture, molecular, and serologic methods for detection of herpes simplex virus. *Journal of clinical microbiology*. 2014; 52 (1): 2– 8.
19. Centers for Disease Control and Prevention. Genital HSV infections. Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines, 2010. *MMRW* 2010; 59 (No. RR-12): 20– 5.
20. Straface G, Selmin A, Zanardo V, et al. Herpes simplex virus infection in pregnancy. *Infectious diseases in obstetrics and gynecology*. 2012; 2012: 385697.
21. Brown ZA, Wald A, Morrow RA, et al. Effect of serologic status and cesarean delivery on transmission rates of herpes simplex virus from mother to infant. *Jama*. 2003; 289 (2): 203– 9.

Darja Duh¹, Simona Senegačnik², Andrej Golle³, Mojca Cimerman⁴

Okužbe anogenitalnega predela z virusom varičela zoster

Varicella-zoster Virus in the Anogenital Region

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: herpes zoster, VZV, anogenitalni predel, PCR v realnem času, sočasno dokazovanje (multipleks)

IZHODIŠČA. Herpes zoster je klinično stanje, ki nastopi zaradi reaktivacije latentne okužbe z virusom varičele zostra (VZV). V literaturi obstaja nekaj opisov zostra na spolovilih. Nedavno so dokazali, da je VZV prisoten pri 2,9 % anogenitalnih vzorcev bolnikov s sumom na okužbo s herpesvirusi. Zanimalo nas je, ali se VZV pojavlja pri anogenitalnih vzorcih bolnikov v Sloveniji. METODE. V raziskavo smo vključili vzorce brisov, poslanih z Oddelka za kožne in spolne bolezni Univerzitetnega kliničnega centra v Mariboru. Prisotnost herpesvirusne DNK smo dokazovali z verižno reakcijo s polimerazo (angl. *polymerase chain reaction*, PCR) v realnem času za sočasno dokazovanje HSV-1, HSV-2 in VZV. DNK VZV smo potrdili z dodatnim PCR v realnem času na aparatu Light-Cycler® 2.0. Podatke smo zbrali v računalniškem paketu MBL in K21 analize, SRC Infonet. REZULTATI. V obdobju treh zaporednih let smo testirali 421 vzorcev brisov iz različnih predelov telesa. V 46,6 % vzorcev smo dokazali prisotnost herpesvirusne DNK. Od tega je bilo 42,3 % vzorcev pozitivnih na VZV, 37,8 % na HSV-1 in 19,9 % na HSV-2. Med vsemi pozitivnimi vzorci na VZV smo zbrali skupno 12 takih, ki so jih odvzeli na anogenitalnem predelu. V vseh 12 vzorcih smo DNK VZV potrdili z dodatno metodo. V 6 od 12 primerov so naročili preiskavo PCR na HSV-1 in HSV-2. ZAKLJUČKI. Rezultati naše raziskave in svetovne literature govorijo v prid uporabi PCR v realnem času za sočasno dokazovanje herpesvirusov. Pritrdilno smo prispevali k mnenju, da je smiselno v diferencialno diagnostiko genitalnih virusnih okužb vključiti dokazovanje VZV.

ABSTRACT

KEY WORDS: herpes zoster, VZV, anogenital region, real time PCR, multiplex

BACKGROUND. Herpes zoster is a clinical manifestation of the reactivation of varicella zoster virus (VZV). Herpes zoster of the genital area is a rarely reported condition.

¹ Asist. dr. Darja Duh, univ. dipl. mikrobiol., Oddelek za medicinsko mikrobiologijo Maribor, Center za medicinsko mikrobiologijo, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Prvomajska ulica 1, 2000 Maribor, darja.duh@nlzoh.si

² Asist. Simona Senegačnik, dr. med, spec. dermatovenerol., Oddelek za kožne in spolne bolezni, Univerzitetni klinični center Maribor, Ljubljanska ulica 5, 2000 Maribor

³ Asist. mag. Andrej Golle, dr. med., spec. klin. mikrobiol., Oddelek za medicinsko mikrobiologijo Maribor, Center za medicinsko mikrobiologijo, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Prvomajska ulica 1, 2000 Maribor

⁴ Mojca Cimerman, univ. dipl. mikrobiol., Oddelek za medicinsko mikrobiologijo Maribor, Center za medicinsko mikrobiologijo, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Prvomajska ulica 1, 2000 Maribor

Recently, however, it was shown that VZV DNA is present in 2.9 % of anogenital samples from patients with suspected herpesvirus infection. We tested whether VZV can be detected in anogenital samples from patients in Slovenia. METHODS. Swab samples from the Department of Dermatology and Venereal Diseases of the University Medical Centre Maribor were included in the study and tested for the presence of herpesviral DNA by real time polymerase chain reaction (PCR). We used a multiplex method for simultaneous detection of HSV-1, HSV-2 and VZV. VZV DNA was amplified additionally with another specific real time PCR on LightCycler®. Data were analyzed with the MBL and K21 analyze software packages by SRC Infonet. RESULTS. During the period of three consecutive years, we have tested 421 swabs sampled from different parts of the body. Overall, the herpesviral DNA was detected in 46.6 % of samples. VZV, HSV-1 and HSV-2 DNA were shown in 42.3 %, 37.8 % and 19.9 % of swabs, respectively. From all VZV positive samples, 12 were taken in the anogenital region. In these samples, the presence of VZV DNA was proved by additional PCR. For 6 of 12 selected cases, only PCR for HSV-1 and HSV-2 was requested. CONCLUSIONS. The results of our study and those in the published literature confirm the importance of multiplex PCR for the detection of different herpesviruses. Further on, we have demonstrated that VZV needs to be considered as a differential diagnosis for genital herpetic lesions.

IZHODIŠČA

Virus varičele zostra (VZV) uvrščamo med herpesviruse. V družino *Herpesviridae* prištevamo še sedem virusov: virus herpes simpleksa tip 1 in 2 (HSV-1 in HSV-2), virus Epstein-Barr (EBV), virus citomegalije (CMV) ter človeške herpesviruse 6 do 8 (HHV-6, HHV-7 in HHV-8). Pri ljudeh povzročajo herpesvirusi lokalizirane ali generalizirane mehurčaste izpuščaje kože in sluznic (npr. *herpes labialis*, genitalni herpes, norice in pasovec), infektivsko mononukleozo, eksantema subitum ter nekatere druge bolezni (1). Posebnost herpesvirusov je njihova sposobnost trajne ali latentne okužbe senzoričnih ganglijev, epitelijskih celic in limfocitov, ki sledi primarni litični okužbi celic (2). Virusoma EBV in HHV-8 pripisujejo tudi onkogene lastnosti (3).

Herpesvirusi so razširjeni po vsem svetu z izjemo HHV-8, ki je zemljepisno omejen večinoma na afriški kontinent (4). Prvemu stiku s herpesvirusi smo ljudje izpostavljeni na različne načine. Največkrat se okužimo s kapljičnim prenosom s sli-

no ob tesnem stiku z okuženo osebo. CMV se lahko prenaša s krvjo ali s presajenimi organi, obstaja pa tudi možnost prenosa tega virusa na plod preko placente, med porodom ali po porodu z materinim mlekom (5). HSV-2 uvrščamo med spolno prenosljive viruse. S spolnimi odnosi se lahko prenašata še virusa CMV in HHV-8 in v zadnjem času vse pogosteje tudi HSV-1, kar je najverjetneje odraz spremenjene spolne prakse pri mladostnikih. Le-ti pogosteje občujejo oralno-genitalno in pri spolnih odnosih uporabljajo kondome (6).

HSV-1 in HSV-2 povzročata genitalni herpes, ki v svetu velja za enega izmed glavnih vzrokov razjed (ulkusov) na spolovilih (7). Drugi pomembni vzroki za nastanek genitalnih razjed so bakterijske okužbe, predvsem bolezni, kot so sifilis, čankroid, limfogranuloma venerum ter nekatere sekundarne bakterijske ali glivne okužbe. Redkeje nastanek ulkusov pripisujemo drugi etiologiji, ki ni mikrobiološkega izvora (8). V literaturi obstaja tudi nekaj zapisov o redkih primerih tako imenovanega genitalnega zostra, ki je prav

tako lahko vzrok za nastanek razjed na anogenitalnem predelu telesa (9–12).

Herpes zoster je klinično stanje, ki se pojavi zaradi reaktivacije latentne okužbe živčnih ganglijev z VZV. Pekoči bolečini v prizadetem predelu po nekaj dneh sledi kožni izpuščaj, ki je enak kot pri noricah (tj. primarna okužba z VZV). Spremembe na koži so navadno razporejene enostransko na zgornjem delu trupa ali glave, lahko se pojavijo tudi na očeh ali v ustni votlini (13). Anogenitalni predel ni značilno mesto za pojavljanje zostra. Z uporabo laboratorijskih mikrobioloških tehnik za sočasno dokazovanje HSV-1, HSV-2 in VZV so v retrogradni raziskavi dokazali, da je DNK VZV prisotna pri 2,9 % (65 od 2225) anogenitalnih vzorcev bolnikov, ki so iskali pomoč zdravnika (14). Na osnovi njihove raziskave in objavljene literature so predlagali, da bi morali dokazovanje VZV vključiti v rutinsko diagnostiko virusnih genitalnih okužb.

Zato nas je zanimalo, ali se VZV pojavlja pri anogenitalnih vzorcih bolnikov v Sloveniji in koliko je takih primerov. Vzorce smo dobili z Oddelka za kožne in spolne bolezni Univerzitetnega kliničnega centra v Mariboru (UKC Maribor). Za namene rutinske diagnostike HSV-1, HSV-2 in VZV v Laboratoriju za klinično molekularno diagnostiko (v nadaljevanju laboratorij) Nacionalnega laboratorija za zdravje, okolje in hrano (NLZOH) uporabljamo verižno reakcijo s polimerazo v realnem času (angl. *real time PCR*) za sočasno dokazovanje omenjenih treh herpesvirusov. V sodelovanju z zdravnikom specialistom smo naredili seznam tistih vzorcev, v katerih smo dokazali DNK VZV in ki bi lahko ustrezali herpes zostru na anogenitalnem predelu. Rezultate smo potrdili z dodatnim PCR v realnem času, s katerim specifično pomnožimo le odsek genoma VZV.

METODE

V raziskavo smo vključili vzorce brisov, ki smo jih sprejeli v laboratorij v triletnem

obdobju od 1. januarja 2011 do 31. decembra 2013. Upoštevali smo tiste vzorce, ki so jih poslali z Oddelka za kožne in spolne bolezni, UKC Maribor, z naročeno vrsto preiskave PCR na HSV-1 in HSV-2 ali PCR na HSV-1, HSV-2 in VZV ali PCR samo na VZV. Za vsakega bolnika so poslali po en vzorec brisa.

Brise smo ob sprejemu v laboratorij po potrebi zalili s fiziološko raztopino do največ 2 ml in jih shranili v hladilniku pri 4 °C za največ 1 dan. Z vzorci vedno rokujemo v mikrobiološki komori druge varnostne stopnje in pri tem upoštevamo navodila za delo v molekularnem biološkem laboratoriju.

Ekstrakcijo nukleinskih kislin (NK), tj. DNK in RNK, smo izvedli po navodilih proizvajalca, in sicer smo uporabili komercialni komplet reagentov RTP® DNA/RNA Virus Mini Kit (STRATEC Molecular GmbH, Berlin, Nemčija). Princip ekstrakcije temelji na uporabi posebnih kolon s silikagelno membrano, na katero se zaradi kemijskih lastnosti vežejo NK.

V ekstrahirani celokupni DNK smo dokazovali prisotnost herpesvirusne DNK s komercialno dostopno metodo PCR v realnem času LightMix® Kit HSV-1/2 / VZV (Tib MolBiol, Berlin, Nemčija). Komplet vsebuje začetne oligonukleotide in hibridizirajoče sonde ter interno in pozitivno kontrolo. Za izvedbo reakcije je potrebno uporabiti še encim v kompletu reagentov LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe, kot to narekujejo navodila za izvedbo metode. S to metodo sočasno pomnožimo 214 baznih parov (bp) dolg odsek *pol* gena HSV-1, 215 bp dolg odsek *pol* gena HSV-2 in 196 bp dolg odsek *orf29* gena VZV.

Vse vzorce, v katerih smo na ta način dokazali DNK VZV in so bili odvzeti na anogenitalnem predelu, smo ponovno testirali na prisotnost VZV. Uporabili smo specifično metodo PCR v realnem času RealStar® VZV PCR Kit 1.2 (Altona Dia-

agnostics, Hamburg, Nemčija), ki vsebuje vse reagentne za izvedbo testa. Z metodo pomnožimo določen del genoma, ki ga proizvajalec v navodilih sicer ne navede, zapiše pa, da metoda temelji na principu delovanja hidrolizirajočih sond. Vse reakcije smo izvedli in analizirali na aparatu LightCycler® 2.0 (Roche Diagnostics, Indianapolis, ZDA).

Podatke o pošiljatelju, vrsti uporabljene metode in rezultatu za vsa tri leta smo zbrali v računalniških programih MBL in K21 analize, SRC Infonet d.o.o.

REZULTATI

V triletnem testnem obdobju smo testirali 421 vzorcev brisov iz različnih predelov telesa, ki so jih odvzeli na Oddelku za kožne in spolne bolezni, UKC Maribor. V 46,6 % (196/421) vzorcev smo dokazali prisotnost herpesvirusne DNK. Od tega je bilo 42,3 % (83/196) vzorcev pozitivnih na VZV, 37,8 % (74/196) pozitivnih na HSV-1 in 19,9 % (39/196) vzorcev pozitivnih na HSV-2 kot prikazuje tabela 1. Soča-

snih okužb z dvema herpesvirusoma nismo dokazali.

Med vsemi vzorci, pozitivnimi na VZV, smo izbrali tiste, ki so jih odvzeli na anogenitalnem predelu (tabela 2). Tako izbranih vzorcev smo v treh letih našteali skupno 12 (16,2 %, 12/74) in sicer v vsakem letu smo zabeležili po 4 VZV pozitivne vzorce. Med vsemi testiranimi vzorci smo torej DNK VZV na anogenitalnem predelu dokazali v 2,9 % (12/421). V vseh 12 vzorcih smo DNK VZV potrdili še z dodatno metodo PCR v realnem času, katerih vrednosti CP (angl. *crossing point*) so se gibale med 17 in 37 ciklov pomnoževanja. V 6 primerih so za omenjenih 12 vzorcev naročili preiskavo PCR na samo HSV-1 in HSV-2. Podatke o starosti in spolu ter mesto odvzema 12 bolnikov z VZV smo zapisali v tabelo 2.

RAZPRAVA

Herpes zoster ali pasovec v svetu predstavlja pomembno breme za javno zdravstvo. Incidenca pojavljanja herpes zostra se v

Tabela 1. Pregled rezultatov naročenih preiskav PCR na herpesviruse v obdobju treh let.

Leto	Naročena preiskava (PCR)	Št. vzorcev	Št. pozitivnih	Herpesvirus		
				HSV-1	HSV-2	VZV
2011	HSV-1 in HSV-2	39	11	6	5	/
	HSV-1, HSV-2 in VZV	45	26	5	2	19
	VZV	2	2	/	/	2
	Σ	86	39	11	7	21
2012	HSV-1 in HSV-2	81	29	18	11	/
	HSV-1, HSV-2 in VZV	54	39	9	5	25
	VZV	7	5	/	/	5
	Σ	142	73	27	16	30
2013	HSV-1 in HSV-2	105	40	30	10	/
	HSV-1, HSV-2 in VZV	81	42	6	6	30
	VZV	7	2	/	/	2
	Σ	193	84	36	16	32

Tabela 2. Podatki o 12 vzorcih, pozitivnih na VZV, odvzetih na anogenitalnem predelu. M – moški, Ž – ženska, 1. PCR – LightMix® Kit HSV-1/2 / VZV, 2. PCR – RealStar® VZV PCR Kit 1.2, CP – Crossing Point.

Leto	#	Spol	Starost (let)	Mesto odvzema	Naročena preiskava (PCR)	PCR VZV	
						1. PCR (CP)	2. PCR (CP)
2011	1	M	34	Penis/skrotum/glutealno desno	HSV-1 in 2 ter VZV	24,00	21,64
	2	Ž	13	Mala sramna ustnica/levo	HSV-1 in 2	36,74	34,81
	3	Ž	79	Velika sramna ustnica/ glutealno levo	HSV-1 in 2 ter VZV	17,76	17,97
	4	M	68	Perianalno/skrotum/ingvinalno	HSV-1 in 2 ter VZV	28,30	23,97
2012	5	Ž	66	Mala sramna ustnica/levo	HSV-1 in 2	37,53	33,24
	6	Ž	47	Mala sramna ustnica/levo	HSV-1 in 2	35,86	36,61
	7	M	26	Ob ustju sečnice	HSV-1 in 2	31,00	30,58
	8	Ž	32	Velika sramna ustnica/ glutealno levo	HSV-1 in 2 ter VZV	14,00	15,80
2013	9	Ž	39	Velika, mala sramna ustnica/ glutealno levo	HSV-1 in 2 ter VZV	24,16	24,20
	10	M	61	Glans penisa	HSV-1 in 2	37,54	37,48
	11	Ž	28	Velika sramna ustnica/levo	HSV-1 in 2 ter VZV	18,47	18,53
	12	M	27	Glans penisa	HSV-1 in 2	17,06	16,93

Severni Ameriki, Evropi in Aziji bistveno ne razlikuje in se giblje med 3 do 5/1000 oseb. Dokazali so, da je incidenca močno odvisna od starosti in se s starostjo nad 50 let naglo poveča (13).

Čeprav se herpes zoster lahko pojavi na vseh predelih kože, ki ga oskrbujejo korenine senzoričnih živcev, ga najpogosteje, tj. v 50 do 60 %, opazimo na torakalnem predelu telesa in v 10 do 20 % na predelu glave (11, 13). V približno 5 % se zoster pojavi na križnem predelu telesa, medtem ko je na spolovilih izjemno redek. V literaturi obstaja le nekaj opisov zostra na penisu ali anogenitalnem predelu (9–12). Med petimi primeri so pri treh starejših moških poročali o vročini, bolečini in izpuščaju, pri dveh mlajših moških (pod 30 let) pa so zabeležili le značilen izpuščaj. Vsi bolniki so bili HIV negativni, en starejši moški je bil pred pojavom herpes zostra podvržen 30 ciklom kemoterapije zaradi raka na želodcu.

Ti posamezni primeri, ki opisujejo herpes zoster na spolovilih pri odraslih ali genitalno okužbo z VZV pri otrocih, so botrovali obsežni raziskavi, v kateri so želeli razkriti incidenco VZV pri bolnikih z genitalnimi lezijami in s sumom na okužbo s HSV-1 ali -2. Pregledali so 6210 vzorcev brisov anogenitalne regije in dokazali, da je DNK VZV prisotna v 2,9 % vseh pozitivnih vzorcev (14). Podobno smo dokazali tudi v naši raziskavi, kjer smo v obdobju treh zaporednih let potrdili prisotnost DNK VZV pri 12 bolnikih, katerih vzorci so bili odvzeti na anogenitalnem predelu. Mesto odvzema je bil največkrat glans penisa ali glutealni predel pri moških in sramne ustnice pri ženskah. Štirje od osmih bolnikov so bili stari nad 50 let, kar predstavlja mejo večjega tveganja za pojavljanje herpes zostra. V 6 od 12 potrjenih primerov so kot naročeno preiskavo zahtevali le PCR na HSV-1 in -2. V teh primerih bi zgrešili dokaz VZV, če ne bi uporabili me-

tode za sočasno dokazovanje HSV-1, -2 in VZV. Rezultati naše raziskave in svetovne literature govorijo v prid uporabi metode PCR v realnem času za dokazovanje spolno prenosljivih agensov. Predvsem pa v zadnjem času vse pogosteje posegamo po PCR v realnem času za sočasno dokazovanje več različnih patogenov v eni reakciji.

S študijo smo pritrdilno prispevali k mnenju, da je smiselno v diferencialno diagnostiko genitalnih virusnih okužb vključiti tudi dokazovanje VZV in pri tem uporabiti molekularne metode za sočasno dokazovanje patogenov.

LITERATURA

1. Koren S, Meško Meglič K, Jeverica S. Herpesvirusi. In: Poljak M, Petrovec M. Medicinska virologija. Ljubljana: Medicinski razgledi; 2011. p. 15–29.
2. Grinde B. Herpesviruses: latency and reactivation - viral strategies and host response. *J Oral Microbiol.* 2013; 5: 22766.
3. Klein G. Perspectives in studies of human tumor viruses. *Front Biosci* 2002; 7: d268–274.
4. Dukersa N, Rezza G. Human herpesvirus 8 epidemiology: what we do and do not know. *AIDS* 2003; 17: 1717–30.
5. Plosa EJ, Esbenschade JC, Fuller MP, et al. Cytomegalovirus infection. *Pediatr Rev.* 2012; 33: 156–63.
6. Robers CM. Genital herpes in young adults: changing sexual behaviours, epidemiology and management. *Herpes* 2005; 12: 10–14.
7. Gupta R, Warren T, Wald A. Genital herpes. *Lancet* 2007; 370: 2127–37.
8. Sacks SL. Genital Ulcers: Their Diagnosis and Management. *Can Fam Physician.* 1987; 33: 1801–09.
9. Spray A, Glaser A. Herpes zoster of the penis: An unusual location for a common eruption. *J Am Acad Dermatol.* 2002; 47: S177–910.
10. Gopalan V, Nair RG, Pillai S, et al. Genital herpes zoster as a consequence of cancer chemotherapy-induced immunosuppression: report of a case. *J Infect Chemother.* 2012; 18: 955–57.
11. Chandrashekar L, Kumar DA, Mohan TD. Penile zoster with urethritis. *Indian J Sex Transm Dis.* 2004; 25: 81–3.
12. Bjekic M, Markovic M, Sipetic S. Penile herpes zoster: an unusual location for a common disease. *Braz J Infect Dis.* 2011; 15: 599–600.
13. Kawai K, Gebremeskel BG, Acosta CJ. Systematic review of incidence and complications of herpes zoster: towards a global perspective. *BMJ Open* 2014; 4: e004833.
14. Birch CJ, Druce JD, Catton MC, et al. Detection of varicella zoster virus in genital specimens using a multiplex polymerase chain reaction. *Sex Transm Infect.* 2003; 79: 298–300.

Mario Poljak¹, Maja M. Lunar²

Diagnostika okužbe s HIV in virološko spremljanje bolnikov v letu 2014

Laboratory Diagnosis of HIV Infection and Virological Monitoring of Patients in 2014

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: HIV, presejalno testiranje, potrditveno testiranje, molekularna diagnostika

Testiranje na HIV mora biti prostovoljno. Bolnik mora na test ustno privoliti, testiranje pa mora spremljati svetovanje in vodenje pred testiranjem in po njem. Dokazovanje okužbe s HIV poteka v dveh fazah. Prva faza je presejalno testiranje s serološkimi testi četrte generacije, ki poleg anti-HIV protiteles odkrivajo tudi virusno beljakovino HIV-1 p24 in ki imajo visoko občutljivost, a nekoliko slabšo specifičnost. Kadar rezultat presejalnega testa ni negativen, testirano osebo obvezno dodatno testiramo s potrditvenimi serološkimi testi, običajno s testom Western blot in/ali imunoblot, pri katerih so na testni membrani različne virusne beljakovine HIV-1 in HIV-2. V primeru reaktivnosti protiteles iz vzorca bolnika z vsemi tremi strukturnimi virusnimi beljakovinami (Pol, Gag, Env) se rezultat opredeli kot anti-HIV-1- ali anti-HIV-2-pozitiven. V najnovejših priporočilih ameriškega centra za preprečevanje in obvladovanje bolezni (angl. *Centers for Disease Control and Prevention*, CDC) za laboratorijsko testiranje na okužbo s HIV se Western blot in imunoblot ne uporabljata več kot potrditvena testa, ampak se ju nadomesti s hitrim potrditvenim testom, ki omogoča hkratno in zanesljivo ločevanje med HIV-1 in HIV-2. Za končno opredeljevanje HIV-statusa pri osebah s trenutno neopredeljivimi rezultati potrditvenih seroloških testov uporabljamo molekularne metode, kot je verižna reakcija s polimerazo (angl. *polymerase chain reaction*, PCR) v realnem času, ki je sicer nepogrešljiva pri spremljanju zdravljenja bolnikov. Na voljo so tudi molekularne metode, ki omogočajo ustrezno izbiro zdravljenja, kot so testi za ugotavljanje odpornosti HIV-1 proti protiretrovirusnim zdravilom (določanje nukleotidnega zaporedja za proteazo, reverzno transkriptazo in integrazo virusa HIV-1), določanje tropizma virusa HIV-1 (pred začetkom zdravljenja z antagonistom koreceptorja CCR5) in ugotavljanje prisotnosti antigena PHA*5701 (preobčutljivost na zdravilo abakavir).

¹ Prof. dr. Mario Poljak, dr. med., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana; mario.poljak@mf.uni-lj.si

² Maja M. Lunar, univ. dipl. mikr., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

ABSTRACT

KEY WORDS: HIV, screening test, confirmatory test, molecular diagnostics

HIV testing has to be voluntary and accompanied by pre- and post-testing counseling and guidance. Confirmation of HIV infection is a two-stage procedure. First step is HIV testing using 4th generation screening assays which detect anti-HIV antibodies and HIV-1 antigen p24, and have excellent sensitivity, but insufficient specificity. In case of a screening assay reactive result, an additional confirmatory assay has to be performed, traditionally Western blot and/or immunoblot assays. If the sample is reactive with all three viral structural proteins (Pol, Gag, Env), the result is finally interpreted as HIV-1 or HIV-2 positive. However, the updated recommendations of Centers for Disease Control and Prevention for laboratory testing for the diagnosis of HIV infection (2014) does not recommend Western blot and/or immunoblot as confirmatory tests anymore but replaces them with a rapid HIV test that reliably discriminates between HIV-1 and HIV-2. Indeterminate results of serological tests are resolved with the use of molecular methods such as real-time polymerase chain reaction, a method which is essential for viral load monitoring and management of patients. Additional molecular methods which are used in laboratory guidance of HIV-1 treatment are: genotypic HIV-1 drug resistance tests (sequencing of the protease, reverse transcriptase and integrase region of HIV genome), a HIV-1 genotypic tropism test (before starting treatment with CCR5 co-receptor antagonist) and HLA*5701 detection (risk for abacavir hypersensitivity).

UVOD

Prvi velik uspeh v boju proti okužbi s HIV je bil razvoj zanesljivih diagnostičnih testov za dokaz oziroma izključitev okužbe s HIV (1–5). Prvi presejalni testi za dokaz protiteles anti-HIV so bili komercialno dostopni že leta 1985, slabo leto dni po odkritju povzročitelja. Leto dni kasneje so razvili tudi prve potrditvene teste za protitelesa anti-HIV. Modernejše različice teh testov so še vedno osnova za hitro, relativno enostavno in zanesljivo diagnostiko okužbe s HIV. Leta 1995 so razvili tudi teste za kvantitativno merjenje koncentracije HIV-1 RNA v plazmi, brez katerih je danes spremljanje poteka in zdravljenja HIV-bolezni nepredstavljivo. Za izbiro pravilne kombinacije zdravil, ki lahko učinkovito zavre pomnoževanje HIV, so od leta 2000 v uporabi testi za določanje občutljivosti oziroma odpornosti HIV-1 proti protiretrovirusnim zdravilom.

Testiranje na HIV mora biti prostovoljno. Bolnik mora ustno privoliti na test, testiranje pa mora spremljati svetovanje in vodenje pred testiranjem in po njem (2–5). Diagnozo okužbe s HIV je treba pri vseh osebah obvezno potrditi iz dveh neodvisno odvzetih in testiranih kliničnih vzorcev.

Najpomembnejša klinična vzorca v laboratorijski diagnostiki okužbe s HIV sta serum in plazma, vse pogosteje pa se uporabljata tudi slina in urin. Serološka diagnostika, pri kateri v vzorcih seruma ali plazme dokazujemo specifična protitelesa anti-HIV in virusno beljakovino p24, so osnova rutinskega dokazovanja in izključevanja okužbe s HIV. Končna diagnoza okužbe s HIV se danes pri več kot 99,5 % okuženih postavi z uporabo seroloških testov. Običajno se v krvi okuženih najprej pojavi antigen p24, potem protitelesa proti strukturnim beljakovinom: sprva proti p24, nato še proti p17. Kasneje se

pojavijo protitelesa proti glikoproteinom ovojnice; najprej proti gp41, nato še proti gp120 in gp160 (6). Protitelesa anti-HIV ostanejo v relativno visoki koncentraciji vse do smrti (1).

PRESEJALNO TESTIRANJE NA HIV

Dokazovanje okužbe s HIV običajno poteka v dveh fazah. Za presejalno testiranje se najpogosteje uporabljajo različni serološki testi, ki jih odlikujeta zelo visoka občutljivost (največkrat > 99,85 %) in relativno nizka cena. Pomanjkljivost presejalnih testov je nekoliko slabša specifičnost in posledično zelo nizka napovedna vrednost v populacijah z nizko pojavnostjo HIV, kot je npr. v Sloveniji. V vsakodnevni rutinski diagnostiki se uporabljajo predvsem presejalni testi četrte generacije (poleg protiteles anti-HIV odkrivajo tudi virusno beljakovino p24). Večina sodobnih presejalnih testov četrte generacije hkrati prepozna tri vrste protiteles anti-HIV in eno virusno beljakovino: protitelesa anti-gp41 HIV-1 genske skupine M, protitelesa anti-gp41 HIV-1 genske skupine O in protitelesa anti-gp36 HIV-2 ter virusno kapsidno beljakovino p24 HIV-1 genske skupine M (antigen p24). Z njihovo uporabo lahko odkrijemo okužbo s HIV še pred pojavom specifičnih protiteles anti-HIV, izključimo okužbo z različicami HIV-1 iz genskih skupin M in O ter izključimo okužbo s HIV-2. Zaradi navedenih lastnosti imajo presejalni testi četrte generacije večjo občutljivost kot testi tretje generacije in lahko odkrijejo okužbo s HIV povprečno en teden prej kot presejalni testi tretje generacije. V primeru negativnega rezultata presejalnega testa četrte generacije lahko, če je minilo vsaj tri mesece od morebitne okužbe, z zelo veliko verjetnostjo (negativna napovedna vrednost > 99,9 %) izključimo okužbo s HIV. Če je presejalni test negativen in če še ni minilo tri mesece od morebitne okužbe, je potrebno presejalni test večkrat pono-

viti. Osebo lahko napotimo tudi na dodatno testiranje z eno od neposrednih mikrobioloških metod, največkrat na HIV-1 RNA, in sicer predvsem osebe s kliničnimi znaki akutnega retrovirusnega sindroma ali pri visokorizični izpostavljenosti virusu. Trenutno ocenjeno obdobje, v katerem ne moremo dokazati okužbe z uporabljeno testno metodo ali t. i. diagnostično okno, znaša za starejše presejalne teste tretje generacije (spoznavajo samo protitelesa anti-HIV) 21–28 dni po okužbi, za presejalne teste četrte generacije 14–17 dni in za molekularno testiranje 11–14 dni po okužbi (1, 7).

POTRREDITVENO SEROLOŠKO TESTIRANJE NA HIV

V primeru ko rezultat presejalnega testa ni jasno negativen, testirano osebo obvezno dodatno testiramo s potrditvenimi serološkimi testi. Kot potrditveni test se najpogosteje uporablja test Western blot, pri katerem so na testni membrani številne naravne virusne beljakovine, ali test imunoblot, pri katerem so na testni membrani rekombinantne in/ali sintetične beljakovine HIV-1 in HIV-2. Če so potrditveni testi jasno negativni in je od morebitne okužbe minilo vsaj tri mesece, se rezultat testiranja na HIV opredeli kot negativen ne glede na začetno pozitivnost presejalnih testov (1). V primeru reaktivnosti protiteles iz seruma bolnika z vsemi tremi strukturnimi virusnimi beljakovinami (Pol, Gag, Env) se rezultat opredeli kot anti-HIV-1- ali anti-HIV-2-pozitiven (6). Potrditveno testiranje mora zaradi različnih kliničnih implikacij jasno opredeliti okuženost testirane osebe s HIV-1 ali HIV-2. Na žalost številnih vzorcev s prvim potrditvenim testiranjem ne moremo opredeliti niti kot pozitivne niti kot negativne. Serumske vzorce s tako nejasno reaktivnostjo opredelimo kot »trenutno neopredeljive«. Velika večina ljudi s takšnim rezultatom ni okužena s HIV, trenutno ne-

opredeljivi rezultati so namreč največkrat posledica začasne ali trajne navzkrižne reaktivnosti protiteles proti drugim nevirusnimi antigenom. V redkih primerih se zgodi, da je trenutno neopredeljiv rezultat nastal zaradi testiranja osebe v zgodnjem obdobju serokonverzije oziroma v akutnem obdobju bolezni, ko protitelesni odziv na HIV še ni popolnoma razvit oziroma še ni antigena p24. Zaradi vsega navedenega osebe s trenutno neopredeljivimi rezultati zahtevajo dodatno pozornost in obvezno laboratorijsko spremljanje (1). Glede na trenutna priporočila je potrebno serum takih oseb ponovno testirati po enem in po treh mesecih s presejalnimi testi in/ali njihov vzorec plazme takoj testirati na HIV-1 RNA in po potrebi še na HIV-2 DNA in RNA (2).

POTRDIIVENO MOLEKULARNO TESTIRANJE NA HIV

Kljub izjemni zanesljivosti serološke diagnostike okužbe s HIV obstajajo določeni primeri, ki jih z uporabo seroloških metod ne moremo razjasniti. Začetno obdobje serokonverzije in terminalno obdobje aidsa predstavljata največji problem serološke diagnostike, saj so v serumu okuženih oseb prisotna le protitelesa proti posameznim virusnim antigenom, zaradi česar so rezultati potrditvenih testov skoraj vedno trenutno neopredeljivi ali izjemoma celo lažno negativni. Opisani so tudi izjemno redki primeri okužb z drugimi virusi (npr. z virusom Epstein-Barr), ko so imele testirane osebe določen čas (celo do šest mesecev) v serumu prisotna protitelesa, zaradi katerih je prihajalo do ponavljajočih se lažno pozitivnih rezultatov anti-HIV-potrditvenih testov. Poseben diagnostični problem predstavljajo tudi novorojenčki anti-HIV-pozitivnih mater, ki imajo prisotna od matere pasivno prenesena protitelesa tudi do dve leti po porodu. Za reševanje vseh navedenih diagnostičnih problemov se da-

nes uporabljajo predvsem molekularne diagnostične metode, s katerimi se dokazuje HIV RNA ali provirusna HIV DNA v plazmi oziroma v polni krvi (1). V rutinski molekularni diagnostiki se največkrat uporabljajo verižna reakcija s polimerazo (angl. *polymerase chain reaction*, PCR) oziroma njena različica, PCR v realnem času. Molekularne metode kot potrditveni test torej uporabljamo predvsem pri osebah s trenutno neopredeljivimi rezultati potrditvenih seroloških testov, za odkrivanje in dokaz okužbe pred serokonverzijo in v njenih zgodnjih fazah ter v terminalnem obdobju aidsa, za zanesljiv dokaz okužbe pri bolnikih z nerazvitim ali okvarjenim imunskim sistemom, za razlikovanje okužbe s HIV od pasivnega prenosa protiteles anti-HIV pri novorojenčkih anti-HIV-pozitivnih mater in za presejalno molekularno testiranje krvodajalcev in darovalcev krvi, organov in tkiv pred presaditvijo. Pri uporabi molekularnih metod v zgoraj navedene namene je potrebna dodatna pozornost, če test pokaže koncentracijo HIV RNA manjšo od 5.000 kopij HIV RNA/ml plazme. Tak rezultat je potrebno zaradi možnosti lažno pozitivnih rezultatov obvezno potrditi iz vsaj dveh neodvisno odvzetih vzorcev. Molekularne metode se, poleg testiranja na anti-HIV in antigen p24, v nekaterih razvitih državah, vključno s Slovenijo, uporabljajo tudi pri presejalnem testiranju darovane krvi (1).

VIROLOŠKO SPREMLJANJE BOLNIKOV

Kvantitativno merjenje koncentracije HIV-1 RNA v plazmi oziroma merjenje virusnega bremena je danes nepogrešljiv standard za spremljanje poteka okužbe s HIV ter spremljanje protivirusnega zdravljenja. Občutljivost modernih molekularnih metod, ki jih v klinični praksi uporabljamo za merjenje virusnega bremena, znaša od 15 do 30 kopij HIV-1 RNA/ml plazme.

Virusno breme v plazmi je najboljši dolgoročni kazalec kliničnega izida pri bolniku, število limfocitov CD4+ pa najboljši kratkoročni kazalec razvoja oportunističnih bolezni. Oba laboratorijska parametra merimo po postavitvi diagnoze v tridod šestmesečnih razmikih in po potrebi še pogosteje, predvsem na začetku protiretrovirusnega zdravljenja. Koncentracija HIV-1 RNA je tudi najpomembnejši napovedni dejavnik za tveganje prenosa okužbe s HIV-pozitivne matere na otroka.

LABORATORIJSKE METODE, KI POMAGAJO PRI IZBIRI NAJBOLJ USTREZNIH ZDRAVIL

Tako kot pri vseh protimikrobnih zdravilih je tudi pri zdravljenju okužbe s HIV kmalu po začetku klinične uporabe vsakega novega protiretrovirusnega zdravila prišlo do pojava odpornih sevov virusa HIV proti posameznemu zdravilu. Za določanje pravilne kombinacije zdravil so v zadnjih nekaj letih v uporabi testi za ugotavljanje občutljivosti oziroma odpornosti HIV-1 proti protiretrovirusnim zdravilom. Trenutno sta v uporabi dve vrsti takšnih testov: fenotipski in genotipski testi. Fenotipski testi nudijo informacijo o približni koncentraciji protiretrovirusnega zdravila, potrebnega za zaviranje pomnoževanja virusa iz seruma/plazme bolnika v primerjavi s koncentracijo protiretrovirusnega zdravila, ki zavira pomnoževanje divjega tipa virusa. Rezultat se izraža kot koncentracija protiretrovirusnega zdravila, ki zavre pomnoževanje 50 ali 90 % populacije virusa (IC₅₀ ali IC₉₀). Večina fenotipskih testov je avtomatiziranih, vendar jih izvajajo samo v nekaterih vrhunskih, večinoma velikih komercialnih laboratorijih. Fenotipski testi zahtevajo osamitev virusne RNA, pomnoževanje gena *pol* s PCR, vstavitve pomnoženega gena v vektorje in merjenje občutljivosti oziroma odpornosti rekombinantnih virusov HIV (ki vsebujejo pomnoženi del

genoma HIV iz bolnika) na protiretrovirusna zdravila s pomočjo luciferaznih reporterskih genov v celičnih kulturah. Fenotipske metode so dolgotrajne in drage, zato so v rutinski diagnostiki v uporabi predvsem genotipski testi. Ti testi zahtevajo osamitev virusne RNA iz plazme, pomnoževanje gena za proteazo in reverzno transkriptazo (približno 1.300 baznih parov) s PCR in določanje nukleotidnega zaporedja pomnoženega dela virusnega dednega materiala. Dobljena nukleotidna zaporedja se nato primerjajo z obstoječimi podatki v velikih bankah podatkov na medmrežju, v katerih najdemo podatke o vseh mutacijah, povezanih z odpornostjo na protiretrovirusna zdravila. V končnem izvidu klinik dobi jasne informacije o občutljivosti izolata HIV njegovega bolnika na razpoložljiva protiretrovirusna zdravila. Od leta 2009 se poleg določanja nukleotidnega zaporedja gena za proteazo in reverzno transkriptazo določa tudi zaporedje gena za integrazo (približno 1.100 baznih parov), in sicer za ugotavljanje mutacij, povezanih z odpornostjo proti zaviralcem virusne integraze.

Pred začetkom zdravljenja z antagonistom koreceptorja CCR5 (maravirok) je potrebno s pomočjo fenotipskih ali genotipskih metod določiti tropizem virusa HIV-1 oziroma ugotoviti, ali je bolnik okužen z R5-tropnimi ali X4-tropnimi sevi HIV. Pred začetkom zdravljenja z abakavirjem je potrebno ugotoviti, ali ima bolnik antigen PHA*5701, ki je povezan s preobčutljivostjo na to zdravilo (1).

NOVOSTI NA PODROČJU DIAGNOSTIKE OKUŽBE S HIV IN VIROLOŠKEGA SPREMLJANJA HIV BOLNIKOV V LETU 2014

Ameriški center za preprečevanje in obvladovanje bolezni (angl. *Centers for Disease Control and Prevention*, CDC) je junija 2014 objavil nove ameriške smernice za diagnostiko okužbe s HIV pri odraslih

osebah in otrocih starejših od 2 let, v kate-
tere je vključil naslednja opažanja (8):

- Rezultati potrditvenih testov, kot sta Western blot in imunoblot, so pogosto lažno negativni ali nejasni, še posebno pri bolnikih z nedavno okužbo. Ravno pri osebah z akutno okužbo pa je tveganje za prenos virusa na druge največje, kar zahteva izboljšano in spremenjeno diagnostiko zgodnje okužbe s HIV.
- Izboljšana diagnostika zgodnje okužbe s HIV je potrebna tudi zaradi novih smernic za zdravljenje okužbe s HIV, ki priporočajo takojšen pričetek zdravljenja za vse okužene osebe, vključno z akutnimi okužbami.
- Test Western blot večino HIV-2 okužb napačno opredeli kot HIV-1, zato je potreben ustrežnejši test za potrjevanje okužbe s HIV in razločevanje med HIV-1 in HIV-2.

V priporočilih ostaja način in postopek izvajanja presejalnega testiranja na HIV nespremenjen (test četrte generacije, ki vključuje dokazovanje protiteles HIV-1 in HIV-2 ter antigena p24 HIV-1), nasprotno pa je popolnoma spremenjen postopek potrditvenega testiranja. Vzorcji, ki so na presejalnem testiranju reaktivni, se nato ne testirajo več s testi Western blot in/ali imunoblot, ampak s posebnim, hitrim serološkim testom, ki omogoča potrditveno dokazovanje in zanesljivo ločevanje okužbe s HIV-1 in HIV-2 v manj kot 15 minutah. V primeru pozitivnega rezultata hitrega potrditvenega testa se izda izvid kot HIV-1 pozitiven, HIV-2 pozitiven ali HIV pozitiven, kadar so sočasno prisotna protitelesa proti HIV-1 in HIV-2. V primeru, ko je rezultat hitrega potrditvenega testa negativen ali nejasen, se za razjasnitev avtomatično uporabi dokazovanje HIV-1 RNA. Po novih ameriških smernicah tako testa Western blot in imunoblot po 30 letih nista več del rutinske diagnostike okužbe s HIV. S spremenjenim algorit-

mom je bistveno izboljšana laboratorijska diagnostika akutne okužbe s HIV-1 ter potrjevanje okužbe s HIV-2, ob tem pa ostaja diagnostika okužbe s HIV-1, starejše od 6 mesecev, enako uspešna. Novi algoritem testiranja daje bistveno manj nejasnih rezultatov in v veliki večini primerov omogoča rezultate v bistveno krajšem času.

V priporočilih je v algoritmu testiranja vključen le test HIV-1 RNA, ne pa tudi test HIV-2 RNA, in sicer:

- ker je akutna okužba s HIV-2 izjemno redka,
- ker zanesljivost testa HIV-2 RNA v akutnem obdobju HIV-2 okužbe ni znana,
- ker HIV-2 RNA v krvi ne moremo dokazati pri vsaj polovici s HIV-2 okuženih oseb in
- ker na tržišču še ni testa HIV-2 RNA, ki bi ga odobrila Ameriška agencija za hrano in zdravila (angl. *Food and Drug Administration*, FDA).

Omenjeni algoritem testiranja ni namenjen testiranju vzorcev sline, urina ali posušene kapljice polne krvi (angl. *dried blood spot testing*, DBS), poleg tega še ni bil preizkušen na osebah, ki so jemala protiretrovirusna zdravila kot pred- ali poizpostavitveno profilakso in ni bil preizkušen pri osebah, zdravljenih več kot deset let, pri katerih nekatera anti-HIV protitelesa postanejo po daljšem obdobju virusne supresije nezaznavna.

Ker je v algoritmu vključeno tudi morebitno avtomatsko testiranje na HIV-1 RNA, je za testiranje na okužbo s HIV potreben bistveno večji volumen vzorca plazme oziroma seruma, in sicer je priporočen volumen polne krvi, ki se ga pošlje v laboratorij, vsaj 5 ml (8). Ker posebni hitri serološki test, ki omogoča potrditveno dokazovanje in ločevanje okužbe s HIV-1 in HIV-2 v manj kot 15 minutah, ni na razpolago zunaj ZDA, so nedavno uspešno preizkusili tudi relativno hiter in avtoma-

tiziran potrditveni test Bio-Rad Geenius HIV 1/2 assay, ki bi ga lahko v te namene uporabljali v Evropi (9, 10).

Spremembe se v letu 2014 obetajo tudi na področju virološkega spremljanja zdravljenja s HIV okuženih bolnikov, ki temelji na rednem merjenju virusnega bremena v krvi s pomočjo kvantitativnega PCR v realnem času v 3- do 6-mesečnih intervalih. Velika večina bolnikov, pri katerih je zdravljenje uspešno, ima po enem letu zdravljenja virusno breme pod mejo zaznave kvantitativnega testa HIV-1 RNA. Ker v takšnih primerih uporaba kvantitativnega testa HIV-1 RNA ni več nujno potrebna (pričakovani rezultat je v 95 % primerov pod mejo zaznave oziroma negativen), so se v zadnjih letih na tržišču pojavili tudi cenovno bistveno ugodnejši kvalitativni testi za dokazovanje HIV-1 RNA, ki podajajo rezultat le kot pozitiven oziroma negativen. Kvalitativni testi HIV-

1 so bili prvotno sicer razviti za presejalno molekularno testiranje krvodajalcev in darovalcev organov in tkiv pred presaditvijo ter za razlikovanje okužbe s HIV od pasivnega prenosa protiteles anti-HIV pri novorojenčkih anti-HIV-pozitivnih mater. Se pa v zadnjem času poraja ideja o rednem spremljanju bolnikov na protiretrovirusnem zdravljenju s kvalitativnimi testi HIV-1, in sicer tistih, ki so imeli virusno breme dvakrat zapored pod mejo zaznave kvantitativnega testa HIV-1 RNA. V primeru pozitivnega rezultata kvalitativnega HIV-1 testa bi se nato pri teh posameznikih naredil kvantitativni test HIV-1 RNA. Druga možnost bistvenega zmanjševanja stroškov je testiranje združenih vzorcev (angl. *minipools*) s kvalitativnim ali kvantitativnim testom HIV-1 pri bolnikih, pri katerih z veliko verjetnostjo pričakujemo virusno breme pod mejo zaznave molekularnih testov (11).

LITERATURA

1. Poljak M, Petrovec M. Medicinska virologija. Ljubljana: Medicinski razgledi; 2011.
2. Poljak M, Smit E, Ross J. 2008 European Guideline on HIV testing. Int J STD AIDS. 2009; 20 (2): 77-83.
3. Gökengin D, Geretti AM, Begovac J, et al. 2014 European Guideline on HIV testing. Int J STD AIDS. 2014; 25 (10): 695-704.
4. Rayment M, Asboe D, Sullivan AK. HIV testing and management of newly diagnosed HIV. Br Med J. 2014; 349: g4275.
5. Marrazzo JM, del Rio C, Holtgrave DR, et al. HIV prevention in clinical care settings: 2014 recommendations of the International Antiviral Society-USA Panel. J Am Med Assoc. 2014; 312 (4): 390-409.
6. Centers for Disease Control. Interpretation and use of the Western blot assay for serodiagnosis of human immunodeficiency virus type 1 infections. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 1989; 38: 1-7.
7. Chavez P, Wesolowski L, Patel P, et al. Evaluation of the performance of the Abbott ARCHITECT HIV Ag/Ab Combo Assay. J Clin Virol. 2011; 52 Suppl 1: S51-5.
8. Centers for Disease Control and Prevention and Association of Public Health Laboratories. Laboratory Testing for the Diagnosis of HIV Infection: Updated Recommendations. Dosegljivo na: <http://stacks.cdc.gov/view/cdc/23447>.
9. Mor O, Mileguir F, Michaeli M, et al. Evaluation of the Bio-Rad Geenius HIV 1/2 assay as an alternative to the INNO-LIA HIV 1/2 assay for confirmation of HIV infection. J Clin Microbiol. 2014; 52 (7): 2677-9.
10. Montesinos I, Eykmans J, Delforge ML. Evaluation of the Bio-Rad Geenius HIV 1/2 assay as a confirmatory assay. J Clin Virol. 2014; 60 (4): 399-401.
11. Newman H, Breunig L, van Zyl G, et al. A qualitative PCR minipool strategy to screen for virological failure and antiretroviral drug resistance in South African patients on first-line antiretroviral therapy. J Clin Virol. 2014; 60 (4): 387-91.

Maja M. Lunar¹, Jana Mlakar², Ana B. Abecasis³, Anne-Mieke Vandamme⁴, Janez Tomažič⁵, Primož Karner⁶, Tomaž D. Vovko⁷, Blaž Pečavar⁸, Gabriele Volčanšek⁹, Mario Poljak¹⁰

Molekularna epidemiologija okužbe s HIV v Sloveniji

Molecular Epidemiology of HIV Infection in Slovenia

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: HIV-1, molekularna epidemiologija, filogenetska analiza, mutacijska stopnja

IZHODIŠČA. Namen raziskave je bil z uporabo molekularnih in filogenetskih metod raziskati značilnosti epidemije HIV/AIDS v Sloveniji s poudarkom na podtipu B. METODE. V raziskavo smo vključili 367 delnih nukleotidnih zaporedij gena *pol* HIV-1, kar predstavlja kar 57 % vseh oseb z dokazano okužbo s HIV-1 v Sloveniji do konca leta 2013. V nadaljnjo filodinamsko analizo podtipa B smo vključili 223 zaporedij. REZULTATI. Podtip B je najpogosteje prisoten podtip HIV-1 v Sloveniji. Določili smo ga pri 313 od 367 (85,3 %) bolnikov. Med ne-B podtipi sta bila najpogosteje odkrita podtip A (6,5 %) in CRF02_AG (2,5 %). S podrobno analizo podtipa B smo odkrili osem ločenih filogenetskih skupin bolnikov ($n \geq 10$ oseb), eno filogenetsko povezano skupino štirih oseb, dve trojki in dodatnih 12 filogenetskih parov. Le pri 19,3 % oseb nismo našli filogenetske povezave z vsaj eno okuženo osebo iz Slovenije. Z analizo po Bayesu (z upoštevanjem molekularne ure) smo dokazali več vnosov HIV v Slovenijo ter ugotovili, da ima najstarejša velika skupina HIV-1 slovenskih izolatov skupnega prednika v letu

¹ Maja M. Lunar, univ. dipl. mikr., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

² Dr. Jana Mlakar, univ. dipl. biol., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

³ Dr. Ana B. Abecasis, Unidade de Saúde Pública Internacional e Bioestatística e Centro de Malária e Outras Doenças Tropicais, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa, Rua da Junqueira N°100, 1349-008 Lizbona, Portugalska

⁴ Prof. dr. Anne-Mieke Vandamme, dr. med., Clinical and Epidemiological Virology, Rega Institute for Medical Research, Department of Microbiology and Immunology, KU Leuven, Minderbroedersstraat 10, B-3000 Leuven, Belgija; Unidade de Microbiologia e Centro de Malária e Outras Doenças Tropicais, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa, Rua da Junqueira N°100, 1349-008 Lizbona, Portugalska

⁵ Izr. prof. dr. Janez Tomažič, dr. med., Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Japljeva ulica 2, 1000 Ljubljana

⁶ Asist. Primož Karner, dr. med., Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Japljeva ulica 2, 1000 Ljubljana

⁷ Tomaž D. Vovko, dr. med., Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Japljeva ulica 2, 1000 Ljubljana

⁸ Blaž Pečavar, dr. med., Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Japljeva ulica 2, 1000 Ljubljana

⁹ Gabriele Volčanšek, dr. med., Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Japljeva ulica 2, 1000 Ljubljana

¹⁰ Prof. dr. Mario Poljak, dr. med., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana; mario.poljak@mf.uni-lj.si

1986. Ugotovili smo 10-krat hitrejšo mutacijsko stopnjo slovenskih zaporedij, kot je za gen *pol* opisano v literaturi. ZAKLJUČKI. Večina slovenskih HIV bolnikov je razporejena v filogenetske skupine, kar nakazuje na zaprt krog posameznikov, med katerimi prihaja do okužb. Ugotovljena hitrejša mutacijska stopnja slovenskih nukleotidnih zaporedij virusa HIV nakazuje počasno epidemijo, kjer so gonilo epidemije predvsem posamezniki z dolgotrajno HIV okužbo.

ABSTRACT

KEY WORDS: HIV-1, molecular epidemiology, phylogeny, phylodynamics, substitution rate

BACKGROUND. The aim of the present study was to describe the characteristics of HIV epidemic in Slovenia and further explore the evolutionary history of the subtype B epidemic. METHODS. A total of 367 partial HIV-1 *pol* sequences from Slovenian patients were included, representing 57 % of all patients diagnosed in Slovenia by the end of 2013. We further studied 223 sequences in the analysis of subtype B phylodynamics. RESULTS. Subtype B was the most prevalent subtype, determined in 313 out of 367 (85.3 %) patients. Subtype A and CRF02_AG were most common non-B subtypes, detected in 6.5 % and 2.5 % of patients. Analysis of HIV-1 subtype B transmission chains revealed 8 major clusters ($n \geq 10$ patients), 1 group of 4 patients, 2 trios and 12 transmission pairs, thus leaving only 43 (19.3 %) of Slovenian patients without a local epidemiological link. Bayesian analysis (incorporating molecular clock) estimated several introductions of HIV-1 into Slovenia, with most recent common ancestor of the earliest Slovenian cluster dated to the year 1986. We observed a 10-times faster evolutionary rate of Slovenian sequences compared to rate previously described for *pol* region. CONCLUSIONS. The majority of Slovenian patients had a local transmission link, indicating a closed HIV community. The observed faster evolutionary rate and thus slower epidemic rate suggests that individuals with a long-lasting infection are the driving force of the epidemic.

UVOD

V Sloveniji je bil prvi primer aidsa uradno zabeležen junija leta 1986. Do konca leta 2013 je bilo skupno prepoznanih že 639 okužb s HIV, kar še vedno predstavlja razmeroma majhno breme okužbe s HIV, z manj kot 1 okuženo osebo na 1000 prebivalcev (1, 2). Najbolj ogrožena skupina za okužbo so moški, ki imajo spolne odnose z moškimi (MSM). Več kot 80 % okuženih oseb je tako moškega spola. Najpogostejše prisoten podtip virusa HIV-1 je podtip B, ki je bil odkrit pri 84 % in 89 % bolnikov, diagnosticiranih med leti 1996–2005 in 2005–2010 (3, 4).

Namen raziskave je bil z uporabo molekularnih in filogenetskih analiz raziskati značilnosti epidemije virusa HIV v Sloveniji do konca leta 2013 ter podrobneje opisati epidemijo podtipa B HIV-1 v Sloveniji, vključno z določitvijo leta vstopa virusa v državo.

MATERIALI IN METODE

V analizo smo vključili delna nukleotidna zaporedja gena *pol* in podatke, predhodno pridobljene z anonimnimi vprašalniki v sklopu treh raziskav primarne odpornosti proti protiretrovirusnim zdravilom med nezdravljenimi HIV-1 pozitiv-

nimi osebami z okužbo, odkrito med leti 2000–2004, 2005–2010 in 2011–2012 (4–6). Poleg teh smo v analizo vključili tudi zaporedja, pridobljena v rutinski diagnostiki genotipskega določanja odpornosti virusa HIV proti protiretrovirusnim zdravilom pri bolnikih, pri katerih zdravljenje ni bilo uspešno ter še neobjavljene podatke raziskave primarne odpornosti iz leta 2013. Tako smo v raziskavo vključili skupno 367 bolnikov, kar predstavlja kar 57 % vseh oseb z dokazano okužbo z virusom HIV v Sloveniji do konca leta 2013.

Podtip HIV smo določili z uporabo orodja REGA HIV-1 subtyping tool, version 3.0 (7). V primeru, da z uporabljenim orodjem nismo uspeli določiti pripadajočega podtipa, smo izvedli filogenetsko analizo s pomočjo orodja PhyML, v katero smo vključili tudi zaporedja referenčnih genomov podtipov virusa HIV-1 in njegovih rekombinantnih oblik, ter na podlagi dobljenih filogenetskih dreves poskušali opredeliti podtip (8).

Lastnosti bolnikov, okuženih s podtipom B, smo nato primerjali z bolniki, okuženimi s podtipi ne-B. V primerjavo smo vključili le bolnike, za katere smo imeli na voljo epidemiološke podatke, skupno 270 bolnikov.

Ker večino okužb s HIV v Sloveniji povzroča podtip B, smo v podrobnejšo analizo epidemije in njene dinamike vključili le zaporedja tega podtipa, skupno 223 nukleotidnih zaporedij, pridobljenih iz vzorcev, odvzetih nezdravljenim osebam, ki so bile diagnosticirane z okužbo s HIV med leti 2000–2012. Izvedli smo podrobnejšo filodinamsko analizo z uporabo paketa BEAST, ki poleg filogenetske analize omogoča tudi okvirno določitev leta začetka lokalne epidemije (9).

Statistično analizo smo izvedli z uporabo paketa Epi Info™ version 3.5.3, kjer smo upoštevali vrednosti $P \leq 0,05$ kot statistično značilne (10).

REZULTATI IN RAZPRAVA

Podtipi HIV-1 v Sloveniji

Podtip B je najpogosteje prisoten podtip v Sloveniji. Določili smo ga pri 313 od 367 (85,3 %) bolnikov. Med podtipi ne-B sta bila najpogosteje odkrita podtip A in CRF02_AG; določili smo ju pri 24 od 367 (6,5 %) in 9 od 367 (2,5 %) bolnikov. Ostale podtipove smo odkrili pri skupno manj kot 5 % bolnikov (tabela 1). Petim izolatom podtipa nismo uspeli določiti, kar nakazuje na prisotnost novih še neopisanih rekombinantnih oblik HIV v Sloveniji. Ugotovili smo, da je s podtipom ne-B v Sloveniji okuženih statistično značilno več: oseb ženskega spola ($P < 0,0001$), tujcev ($P < 0,0001$), oseb, ki navajajo heteroseksualni kontakt s partnerjem kot najverjetnejši razlog HIV okužbe ($P = 0,0003$) in oseb, ki poročajo okužbo v tujini ($P = 0,0007$). Posamezniki, okuženi s podtipom ne-B so diagnosticirani pozneje ($P = 0,0090$) in imajo značilno nižje število celic CD4 ob postavitvi diagnoze kot osebe, okužene s podtipom B ($P = 0,0060$), kar nakazuje na manj pogosto testiranje na okužbo s HIV pri osebah okuženih s podtipom ne-B.

Tabela 1. Razporeditev podtipov HIV-1 med 367 bolniki odkritimi v Sloveniji v obdobju 2000-2013. ND – podtip ni bil določen.

Podtipi virusa HIV v Sloveniji	Št. bolnikov	Delež bolnikov
B	313	85,3 %
A	24	6,5 %
CRF02_AG	9	2,5 %
C	4	1,1 %
G	4	1,1 %
CRF01_AE	4	1,1 %
D	3	0,8 %
F	1	0,3 %
ND	5	1,4 %

Lastnosti epidemije HIV-1 podtipa B v Sloveniji

V filogenetsko analizo smo vključili 223 zaporedij podtipa B in sorodna zaporedja pridobljena iz genske banke GenBank. Analiza je pokazala osem ločenih filogenetskih skupin bolnikov s po deset ali več osebami, eno skupino štirih oseb, dve trojki in dodatnih 12 filogenetskih parov. Le pri 43 izmed 223 (19,3 %) oseb nismo našli filogenetske povezave z vsaj eno okuženo osebo iz Slovenije. To nakazuje, da do okužbe s podtipom B prihaja predvsem v Sloveniji oziroma so slovenski bolniki poglaviti vir prepoznanih okužb.

Po primerjavi lastnosti bolnikov, ki so bili del velikih filogenetskih skupin ($n \geq 10$), s posamezniki zunaj teh skupin, smo ugotovili, da je pri osebah v filogenetskih skupinah značilno manjši delež bolnikov s postavljeno diagnozo pred letom 2005 ($P = 0,0388$), več jih je navedlo Slovenijo kot najverjetnejšo državo, kjer je prišlo do okužbe ($P < 0,0001$) in manj oseb, pri katerih smo odkrili mutacije povezane s primarno odpornostjo virusa HIV proti protiretrovirusnim zdravilom ($P = 0,0431$). Slednje potrjuje upravičenost trenutne strategije testiranja na primarno odpornost pri vseh novo odkritih HIV bolnikih, pri katerih je predvidoma prišlo do okužbe v tujini.

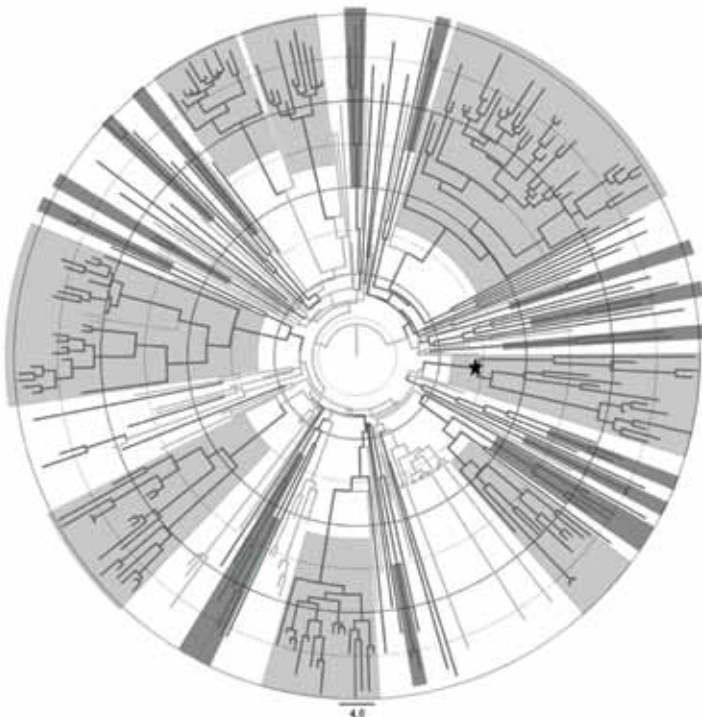
Dobljeno filogenetsko drevo je prikazano na sliki 1, kjer so ugotovljene manjše in večje filogenetske skupine, prikazane v obarvanih poljih. Ugotovili smo, da šest od osmih velikih filogenetskih skupin vključuje vsaj enega posameznika, ki je navedel okužbo v tujini, kar velja tudi za več kot polovico manjših skupin. Večina oseb s filogenetsko povezavo se je okužila z istospolnimi stiki in pet od osmih skupin vključuje le bolnike moškega spola, kljub temu da nekateri med njimi navajajo heteroseksualni prenos. To nakazuje na obstoj manjkajočih (še neprepoznanih) oseb ženskega spola znotraj teh skupin ali

na to, da osebe niso želele razkriti dejanskega izvora okužbe. Večina oseb, ki je navajala heteroseksualni način prenosa, se nahaja znotraj manjših skupin. Naši rezultati nakazujejo, da dinamika prenosa virusa HIV v vseh velikih slovenskih filogenetskih skupinah poteka lokalno, preko istospolnih stikov.

Zaporedja, pridobljena iz genske banke, se večinoma nahajajo parafiletsko na slovenske skupine, kar nakazuje na možen geografski izvor omenjenih skupin. Najbolj sorodna zaporedja slovenskim izvirajo iz ZDA, Nemčije, Belgije, Kanade in Francije.

Analiza po Bayesu (z upoštevanjem molekularne ure) je pokazala, da ima najstarejša velika filogenetska skupina slovenskih zaporedij skupnega prednika v letu 1986 (95 % HPD, angl. 95 % *highest posterior density*, znaša 1981,4–1990,5). Leto 1986 tako najverjetneje predstavlja letnico predvidenega začetka lokalnega širjenja okužbe s HIV v Sloveniji in zanimivo, prav v tem letu je bil v Sloveniji prepoznani prvi okuženi bolnik. Po tem obdobju je prišlo še do več nadaljnjih, ločenih vnosov HIV v državo.

V naši raziskavi smo ugotovili 10-krat hitrejšo mutacijsko stopnjo pri slovenskih nukleotidnih zaporedjih v primerjavi z v literaturi opisanimi zaporedji gena *pol*, kar lahko nakazuje na počasnejšo epidemijo virusa HIV v Sloveniji (11). Opisano je bilo namreč, da se evolucijska stopnja virusa HIV upočasni, kadar pride do pomembnega porasta števila okuženih oziroma epidemije. Tako v primeru hitro potekajoče epidemije, ko prihaja do prenosa virusa predvsem od oseb v zgodnji fazi okužbe, ko še ni večjega pritiska s strani imunskega sistema in se s tem vrši manjši selekcijski pritisk na virus, ta pridobi relativno malo mutacij in se kot tak prenese na drugega posameznika (12). Torej, hitrejša mutacijska stopnja slovenskih sevov HIV-1 nakazuje na relativno majhno



Slika 1. Filogenetsko drevo slovenskih izolatov podtipa B HIV-1 (temno sivo obarvane veje) in pripadajočih kontrolnih zaporedij iz genske banke (svetlo sivo obarvane veje). Velike filogenetske skupine ($n \geq 10$) slovenskih zaporedij so v svetlo sivo obarvanih in manjše skupine v temno sivo obarvanih poljih. Krogi so v 5-letnih intervalih, kjer zunanji krog predstavlja leto vzorčenja najnovejšega izolata (2012, 97). Z zvezdo je označen predviden obstoj skupnega prednika najstarejše velike slovenske filogenetske skupine in s tem ocenjen pričetek lokalnega širjenja virusa HIV-1 v Sloveniji (leto 1986).

število prenosov in počasi rastočo epidemijo ter na to, da so gonilo slovenske epidemije predvsem posamezniki v kasnejši fazi okužbe.

ZAKLJUČKI

Naša raziskava, ki je vključevala več kot polovico vseh HIV okuženih oseb v Sloveniji, je pokazala, da epidemija HIV poteka zlasti na račun podtipa B in da do okužb s podtipi ne-B prihaja predvsem v tujni oziroma med tujci. Podrobnejša filo-

dinamska analiza nukleotidnih zaporedij podtipa B je pokazala več vnosov podtipa B v državo od poznih 80-ih let dalje. Za večino bolnikov smo našli filogenetsko povezavo, kar nakazuje na zaprt krog posameznikov, med katerimi prihaja do okužb. Ugotovljena hitrejša mutacijska stopnja slovenskih nukleotidnih zaporedij HIV nakazuje na počasi potekajočo epidemijo in na to, da so gonilo epidemije posamezniki, ki so okuženi s HIV že dalj časa, a se tega ne zavedajo.

LITERATURA

1. Vidmar L, Klavs I, Tomažič J, et al. AIDS and HIV infection in Slovenia. *Acta Dermatovenol Alp Pannonica Adriat.* 1995; 4: 145-7.
2. Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije. Okužba s HIV v Sloveniji: letno poročilo 2013. Dosegljivo na: http://www.ivz.si/hiv_spo?pi=56_5_Filename=attName.png&_5_MediaId=85976_5_AutoResize=false&pi=107-5.3.
3. Babič DZ, Poljak M, Seme K, et al. Molecular epidemiology of HIV-1 subtypes based on analysis of pol sequences in Slovenia, 1996-2005. *J Med Virol.* 2006; 78: 997-1002.
4. Lunar MM, Židovec Lepej S, Abecasis AB, et al. Prevalence of HIV type 1 transmitted drug resistance in Slovenia: 2005-2010. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2013; 29: 343-9.
5. Babič DZ, Zelnikar M, Seme K, et al. Prevalence of antiretroviral drug resistance mutations and HIV-1 non-B subtypes in newly diagnosed drug-naïve patients in Slovenia, 2000-2004. *Virus Res.* 2006; 118: 156-63.
6. Lunar MM, Hošnjak L, Tomažič J, et al. Prevalence of HIV-1 transmitted drug resistance among patients diagnosed in 2011-2012 in Slovenia [abstract]. *Rev Ant Ther Inf Dis.* 2013; 2: 42-3.
7. Rega HIV-1 Subtyping Tool - Version 3.0. Dosegljivo na: <http://dbpartners.stanford.edu:8080/RegaSubtyping/stanford-hiv/typingtool/>
8. Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, et al. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst Biol.* 2010; 59: 307-21.
9. Drummond AJ, Suchard MA, Xie D, et al. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Mol Biol Evol.* 2012; 29: 1969-73.
10. Epi Info™ Version 3.5.3. Dosegljivo na: <http://www.openepi.com/OE2.3/Menu/OpenEpiMenu.htm>
11. Abecasis AB, Vandamme A-M, Lemey P. Quantifying differences in the tempo of human immunodeficiency virus type 1 subtype evolution. *J Virol.* 2009; 83: 12917-24.
12. Maljkovic Berry I, Ribeiro R, Kothari M, et al. Unequal evolutionary rates in the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) pandemic: the evolutionary rate of HIV-1 slows down when the epidemic rate increases. *J Virol.* 2007; 81: 10625-35.

Tomaž Vovko¹, Janez Tomažič²

Zdravljenje okužbe s humanim virusom imunske pomanjkljivosti v letu 2014

Treatment of Human Immunodeficiency Virus Infection in 2014

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: Humani virus imunske pomanjkljivosti, protiretrovirusna terapija, priporočila

Protiretrovirusno zdravljenje zmanjša obolevnost oseb, okuženih s humanim virusom imunske pomanjkljivosti, omogoča daljše in kvalitetnejše življenje in zmanjša kužnost bolezni. Protiretrovirusno zdravljenje (PRZ) uvedemo v primeru simptomatske okužbe, pri asimptomatskih bolnikih pa, ko imajo koncentracijo celic CD4 pod 350 celic/mm³ in pri določenih ko-infekcijah ter ko-morbidnostih. Dandanašnje najprimernejše začetno zdravljenje je kombinacija treh zdravil: dveh nukleozidnih zaviralcev reverzne transkriptaze, tretje zdravilo pa je ne-nukleozidni zaviralec reverzne transkriptaze ali z ritonavinom ojačani zaviralec proteaze ali zaviralec integraze. PRZ prilagajamo v primeru (dejanskega ali morebitnega) neželenega učinkovanja zdravil (toksičnosti), ne prenašanja zdravil (slaba toleranca) ali zaradi odpovedi zdravljenja (rezistenca).

ABSTRACT

KEY WORDS: human immunodeficiency virus, antiretroviral therapy, recommendations

Primary goals of antiretroviral therapy are to reduce human immunodeficiency virus-associated morbidity, to prolong the duration and quality of survival and to prevent HIV transmission. Antiretroviral therapy (ART) is recommended for all symptomatic patients, for asymptomatic patients with low CD4 count (>350 cells/mm³) and for patients with certain co-infections and co-morbidities. The optimal first line regimen for an antiretroviral therapy treatment-naïve patient consists of two nucleoside reverse transcriptase inhibitors in combination with a third drug from one of three drug classes: a non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor, a ritonavir boosted protease inhibitor or an integrase strand transfer inhibitor. A modification of ART is usually done because of the toxicities (experienced or expected), tolerance issues or because of viral failure due to the development of HIV resistant virus.

¹ Tomaž Vovko, dr. med, Klinika za Infekcijske bolezni in vročinska stanja, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Japljeva ulica 2, 1525 Ljubljana; tomaz.vovko@kclj.si

² Izr. prof. dr. Janez Tomažič, dr. med., Klinika za Infekcijske bolezni in vročinska stanja, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Japljeva ulica 2, 1525 Ljubljana

UVOD

Okužba s humanim virusom imunske pomanjkljivosti (angl. *human immunodeficiency virus*, HIV), ki povzroča sindrom pridobljene imunske pomanjkljivosti (angl. *acquired immunodeficiency syndrome*, AIDS) je bolezen, ki je s sedanjimi načini zdravljenja, predvsem zaradi latentno okuženih dolgo živečih spominskih celic T pomagalk, ne moremo pozdraviti. Z zdravljenjem bolezen, ki sama po sebi poteka z veliko umrljivostjo in s številnimi ogrožajočimi zapleti, spremenimo v obvladljivo kronično bolezen z zadovoljivo kakovostjo življenja (1).

Cilj protiretrovirusnega zdravljenja (PRZ) je maksimalno in dolgotrajno zavreti virusno razmnoževanje, kar spremljamo z merjenjem koncentracije virusa v plazmi (kvantitativna HIV RNK, virusno breme). Z obvladovanjem viremije je bolnik vse manj kužen, pride pa tudi do obnove celične imunosti, kar ocenjujemo z merjenjem koncentracije celic T pomagalk (celice CD4) (2). Na uspešnost zdravljenja vplivajo: izbira protiretrovirusnih zdravil, manjše izhodiščno virusno breme in večja izhodiščna koncentracija celic CD4 (zgodnje zdravljenje), bolnikovo sodelovanje (adherenca, tj. predanost zdravljenju – redno, vsakodnevno in doživljenjsko uživanje zdravil) in izkušeni in strokovno podkovani zdravnik, ki bolnika zdravi. Zelo pomembno je, da bolniku razložimo pomen zdravljenja in da režim zdravljenja prilagodimo posamezniku (dnevna obremenitev s številom tablet, število odmerkov, odmerjanje zjutraj ali zvečer, neželeni učinki zdravil itd.) (1, 2).

UVEDBA ZDRAVLJENJA

Eno ključnih vprašanj je, kdaj začeti zdravljenje pri osebah, ki so okužene s HIV. Odkar uporabljamo visoko učinkovito PRZ (od leta 1996 dalje) so se priporočila zelo pogosto spreminjala. Zaradi razvoja

varnejših zdravil in boljšega razumevanja naravnega poteka okužbe s HIV se uveljavlja vse bolj zgodnje zdravljenje.

Rezultati randomiziranih kontroliranih raziskav so pri osebah, ki imajo koncentracijo celic CD4 manj kot 350 celic/mm³, osebah s simptomatsko okužbo in osebah z aidsom pokazali, da uvedba PRZ zmanjša umrljivost in napredovanje bolezni (3). V Sloveniji priporočamo PRZ glede na priporočila združenja EACS (angl. *European Aids Clinical Society*, oktober 2013) pri vseh teh skupinah bolnikov, poleg tega pa še pri: nosečnicah, okužbah z virusi hepatitisa B (HBV) ter virusi hepatitisa C (HCV) in nekaterih drugih zdravstvenih stanjih (npr. povečano tveganje za kardiovaskularne bolezni, določene rakave bolezni itd.) (4). Načrtovane prekinitve zdravljenja pri koncentraciji celic CD4 nad 350 celic/mm³ (in ponovni uvedbi pod 250 celic/mm³) v primerjavi z neprekinjenim PRZ povečajo pojavljanje kardiovaskularnih zapletov in za aids značilnih obolenj (5).

Nekateri strokovnjaki priporočajo uvedbo PRZ pri vseh osebah, okuženih s HIV, ne glede na koncentracije celic CD4, vendar za takšno priporočilo še ni ustreznih kontroliranih kliničnih raziskav (2). Imamo le podatke iz večjih kohortnih raziskav (ART-CC, NA-ACCORD, CASCADE), kjer so pri bolnikih, ki so jim uvedli PRZ pri večjih koncentracijah celic CD4 (<500 celic/mm³), ugotavljali manj za aids značilnih obolenj, zmanjšanje umrljivosti pa so beležili le v eni izmed tovrstnih raziskav (NA-ACCORD) (6, 7). Obnova imunskega sistema je odvisna od izhodiščne koncentracije celic CD4; pri številnih bolnikih s koncentracijo celic CD4 pod 350/mm³ se tudi po dolgotrajnem zdravljenju z učinkovitimi zdravili (HIV RNA <40 kopij/mL plazme) koncentracija celic CD4 ne normalizira (>500 celic/mm³) (8). V raziskavi HPTN 52 so (pomembno) dokazali, da uvedba PRZ pri osebah s

koncentracijo celic CD4 med 350 in 550 celic/mm³ učinkovito zmanjša (heteroseksualni) prenos okužb, ni pa bilo razlik v umrljivosti (9). Veliko si obetamo od rezultatov obsežne mednarodne raziskave START, v kateri preučujejo prednosti in slabosti zgodnjega zdravljenja (pri bolnikih s koncentracijo celic CD4 med 350 in 500 celic/mm³ – rezultati bodo znani leta 2016).

Na povečano umrljivost zaradi t. i. ko-morbidnosti, ki niso povezana s aidsom, vpliva tudi dolgotrajno povečano virusno breme (ne glede na koncentracijo celic CD4) (10).

PROTIRETROVIRUSNA ZDRAVILA

V zadnjih 30 letih so za zdravljenje okužbe s HIV odobrili več kot 25 različnih učinkovin in več kot 10 njihovih kombinacij v eni tableti (2):

- nukleozidni zaviralci reverzne transkriptaze (angl. *nucleoside/nucleotide reverse transcriptase inhibitor*, NRTI),
- ne-nukleozidni zaviralci reverzne transkriptaze (angl. *non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor*, NNRTI),
- zaviralci proteaze (angl. *protease inhibitor*, PI),
- zaviralci integraze (angl. *integrase strand transfer inhibitor*, INSTI),
- antagonisti vezave koreceptorja CCR5 in
- zaviralci spoja virusne ovojnice s celično membrano (angl. *fusion inhibitors*, FI).

Določenih zdravil zaradi manjše učinkovitosti, pogostih ali nevarnih neželenih učinkov, neprijaznosti do bolnikov – slaba toleranca, velika količina tablet itd. – ne uporabljamo več (npr. NRTI: didanozin, stavudin, NNRTI: delaverdin, nevirapin, PI: indinavir, sakvinavir, ritonavir, tipranavir, razreda FI) (2). Zaviralce proteaze in eno zdravilo iz skupine zaviralcev integraze uporabljamo samo v kombinaciji z

majhnim odmerkom ritonavira, ki poveča koncentracijo prvega zdravila (tj. farmakološko »okrepi delovanje«). Zaradi neželenih učinkov ritonavira (Norvir®) razvijajo tudi nove farmakološke ojačevalce, med katerimi je do sedaj na voljo le kobicistat (COBI) (11). Nekatera zdravila uporabljamo predvsem za bolnike z odpornimi virusi (npr. NNRTI: etravirin) ali v pa posebnih okoliščinah (npr. NRTI: zidovudin za preprečevanje prenosa HIV z matere na otroka). Novejša zdravila so primernejša tudi zaradi enostavnosti prejemanja (npr. enkrat dnevno, fiksna kombinacija več učinkovin v eni tableti) in zaradi manjšega števila neželenih učinkov (npr. zdravila iz skupine INSTI) (2).

Na izbiro zdravljenja vplivajo specifične značilnosti bolnika (npr. hkratne okužbe s HCV in/ali HBV, depresija, tuberkuloza; uživanje metadona, heroina; huda srčno-žilna ogroženost itd.), predvsem pa izvidi testiranja odpornosti virusa proti različnim PRZ. Pred uporabo nekaterih zdravil lahko možnost pojava neželenih učinkov napovemo s pomočjo farmakogenomike: npr. navzočnost alela HLA B*5701 napoveduje pojav življenjske ogrožajoče preobčutljivostne reakcije na abakavir (12).

Pri EACS priporočil do oktobra leta 2014 še niso posodobili, so pa v letu 2014 objavili ameriška priporočila Mednarodnega protivirusnega združenja ZDA (International Antiviral Society USA) ter ameriškega Ministrstva za zdravje (Department of Health and Human Services, okr. DHHS) (2, 4, 13). Kombinacije zdravil ocenjujejo na podlagi jakosti priporočila: A – močno priporočljivo, B – srednje priporočljivo in C – pogojno priporočljivo ter kvalitete dokazov: I – ena ali več randomiziranih kontroliranih raziskav, II – ena ali več dobro načrtovanih, ne-randomiziranih ali opazovalnih kohortnih raziskav z dolgotrajnim sledenjem, III – mnenje strokovnjakov.

ZAČETNI REŽIMI ZDRAVLJENJA PRI ŠE NEZDRAVLJENIH BOLNIKIH V LETU 2014 (POVZETO PO PRIPOROČILIH AMERIŠKEGA MINISTRSTVA ZA ZDRAVJE)

Pri še nezdravljenih, t. i. naivnih bolnikih priporočajo kombinacijo dveh NRTI: ali kombinacije tenofovir disoproksil fumarata (TDF) z emtricitabinom (FTC) (Truvada®) ali kombinacije abakavira (ABC) z lamivudinom (3TC) (Kivexa®) s tretjim zdravilom: NNRTI, z ritonavirjem ojačan PI (okr. PI/r) ali INSTI (AI) (2). Izbira zdravil je odvisna od izhodiščne koncentracije celic CD4, virusnega bremena, prisotnosti HLA B*5701, ledvične funkcije ter pridruženih bolezni (ko-infekcije, ko-morbidnosti).

Priporočila za zdravljenje (ne glede na izhodiščno koncentracijo celic CD4 ali virusnega bremena) – dva NRTI, ki jih kombiniramo z/s:

- NNRTI: efavirenz (EFV)/TDF/FTC* ali EFV + TDF/FTC* (AI),
- PI/r: atazanavir + ritonavir (ATV+r) + TDF/FTC* (AI), darunavir + ritonavir (DRV+r) + TDF/FTC* (AI),
- INSTI: dolutegravir (DTG) + ABC**/3TC* (AI) ali DTG + TDF/FTC* (AI); elvitegravir (ELV)/COBI/TDF/FTC* – za bolnike z očistkom kreatinina nad 70 mL/h (AI); raltegravir (RAL) + TDF/FTC* (AI).

Pri bolnikih z izhodiščnim virusnim bremenom manj kot 100.000 kopij/mL pa kombiniramo dva NRTI z/s:

- NNRTI: EFV + ABC**/3TC* (AI), rilpivirin (RPV)/TDF/FTC* (za bolnike z izhodiščno vrednostjo koncentracije celic CD4 nad 200 celic/mm³) (AI),
- PI/r: ATV+r + ABC**/3TC* (AI).

Poleg teh priporočajo tudi alternativne kombinacije, ki imajo nekatere pomanj-

kljivosti (npr. več neželnih učinkov) ali pa je manj podatkov o njihovi učinkovitosti – dva NRTI kombiniramo s/z:

- PI/r: DRV+r + ABC**/3TC* (BII), lopinavir/ritonavir* (LPV/r*) + ABC**/3TC* (BI), LPV/r* + TDF/FTC* (BI),
- INSTI: RAL + ABC**/3TC* (BII).

MOREBITNE SPREMEMBE ZDRAVLJENJA PRI SICER UČINKOVITEM ZDRAVLJENJU

Za spremembo zdravljenja se odločimo najpogosteje zaradi naslednjih vzrokov (2, 14):

- toksičnosti PRZ – neželeni učinki zdravil: nekateri so značilni za posamezno zdravilo (npr. indirektna hiperbilirubinemija pri atazanavirju), nekateri so značilni za skupino zdravil (npr. metabolični sidrom pri PI, motnje spanja pri NNRTI),
- součinkovanje zdravil: npr. pri uživanju zaviralcev protonske črpalke se izogibamo uporabi atazanavira in rilpivirina, pri zdravljenju z efavirenzom moramo povečati odmerek metadona, velik vpliv ritonavira na zdravila, ki se metabolizirjo preko citokroma P450 CYP3A4, itd.
- načrtovana nosečnost,
- zaščita pred dolgoročno toksičnostjo – staranje in/ali dodatne bolezni in ko-infekcije (včasih moramo izbrati učinkovine, ki so npr. manj aterogene; pri zdravljenju hepatitisa C ne smemo uporabiti določenih PRZ; pri zdravljenju tuberkuloze ne smemo uporabljati PI skupaj z rifampicinom) ali
- poenostavitev režima zdravljenja – zdravljenje s fiksno kombinacijo zdravil (npr. tri učinkovine v eni tableti); v določenih primerih je možno zdravljenje s samo dvema ali samo enim aktivnim zdravilom.

*fiksna kombinacija zdravil v eni tableti, ** za bolnike, ki so HLA B*5701 negativni

ZDRAVLJENJE BOLNIKOV, KI SO OKUŽENI Z ODPORNIMI VIRUSI (T. I. IZKUŠENI BOLNIKI)

Ko odpove začetni režim zdravljenja, je priporočljivo, da ga čim prej zamenjamo, sicer pride do razraščanja odpornih virusov, pojavljanja novih mutacij in širjenja odpornosti virusa na druga zdravila istega razreda (križna odpornost) in celo na druge razrede zdravil (14). Nova zdravila izberemo tako na podlagi testov odpornosti, ki jih opravimo ob odpovedi terapije, kakor tudi glede na predhodne rezultate oziroma (ne)uspehe zdravljenja. V Sloveniji določamo odpornost s pomočjo genotipizacije, možno pa je opraviti tudi fenotipsko testiranje odpornosti. Za optimalno (reševalno) zdravljenje je pomembno, da uvedemo vsaj dve (bolje tri) učinkoviti zdravili. V kolikor to ni možno, je morda bolje, da z zamenjavo počakamo (14).

KLINIČNA OBRAVNAVA BOLNIKOV, OKUŽENIH S HIV OZ. Z AIDSOM

Po uvedbi PRZ je potrebno dolgoletno sledenje, preverjanje neželenih učinkov in učinkovitost zdravljenja s spremljanjem virusnega bremena in koncentracije celic CD4. Poleg PRZ je pri nizkih koncentracijah celic CD4 potrebna tudi protimikrobna kemoprofilaksa.

Za optimalno obravnavo bolnika je včasih potrebno tudi poznavanje součinkovanja različnih zdravil (najnovejše informacije so na voljo na spletnem naslovu www.hiv-druginteractions.org) in možnost merjenja koncentracije protiretrovirusnih učinkovin. Morda najpomembnejše je, da bolnika zdravi izkušen in predan zdravnik, ki stalno spremlja razvoj stroke.

ZAPLETI PRI DOLGOTRAJNEM PROTIRETROVIRUSNEM ZDRAVLJENJU

Z daljšim preživetjem bolnikov, ki so okuženi s HIV (na novo se vse pogosteje okužijo tudi starejši ljudje), se pojavljajo bolezni, ki so povezane s staranjem – t. i. ko-morbidnosti: srčno-žilne bolezni (npr. miokardni infarkt), rakave bolezni (povezane s HIV, npr. limfomi, ali nepovezane s HIV, npr. analni karcinom, pljučni rak), bolezni jeter, ledvic in kosti (zgodnja osteoporoza) in nevrokognitivne motnje. Vzrok je sam virus, ki se kljub učinkovitemu zdravljenju še vedno minimalno razmnožuje in povzroča kronično vnetje, neželeni učinki PRZ (npr. metabolni sindrom, prizadetost ledvic, kosti) in bolnikove razvade, ki so pri tovrstnih bolnikih pogostejše (kajenje, alkohol, manj gibanja, nagnjenost k motnjam v presnovi glukoze itd.) (2).

ZAKLJUČEK

Učinkovito protiretrovirusno zdravljenje je eden izmed največjih napredkov medicine v zadnjih desetletjih; neizogibno smrtno okužbo je spremenilo v obvladljivo kronično bolezen, ki omogoča kvalitetno življenje z le malo skrajšano življenjsko dobo. V prihodnosti pričakujemo razvoj vse boljših in učinkovitejših zdravil, ki bodo življenje oseb, okuženih s HIV, še dodatno olajšale.

Na žalost pa je po svetu in tudi v Sloveniji še vedno preveč ljudi, ki se jim okužba ugotovi (pre)pozno; v napredovali fazi bolezni je zdravljenje manj učinkovito, večja je obolevnost in umrljivost. Za uspešno zdravljenje je zato ključno predvsem zgodnje odkrivanje okužbe ter takojšnja povezava okuženih z zdravstvenim sistemom.

LITERATURA

1. Hoffmann C. Goals of antiretroviral treatment. IN: Hoffmann C, Rockstroh JK, eds. [internet]. HIV 2012/2013: 136–53 [citirano 2014 Okt 29]. Dosegljivo na: <http://www.hivbook.com>.
2. Panel on Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents [internet]. Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-1-infected adults and adolescents. Department of Health and Human Services [citirano 2014 Okt 29]. Dosegljivo na: <http://aidsinfo.nih.gov/ContentFiles/AdultandAdolescentGL.pdf>.
3. Mocroft A, Furner HJ, Miro JM, et al. The Incidence of AIDS-Defining Illnesses at a Current CD4 Count \geq 200 Cells/ μ L in Post-Combination Antiretroviral Therapy Era. *CID* 2013; 57: 1038–47.
4. European AIDS Clinical Society Guidelines 2014 [internet] [citirano 2014 Okt 29]. Dosegljivo na: www.europeanaidscinicalsociety.org.
5. Strategies for Management of Antiretroviral Therapy (SMART) Study Group. Emery S et al. Major clinical outcomes in antiretroviral therapy (ART)-naive participants and in those not receiving ART at baseline in the SMART study. *J Infect Dis*. 2008; 197 (8): 1133–44.
6. Kitahata MM, Gange SJ, Abraham AG, et al. Effect of early versus deferred antiretroviral therapy for HIV on survival. *N Eng J Med*. 2009; 360 (18): 1815–26.
7. Writing Committee for the CASCADE Collaboration. Timing of HAART initiation and clinical outcomes in human immunodeficiency virus type 1 seroconverters. *Arch Intern Med*. 2011; 171 (17): 1560–9.
8. Moore R, Keruly J, Gallant J. Tenofovir and renal dysfunction in clinical practice. Paper presented at: 14th Conference on Retrovirus and Opportunistic Infections; 2007; Los Angeles, CA.
9. Cohen MS, Chen YQ, McCauley M, et al. Prevention of HIV-1 infection with early antiretroviral therapy. *N Eng J Med*. 2011; 365: 493–505.
10. Mugavero MJ, Davila JA, Nevin CR et al. From access to engagement: measuring retention in outpatient HIV clinical care. *AIDS Patient Care STDS*. 2010; 24 (10): 607–13.
11. Capetti A, Rizzardini G. Cobicistat: a new opportunity in the treatment of HIV disease? *Expert Opin Pharmacother*. 2014; 15 (9): 1289–98.
12. Philips EJ. Genetic screening to prevent abacavir hypersensitivity reaction: are we there yet? *Clin Infect Dis*. 2006; 43 (1): 103–5.
13. Gunthard HF, Aberg JA, Eron JJ, et al. Antiretroviral Treatment of Adult HIV Infection 2014 Recommendations of the International Antiviral Society–USA Panel. *JAMA*. 2014; 312 (4): 410–25.
14. Hoffmann C. When to Switch? IN: Hoffmann C, Rockstroh JK, eds. HIV [internet] 2012/2013: 190–8 [citirano 2014 Okt 29]. Dosegljivo na: <http://www.hivbook.com>.

Marko Potočnik¹, Saša Simčič²

Sifilis – pregled diagnostike

Syphilis Diagnostics: An Overview

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: sifilis, *Treponema pallidum*, diagnostika, laboratorijski testi

Sifilis je spolno prenosljiva okužba, ki jo povzroča bakterija *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*, prenos je skoraj izključno spolen ali z okužene matere na plod. Bolezen poteka v stadijih z zelo raznoliko klinično sliko in obdobji brez kliničnih sprememb. V nasprotju z zdravljenjem sifilisa, ki je preprosto, poceni in učinkovito, diagnoza sifilisa še vedno ostaja izziv, kar posebej velja za latentni stadij bolezni, nosečnice, novorojenčke ali za diagnozo zgodnje faze bolezni. Diagnostika sifilisa združuje prisotnost kliničnih znakov ali zgodovine z neposrednim dokazom *T. pallidum* v kliničnih vzorcih bolnika (primarni, sekundarni in pozni sifilis) in/ali reaktivne netreponemske ali treponemske serološke teste.

ABSTRACT

KEY WORDS: syphilis, *Treponema pallidum*, diagnostics, laboratory tests

Syphilis is a sexually transmitted infection caused by *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*, almost exclusively transmitted by sexual intercourse, or from mother to foetus in utero. The course of the disease consists of intermittent stages with sequential symptomatic and asymptomatic periods. In contrast with the treatment of syphilis, which is cheap and effective, the diagnostics remains challenging, especially in the latent stage, pregnancy or in the early stage of the disease. The diagnosis of syphilis should be based on the presence of clinical signs, reactive laboratory tests (in serum and/or cerebrospinal fluid, and eventual direct detection of *T. pallidum*) and medical history.

¹ Prim. doc. dr. Marko Potočnik, dr. med., dr. dent. med., Dermatovenerološka klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana

² Asist. znan. sod., strok. svet. dr. Saša Simčič, univ. dipl. kem., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana; sasa.simcic@mf.uni-lj.si

UVOD

Sifilis povzroča *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*, gibljiva spiralna bakterija, ki je občutljiva za toploto in zunaj organizma živi le nekaj ur. Meri 10–15 µm v dolžino, ima 12–18 enakih zavojev in se deli na 30–35 ur. Treponemo najdemo v velikem številu na erozivnih spremembah kože in sluznic ter v prizadetih bezgavkah. V krvi je ne najdemo, razen ob izbruhu eksantema v fazi hematogene diseminacije. Gojitev ni možna, barvanje je težavno, kar nam diagnostiko okužbe otežuje. Pri *T. pallidum* lahko identificiramo več kot 100 antigenov, kar je pomembno za preiskave v krvi in likvorju. Bolezen klinično delimo na zgodnji (trajanje do 1 leta) in pozni sifilis (trajanje več kot 1 leto). Zgodnji sifilis delimo na primarni, sekundarni in zgodnji latentni stadij, pozni pa na pozni latentni in terciarni sifilis (gumozni, kardiovaskularni in nevrosifilis) (1, 2).

Sifilis je razširjen po vsem svetu, še vedno so deljeni pogledi, ali so ga prinesli Kolumbovi mornarji iz Amerike ali pa je v Evropi obstajal že prej. Gotovo je, da se je bolezen širila v času velikih vojn in gospodarskih kriz, kar velja še dandanes. Velik porast zasledimo med 2. svetovno vojno in po njej.

Podatki za Slovenijo za obdobje pred 2. svetovno vojno, v letih vojne in takoj po njej niso zanesljivi. Po letu 1950 je število okužb s sifilisom pri nas začelo upadati, v začetku šestdesetih let ponovno nekoliko naraščalo in se ni pomembno spremenjalo do druge polovice sedemdesetih let. V letu 1994 je incidenca znatno porastla in v naslednjih letih nihala. V letu 2013 je bilo prijavljenih 35 primerov zgodnjega sifilisa (1,7/100.000 prebivalcev), kar je 44 % manj kot v letu 2012. Povišano število prijavljenih primerov po letu 2004 je predvsem posledica povečanega števila primerov med moškimi. Breme zgodnjega sifilisa je nesorazmerno veliko pri

moških, ki imajo odnose z moškimi. V zadnjih desetih letih je število prijavljenih primerov zgodnjega sifilisa nihalo od najnižjega, 13 v letu 2004, do najvišjega, 79 v letu 2011 (3).

Skoraj vse okužbe nastanejo pri spolnih stikih. Okužbe s predmeti so zaradi izredne občutljivosti treponeme na vplive iz okolja zelo redke. Treponema se pri kotalnem sifilisu transplacentarno prenesa z nosečnice na plod. Čimprejšnji dokaz okužbe pa je pomemben za uspešno zdravljenje in odkritje izvora okužbe in s tem za preprečevanje širjenja bolezni.

Zaradi še vedno zelo učinkovitega zdravljenja s penicilinom je zgodnja diagnoza bolezni, ki zahteva poznavanje klinične slike in pravilne uporabe diagnostičnih preiskav, zelo pomembna. Diagnostične preiskave na sifilis moramo opraviti pri nosečnicah, krvodajalcih in pri osebah z višjim tveganjem (osebah z nedavno ugotovljeno spolno prenosljivo okužbo (SPO): okužbo s HIV, hepatitis B in C, osebah s tveganim spolnim vedenjem, moških, ki imajo odnose z moškimi, osebah, ki se ukvarjajo s prostitucijo itd.). Pri vseh bolnikih s sifilisom moramo opraviti preiskave na ostale spolno prenosljive okužbe.

DIAGNOZA SIFILISA

V nasprotju z zdravljenjem sifilisa, ki je preprosto, poceni in učinkovito, diagnoza sifilisa še vedno ostaja izziv, kar posebej velja za latentni stadij bolezni, nosečnice, novorojenčke, ali za diagnozo zgodnje faze bolezni. Diagnostika sifilisa združuje prisotnost kliničnih znakov in zgodovine z neposrednim dokazom *T. pallidum* v kliničnih vzorcih bolnika (primarni, sekundarni in pozni sifilis) in/ali reaktivne netreponemske ali treponemske serološke teste. Če neposredne diagnostične metode niso na voljo, se priporoča serološko testiranje, netreponemski in treponemski test (5–7). Zavedati pa se moramo, da so

vsi serološki testi pred pojavom čankarja in vsaj teden dni po njegovem nastanku negativni, kar bolezní ne izključuje. V prispevku bo predstavljen pregled klinične in laboratorijske diagnostike sifilisa in nekatere posebnosti pri tolmačenju rezultatov v luči letošnjih Evropskih smernic za obravnavo bolnika s sifilisom (5). Diagnostika nevrosifilisa je v tem zborniku obravnavana v prispevku Mikrobiološka diagnostika nevrosifilisa.

KLINIČNA DIAGNOZA

Potek bolezni je odvisen predvsem od imunskega odziva okuženega organizma. Na splošno velja, da traja inkubacija približno 3 tedne, lahko pa traja od 10 do 90 dni. Odvisna je od virulence povzročitelja, števila inokuliranih treponem in imunskega odziva okuženega organizma. Uživanje antibiotikov lahko podaljša inkubacijo.

Na mestu inokulacije nastane primarni afekt, ki se začne kot drobna čvrsta papula. Ta na površini hitro erodira (erozivna skleroza) in razpade v okroglo ali ovalno nebolečo razjedo s trdimi robovi, trdi čankar (*ulcus durum*), ki ni boleč. Doseže velikost v razponu od leče do srednje velikega kovanca, ima odsekane robove, dno je gladko, čvrsto in se sveti.

Kadar je čankar na mestu, kjer je tkivo rahlo (prepicij ali *labia maiora*), ga obda značilen neboleč edem (oedema indurativum), ki ga lahko povsem prekrije. Trdi čankar najdemo najpogosteje na zunanjem spolovilu, pri moškem na penisu, pri ženski na sramu, pa tudi na materničnem vratu. Možne so tudi lokalizacije zunaj spolovila, kot so ustnice, ustna votlina in zadnjik, ki jih lahko prezremo. Nezdravljen primarni afekt se v nekaj tednih zaceli. Ob sekundarni okužbi zapuša brazgotino. Pri vsaki razjedi anogenitalnega področja moramo izključiti sifilitično okužbo.

Regionalne bezgavke otečejo 7–10 dni po nastanku trdega čankarja (*scleradenitis regionalis*). So trde in ne bolijo. Od

čankarja do bezgavk vodi na penisu zadebeljena mezigovnica (*lymphangitis dorsalis*). Osem do devet tednov po okužbi se povečajo vse bezgavke (generalizirani skleradenitis), so gladke, elastične, med seboj premakljive, niso zraščene s kožo ali podlago in ne bolijo. Včasih se pojavijo tudi splošni prodromalni znaki: rahlo zvečana telesna temperatura, glavobol in bolečine v sklepih. Bolnik se na splošno slabo počuti. Približno 10 tednov po okužbi se pojavi makulozen ali makulopapulozen, nesrbeč, enakomerno diseminiran, simetričen eksantem, ki po nekaj dneh spontano izgine. Najprej ga vidimo po koži trupa, širi se centrifugalno s trupa na okončine, v tretjem do četrtem mesecu po okužbi po istem vrstnem redu izgine. Papulozni in papuloskvamozni (psorizasti podobni) eksantemi so redkejši. Dokaj značilne so rdeče ali rjavo rdeče makule in papule po dlaneh, *exanthema palmare et plantare*.

Na sluznicah papulozne spremembe na površini erodirajo in se združujejo v velike, vlažne, zelo kužne plošče, *condylomata lata*. Ob eksantemu so splošno povečane bezgavke (*scleradenitis universalis*) in enantem sluznice tonzil, nebnihih lokov in zadnjega dela mehkega neba z uvulo (*angina syphilitica*). Eksantemi se lahko v naslednjih mesecih ponovijo (recidivni eksantemi). Približno 4–5 mesecev po okužbi se pojavi alopecija *syphilitica*. Lahko je difuzna ali pogosteje kot nekaj milimetrov velika mesta brez las, alopecija *areolaris* (videti je kakor od moljev nažrto blago). Po koži zgornjega dela trupa se lahko pojavijo hipopigmentirane lise (*leukoderma syphiliticum*), ki po nekaj mesecih izginejo. Naravni imunski mehanizmi (makrofagi, celična imunost) približno po enem letu nevtralizirajo ali uničijo večino treponem, tako da na koži in drugih organih ne opazimo bolezenskih sprememb. Bolezen je prešla v latentni, *syphilis latentis*, ki je najpogostejši pozni sifilis. Na-

stane pri več kot polovici nezdravljenih bolnikov, traja vse življenje in ga lahko ugotovimo samo s serološkimi testi. O latentnem sifilisu ne moremo govoriti, kadar so spremembe na srcu, živčevju ali drugih organih.

Pri nezdravljenem poznem sifilisu se na koži lahko pojavijo destruktivne spremembe, tuberoserpiginozni sifilidi in gume. Nastanejo med tretjim in petim letom po okužbi, lahko tudi pozneje. Trajajo lahko več let, kadar razpadejo, lahko nastanejo ulceracije. Guma je tumoroidna sprememba, navadno solitarna, globoko v koži, podkožju ali kateremkoli organu, ne boli. Mikroskopsko vidimo specifično granulacijsko tkivo, ki vključuje epiteloidne celice, velikanke, limfocite in razpad tkiva. Sifilitične spremembe so prisotne tudi na ožilju in osrednjem živčevju. Že pri zgodnjem sifilisu, v času izbruha eksantema, se večkrat pojavijo znamenja blagega sifilitičnega meningitisa, ki pa hitro minejo. Blažji ali hujši nevrosifilis prizadene 5–10 % nezdravljenih bolnikov. Bolezenska znamenja se pojavijo približno 5–12 let po okužbi. Pogostejši je meningovaskularni sifilis, ki pogosto traja dolga leta brez izrazitih nevroloških simptomov. Med pozne oblike, ki se pokažejo včasih šele 15–25 let po okužbi prištevamo tabes dorsalis in progresivno paralizo. Pri diagnostiki nevrosifilisa pa so poleg seroloških testov in nevrološkega pregleda odločilni testi v likvorju. Nezdravljeni pozni sifilis pogosto prizadene srce in ožilje (mesaortitis syphilitica, anevrizma, stenozna koronarnih ustij) (1, 2).

Pri nosečnicah se klinična sifilisa ne razlikuje od siceršnje. Treponeme lahko od 12. tedna dalje preidejo v placento, kar ima lahko za posledico splav, mrtvorojenega otroka (v 30–40 %) ali kongenitalni sifilis. Tveganje vertikalnega prenosa okužbe se zmanjšuje z oddaljenostjo okužbe nosečnice (skoraj 100 % v prvem letu in do 5 % po štirih letih po

nezdravljeni okužbi) (4). Kljub nizki incidenci zgodnjega sifilisa pri ženskah v Sloveniji, vztrajamo pri presejalnem testiranju nosečnic.

Za odločitev za pravilno uporabo diagnostični preiskav je nujno poznavanje klinične slike posameznih obdobij bolezni in pravilna ocena anamnestičnih podatkov.

LABORATORIJSKA DIAGNOZA Neposredno dokazovanje

Zgodnji sifilis dokazujemo z neposrednimi metodami, kot je mikroskopija s temnim poljem, neposredni imunofluorescenčni test in molekularne metode za odkrivanje *T. pallidum*-specifičnih zaporedij DNA, v vzorcih iz bolnikovih kožnih/sluzničnih razjed ali tkiv (5–8).

Mikroskopijo s temnim poljem (MTP), kot edino metodo za potrjevanje primarnega in sekundarnega sifilisa pri odraslih, ali zgodnjega kongenitalnega sifilisa, ki se izvaja pri preiskovancu (angl. *Point-Of-Care Testing*, POCT), je zato priporočljivo izvajati v specializiranem laboratoriju, v okviru klinike, ki obravnava bolnike s spolno prenosljivimi okužbami. Občutljivost enkratnega mikroskopskega pregleda je majhna, zato mikroskopija temelji na pregledih v treh zaporednih dnevih. Bolniki s primarnim čankarjem, ki so mikroskopsko pozitivni, so lahko serološko še negativni. Test je manj zanesljiv pri pregledovanju preparatov rektalnih in nepenisnih genitalnih razjed in zaradi prisotnosti komezalnih treponem ni primeren za pregledovanje razjed v ustih (6, 8). Neposredni imunofluorescenčni test se kljub večji občutljivosti in specifičnosti, zlasti če v konjugatu uporabimo monoklonska protitelesa, zaradi slabše dostopnosti do ustreznih reagentov opušča (9).

Starejša metoda izbora za odkrivanje treponem v tkivnih biopsijah je bila srebrobritev po Warthin-Starry, vendar jo je zaradi zahtevne izvedbe in nezanesljivih rezultatov nadomestilo imunohistokemijsko

barvanje s poliklonskimi protitelesi. Imunohistokemijsko barvanje doprinese k histopatološki diagnozi sekundarnega in terciarnega sifilisa, v redkih primerih seronegativnih bolnikov za odkrivanje treponem v koži in v razjedah sluznic in tkiv, večinoma pri HIV-pozitivnih bolnikih (9, 10).

Sodobne neposredne metode temeljijo na pomnoževanju specifičnih nukleotidnih zaporedij treponemske DNA v različnih vzorcih, kot so izcedki iz primarnih in sekundarnih lezij, tkiva ali telesne tekočine, z verižno reakcijo s polimerazo (angl. *Polymerase Chain Reaction*, PCR). Zaenkrat ni niti mednarodno priznanega protokola niti komercialnega testa PCR. Večina protokolov dokazuje DNA gene za površinske lipoproteine, kot so *bmp*, *tpy47* in *tmpA*, ali genov, kot je *polA*, ki so vpleteni v podvojevanje genoma. PCR je priporočena metoda za lezije, kjer je verjetnost, da so prisotne komenzalne treponeme. Diagnostično je PCR uporaben v zgodnji fazi bolezni, za izcedke iz razjed, ko so serološki testi še negativni. Pomaga tudi v diagnostiki kongenitalnega sifilisa, nevrosifilisa in terciarnega sifilisa, ker je v bolnikovih vzorcih pričakovano malo treponem. Zaradi prisotnosti inhibitorjev je PCR za kri neobčutljiv in diagnostično ni uporaben niti v primarni ali sekundarni fazi bolezni, ko je v krvi največ bakterij (5, 6, 11). Za sočasno diagnostiko pogostih ulceroznih spolno prenosljivih okužb, to je sifilis, mehki čankar (*Haemophilus ducreyi*) in genitalni herpes (herpesvirusa herpesa simpleksa tip 1 in tip 2), je na voljo test multipleks PCR v realnem času (RT-PCR) za brise genitalnih razjed. Tarčni gen v testu RT-PCR za sifilis je gen za 47-kDa membranski antigen *T. pallidum* (8, 12).

Na osnovi molekularno-epidemioloških raziskav danes vemo, da je za različna geografska področja porazdelitev genetskih podrazličic sifilisa različna. Analiza genov z največjo močjo razlikovanja genetskih podrazličic *arp*, *trp* in *rpsA* kaže, da

je najbolj razširjena podrazličica 14d. Zanesljivih podatkov o povezavi genetskih podrazličic ali različic seva (različice gena *tp0548*) z odpornostjo na makrolidne antibiotike in nevrosifilisom še ni (13).

Serološki testi za sifilis

Serološki testi za sifilis (STS) omogočajo verjetno diagnozo sifilisa. Z netreponemskimi flokulacijskimi testi (NTT), kot je test VDRL (angl. *Venereal Disease Research Laboratory*), test RPR (angl. *Rapid Plasma Reagin*) ali test TRUST (angl. *Toluidine Red Unheated Serum Test*), dokazujemo bolnikova heterofilna protitelesa IgG in IgM proti zmesi antigenov, kardiolipinu, lecitinu in holesterolu. NTT so pozitivni 10–15 dni po nastanku čankarja, tj. okoli šest tednov po okužbi, kot posledica bolnikovega protitelne odziva proti ostankom iz poškodovanih bolnikovih celic in proti treponemskim membranskim lipidom. Če sifilis ni zdravljen, titer NTT doseže vrhunec med prvim in drugim letom po okužbi. NTT so večinoma šibko pozitivni tudi v zelo poznem obdobju sifilisa, ker je pri terciarnem sifilisu spontana seroreverzija izjemna redkost. Titri NTT so povezani z aktivnostjo bolezni in uspešnostjo zdravljenja.

S treponemskimi testi (TT), kot so test TPHA (angl. *T. pallidum Haemagglutination test*), test TPPA (angl. *T. pallidum Passive Particle Agglutination test*), test FTA-ABS (angl. *Fluorescent Treponemal Antibody Absorption test*), test EIA (angl. *Treponemal Enzyme Immunoassay*), test CIA (angl. *Chemiluminescence Immunoassay*) ali test LIA (angl. *Line Immuno Assay, IgG Immunoblot test*), določamo bolnikova protitelesa, večinoma IgG in IgM, proti treponemskim nativnim ali rekombinantnim antigenom, bakterijskega seva Nichols *T. pallidum* subsp. *pallidum*. Običajno so TT pozitivni že po prvem do drugem tednu od nastanka čankarja, testi, s katerimi določamo treponemska protitelesa IgM, kot je test EIA/IgM, IgM-FTA-ABS

ali test IgM-imunoblot, pa že po treh tednih od okužbe. Zavedati se moramo, da je občutljivost TT na IgM majhna, so pa diagnostično pomembnejši za novorojenčke in likvor. Posebnost sifilisa je še, da imajo bolniki protitelesa IgM ne samo v zgodnji fazi bolezni, temveč so lahko prisotna tudi v latentnem in poznem obdobju sifilisa, kar omejuje diagnostično vrednost testov na IgM pri odraslih. Titer TT je z izjemo kongenitalnega sifilisa nediyagnostičen in se naj ne bi uporabljal za oceno aktivnosti bolezni in za spremljanje terapije. Večina bolnikov ima protitelesa doživljenjsko, ne glede na to, ali je bila bolezen zdravljena. Zato je potrebna previdnost pri tolmačenju STS v primeru pozitivnega TT in neaktivnega NTT, kar je največkrat znak za predhodno zdravljen zgodnji sifilis, razen v primerih, ko ima bolnik vse znake primarnega sifilisa. TT so zelo specifični in so bili prvotno vpeljeni za potrjevanje NTT. Z avtomatizacijo nekaterih TT, kot sta testa druge generacije EIA in CIA, pa se TT uporablja za začetni presejalni test. Presejalni TT so tudi hitri testi pri bolniku (POCT), ki se v revnejših okoljih uporabljajo kot edini dokaz okužbe.

Noben od STS ne razlikuje med spolno prenosljivim sifilisom in neveneričnimi treponematozami, to je frambezija/malinovka (angl. *yaws*; *T. pallidum* subsp. *pertenue*), endemični sifilis (*T. pallidum* subsp. *endemicum*) in pinta (*T. carateum*). Omenjeni patogeni so antigensko podobni, zato boleznii ločujemo po načinu prenosa, epidemiologiji in kliničnih znakih. V zadnjem času je diferencialno diagnostično obetajoča molekularna diagnostika s PCR in sekveniranjem DNA (1, 5, 6, 14).

Presejalni testi

V letošnjih Evropskih smernicah za obravnavo bolnika s sifilisom v serološki diagnostiki ni pomembnejših novosti glede na prejšnje smernice iz leta 2008, z izjemo vključitve avtomatiziranih TT v obstoječe

diagnostične algoritme. Primarni presejalni test za sifilis je ali TT ali NTT ali oba skupaj. V primeru presejalnega TT imajo v dobro opremljenih evropskih laboratorijih prednost avtomatizirani TT, kot sta testa CIA ali EIA. Algoritem s primarnim presejalnim TT pokaže bolnike tako s predhodnje zdravljenim sifilisom kot tudi bolnike z nezdravljenim sifilisom. V primeru algoritma s presejalnim NTT, ki se priporoča v ZDA, pozitivni NTT pokaže bolnike samo z aktivnim infektivnim sifilisom. V izogib lažno negativnega NTT kot posledico pojava procone je namesto kvalitativnega potrebno izvesti polkvantitativni test. NTT v primerjavi s TT pogosteje zgrešijo zelo zgodnji sifilis in pozni terciarni sifilis. Algoritem z obema testoma, TT in NTT, je najbolj smiselno izvesti, če ima bolnik znake zelo zgodnjega sifilisa (nedavni čankar) (5, 6, 15).

Na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani (IMI MF UL) za presejanje bolnikov s sumom na sifilis istočasno izvajamo testa TPHA in RPR. Nedavno smo v diagnostiko uvedli povsem avtomatiziran test CIA, ki za določanje treponemskih protiteles IgM in IgG uporablja rekombinantni antigen Tp17. Test je primeren ne samo za hitro in poceni presejanje asimptomatske populacije, temveč se zaradi večje občutljivosti in specifičnosti, kot jo imata testa TPHA in RPR, uveljavlja kot primarni presejalni test, ki olajša diagnostiko zgodnjega in latentnega sifilisa.

Potrditveni testi

V primeru pozitivnega presejalnega TT sledi potrditveni test, to je drug TT, kot je bil presejalni, in polkvantitativni NTT. Če je potrditveni TT pozitiven, NTT pa negativen, je pri sumu na zgodnji sifilis priporočljivo izvesti še test EIA/IgM. Ne glede na rezultat je v vsakem primeru zdravljenje potrebno. Serološki vzorec s pozitivnim TT in negativnim NTT se lahko poja-

vi pri bolnikih z zelo zgodnjim sifilisom, pri bolnikih z zdravljnim zgodnjim sifilisom in zelo redko v primeru poznega terciarnega sifilisa, zato mora biti pred uvedbo zdravljenja in obveščanjem bolnikovega partnerja velika pozornost usmerjena v klinični pregled bolnika, zgodovino bolezni in tvegano spolno vedenje bolnika. Če se za presejalni test uporabi NTT, se pozitiven rezultat potrjuje s TT. V primeru presejalnih testov TPHA in RPR je nujno izvesti polkvantitativni test RPR, zlasti v primeru pozitivnega TPHA. Morebiten lažno pozitiven rezultat testa TPHA, če je NTT negativen, izključujemo z drugim TT, kot je CIA, EIA ali imunoblot (manj priporočljiv je test FTA-ABS), kar pa ne vpliva na odločitev za terapijo, ki se v primeru bolnika z znaki zgodnjega sifilisa in negativnega NTT priporoča v vsakem primeru. Če bolnik nima znakov bolezni in ima stalno negativen NTT, se zdravljenje ponavadi ne uvede. Test FTA-ABS se ne priporoča več kot standardni potrditveni test, temveč kot dopolnilni test, ki naj bi se izvajal samo v specializiranih laboratorijih z izurjenim osebjem in velikim številom potrditvenih testov. Test IgG-imunoblot je priporočljiv, če standardni potrditveni TT ne potrdi pozitivnega presejalnega TT, sicer pa v primerjavi z drugimi TT nima dodane vrednosti (5, 8).

Na IMI MF UL za potrjevanje presejalnih testov izvajamo vse omenjene standardne potrditvene teste razen testa EIA. Protitelesa IgM zaenkrat določamo s testom IgM-FTA-ABS, ki ga bo v prihodnje, v serumu, nadomestil encimskoimunski test EIA/IgM.

Testi za serološko sledenje aktivnosti sifilisa in učinka terapije

Za sledenje aktivnosti bolezni in terapije ter možne ponovne okužbe in pojava bolezni sta primerna NTT, VDRL ali RPR. Pri bolniku z zgodnjim sifilisom se klinič-

ni in serološki odziv na terapijo preverja po enem mesecu, po treh mesecih in nato vsakih 6 mesecev. Titer VDRL ali RPR naj bi se v 6–12 mesecih zmanjšal za 4-krat (za dva titra), da je zdravljenje uspešno. Večina bolnikov z zgodnjim sifilisom po uspešnem zdravljenju, po enem do dveh letih, nima netreponemskih protiteles. Seroreverzija se lahko pojavi tudi po nekaj letih, kar je odvisno od trajanja okužbe in titra protiteles ob začetku zdravljenja. Bolnikov s stabilnimi majhnimi titri NTT (do 1:4, v enoletnem obdobju) serološko ni več potrebno slediti. V nasprotju z NTT so TT pozitivni večinoma do konca življenja. Po nekaj letih po zdravljenju je seroreverzija TT redka. Bolniki z nezdravljenim latentnim sifilisom, zlasti poznim latentnim, imajo pogosto negativne NTT. Bolnikov s poznim latentnim sifilisom, ki niso HIV-pozitivni, in z reaktivnim NTT, ki imajo po zdravljenju nespremenjen majhen titer netreponemskih protiteles, ni več potrebno serološko slediti (5). Pri vseh zdravljenih bolnikih sicer spremljamo gibanje titra protiteles, lahko tudi nekaj let (5).

Lažna serologija

Lažno negativni serološki testi, z izjemo pojava procone ali napake pri testiranju, so izredna redkost. Če bolnik nima znakov sifilisa in se netreponemski in treponemski test razhajata, moramo testiranje ponoviti na novem vzorcu krvi. Biološko lažno pozitivni (BLP) NTT so povezani z bolezenskimi poškodbami tkiva in se pojavljajo v 1–2 % testov. So akutni, če trajajo manj kot šest mesecev in kronični, če trajajo dlje. Akutni BLP testi so možni pri več bakterijskih in virusnih okužbah, kot so malarija, hepatitis, virusna pljučnica, infekcijska mononukleoza, norice, ošpice in druge, po nedavnem miokardnem infarktu in po cepljenju. Kronične BLP NTT pa lahko povežemo z intravenskim jemanjem drog, avtoimunskimi boleznimi, kronični-

mi okužbami, kot je lepra, malignimi boleznimi, kronično jetrno patologijo in starostjo. Občasno BLP TT, to je test FTA-ABS, prej kot testa TPHA ali TPPA povezujemo z avtoimunskimi boleznimi, boleznimi vezivnega tkiva, lajmsko boreliozo in nosečnostjo. Večina BLP testov ima majhen titer protiteles (5, 6, 8, 14).

Diagnoza sifilisa pri bolnikih, okuženih z virusom HIV

Serološki testi so za bolnike s sočasno okužbo z virusom HIV diagnostično zanesljivi tako za verjetno diagnozo sifilisa kot za sledenje odziva na zdravljenje. Morebitno počasnejše zmanjševanje titra netreponemskih protiteles, dokazanega s testoma VDRL ali RPR, ni mogoče pripisati neodzivanju HIV-pozitivnega bolnika na zdravljenje, temveč je počasnejši odziv povezan s sočasno okužbo. Kljub temu, da ni značilne povezave med imunsko supresijo in nevarnejšim potekom sifilisa, se pri HIV-pozitivnih bolnikih svetuje pogostejše serološko testiranje (to je po 1, 3, 6, 9 in 12 mesecih), posebej v primeru majhnega števila celic CD4+, tj. manj kot 350 celic v mm³ in/ali če bolnik ne prejema protiretrovirusne terapije (5). Nekateri viri opisujejo primere bioloških lažno negativnih testov in lažno pozitivnih seroloških testov kot tudi kasnejšo serokonverzijo glede na HIV-negativne bolnike. Opozorimo naj, da zaradi premalo dokazov zaključki niso zanesljivi. Pri obravnavi HIV-pozitivnega bolnika z veliko klinično verjetnostjo sifilisa in zaporedno negativno serologijo lahko pomaga neposredno dokazovanje treponem v bioptih ali v izcedku klinično sumljivih razjed z mikroskopijo s temnim poljem, s histološkimi, imunofluorescenčnimi in molekularnimi

tehnikami, ki v Sloveniji večinoma niso dostopne.

Diagnoza kongenitalnega sifilisa

Kongenitalna okužba se v placenti, obdukcijah vzorcih, izcedkih iz sumljivih razjed ali telesnih tekočinah potrjuje z MTP ali PCR. Diagnoza verjetne kongenitalne okužbe je odvisna od STS. Otrok s pozitivnim TT ob rojstvu in/ali istočasno s pozitivnim NTT v likvorju in/ali z vsaj štirikrat večjim titrom TT (npr. TPHA) v krvi in/ali vsaj štirikrat večjim titrom NTT, kot ju ima mati ob porodu, ima verjetno sifilis. Kongenitalni sifilis je verjeten tudi v primeru, če ima otrok v treh mesecih po rojstvu štiri- ali večkratni porast titra NTT. Diagnostično pomembno je dokazovanje otrokovih treponemskih protiteles IgM, ki ne prehajajo placent, kljub temu, da jih ne moremo določiti v vseh primerih kongenitalnega sifilisa (5, 6, 16). Prav tako je kongenitalni sifilis zelo verjeten, če ima otrok po enem letu in več pozitiven TT. Serološki testi so pri otroku, ki je bil okužen v pozni nosečnosti (pozni kongenitalni sifilis), lahko negativni in jih je treba ponoviti. To se zgodi v primeru, ko je bila nosečnica zdravljena šele v zadnjem trimesečju nosečnosti, in se pri otroku še vedno lahko razvije sifilis. Pri nosečnicah z nezdravljenim zgodnjim sifiliso se okuži 70–100 % plovov, ena tretjina je mrtvorojenih otrok ali splavov. Za preprečevanje kongenitalnega sifilisa vse nosečnice v prvem trimesečju nosečnosti presejalno testiramo na sifilis. V primeru večjega tveganja za okužbo je potrebno serologijo ponoviti. Če je ženska zdravljena med nosečnostjo, jo serološko sledimo še po porodu (5). Na IMI MF UL nosečnice presejalno testiramo na sifilis s TT CIA.

LITERATURA

1. Kotnik V. Treponeme in sifilis. In: Gubina M, Ihan A, eds. Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Ljubljana: Medicinski razgledi; 2002. p. 285–91.
2. Potočnik M. Spolno prenosljive bolezni. In: Kansky A, Miljković J, eds. Kožne in spolne bolezni. Ljubljana: Združenje slovenskih dermatovenerologov; 2009. p. 112–32.
3. Klavs I, Kustec T. Spolno prenesene okužbe v Sloveniji, letno poročilo 2013. Ljubljana: Nacionalni inštitut za javno zdravje, 2004. Dosegljivo na: http://www.ivz.si/hivspo?pi=SHYPERLINK_NK, <http://www.ivz.si/hivspo?pi=565Filename=attName.png&5MediaId=835065AutoResize=false&pl=107-5.3>
4. Schofer H, Brockmeyer NH, Brauninger W, et al. Diagnostik und Therapie der Syphilis. AWMF online, 2008. Dosegljivo na: http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/059-002_S1_Diagnostik_und_Therapie_der_Syphilis_07-2008_06-2012_01.pdf
5. Janier M, Hegyi V, Dupin N, et al. 2014 European Guideline on the Management of Syphilis. Dosegljivo na: <http://www.iusti.org/regions/europe/pdf/2014/2014SyphilisguidelineEuropean.pdf>
6. Ballard R, Ison C, Lewis D, et al. Syphilis. In: Unemo M, ed. Laboratory diagnosis of sexually transmitted infections, including human immunodeficiency virus. World Health Organization; 2013. p. 107–29. Dosegljivo na: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/85343/1/9789241505840_eng.pdf
7. CDC. Case definitions for infectious conditions under public health surveillance. MMWR Recomm Rep. 1997; 46: 1–55. Dosegljivo na: <http://www.cdc.gov/mmwr/PDF/rr/rr4610.pdf>
8. Kingston M, French P, Goh B, et al. UK National Guidelines on the Management of Syphilis 2008. Int J STD AIDS. 2008; 19: 729–40.
9. Muller H, Eisendle K, Brauninger W, et al. Comparative analysis of immunohistochemistry, polymerase chain reaction and focus-floating microscopy for the detection of *Treponema pallidum* in mucocutaneous lesions of primary, secondary and tertiary syphilis. Br J Dermatol. 2011; 165: 50–60.
10. Buffet M, Grange PA, Gerhardt P, et al. Diagnosing *Treponema pallidum* in Secondary Syphilis by PCR and Immunohistochemistry. J Invest Dermatol. 2007; 127: 2345–50.
11. Gayet-Ageron A, Lautenschlager S, Ninet B, et al. Sensitivity, specificity and likelihood ratios of PCR in the diagnosis of syphilis: a systematic review and meta-analysis. Sex Transm Infect. 2013; 89: 251–6.
12. Orle KA, Gates CA, Martin DH, et al. Simultaneous PCR Detection of *Haemophilus ducreyi*, *Treponema pallidum*, and Herpes Simplex Virus Types 1 and 2 from Genital Ulcers. J Clin Microbiol. 1996; 34: 49–54.
13. Peng RR, Wang AL, Li J, et al. Molecular Typing of *Treponema pallidum*: A Systematic Review and Meta-Analysis. PloS Negl Trop Dis. 2011; 5: e1273.
14. Larsen SA, Johnson RE. Diagnostic Tests. In: Larsen SA, Pope V, Johnson RE, Kennedy EJ, Jr., eds. A manual of tests for syphilis. 9th ed. Washington: American public health association; 1998. p. 1–52.
15. Binnicker MJ. Which algorithm should be used to screen for syphilis? Curr Opin Infect Dis 2012; 25: 79–85.
16. Bromberg K, Rawstron S, Tannis G. Diagnosis of congenital syphilis by combining *Treponema pallidum*-specific IgM detection with immunofluorescent antigen detection for *T. pallidum*. J Infect Dis. 1993; 168: 238–42.

Helena Biasizzo¹, Saša Simčič², Andreja Saje³, Marko Potočnik⁴, Janez Tomažič⁵

Mikrobiološka diagnostika nevrosifilisa v Sloveniji

Microbiological Diagnostics of Neurosyphilis in Slovenia

POVZETEK

KLJUČNE BESEDE: nevrosifilis, HIV, laboratorijski testi

Okužbo osrednjega živčevja s *Treponema pallidum* imenujemo nevrosifilis. Delimo ga na zgodnji in pozni nevrosifilis; slednjega dandanes vidimo redko, ker imamo na voljo učinkovito zdravljenje s penicilinom. Za uspešno zdravljenje nevrosifilisa je ključna pravočasna diagnostika, ki pa se razlikuje od diagnostike pri ostalih oblikah sifilisa. Z ustreznim pristopom preprečimo hude in včasih trajne posledice nevrosifilisa.

ABSTRACT

KEY WORDS: neurosyphilis, HIV, laboratory tests

Neurosyphilis is an infection of the central nervous system with *Treponema pallidum*. We divide it into early and late neurosyphilis; the latter being very rare due to effective treatment with penicillin. Timely diagnosis of neurosyphilis is essential for successful treatment, and it differs from diagnosis of syphilis in other forms of disease. This prevents severe and sometimes permanent consequences of neurosyphilis.

¹ Helena Biasizzo, dr. med., Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Japljeva ulica 2, 1000 Ljubljana

² Asist. znan. sod., strok. svet. dr. Saša Simčič, univ. dipl. kem., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

³ Andreja Saje, dr. med., Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Japljeva ulica 2, 1000 Ljubljana

⁴ Prim. doc. dr. Marko Potočnik, dr. med., dr. dent. med., Dermatovenerološka klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana

⁵ Izr. prof. dr. Janez Tomažič, dr. med., Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Japljeva ulica 2, 1000 Ljubljana; janez.tomazic@kclj.si

UVOD

Okužbo osrednjega živčevja (OŽ) s *Treponema pallidum* imenujemo nevrosifilis. Delimo ga na zgodnji (brezsimplomni, sifilitični meningitis, meningovaskularni) in pozni (*tabes dorsalis*, napredujoča paraliza) nevrosifilis (1). Nevrosifilis je lahko ena izmed oblik terciarnega sifilisa (pozni nevrosifilis), katerega dandanes zaradi učinkovitega zdravljenja s penicilinom redko vidimo.

Klinična slika nevrosifilisa je pestra in lahko – kot v ostalih stadijih sifilisa – zabriše pravi vzrok bolezni. Za sifilitični meningitis je značilen akutni ali subakutni glavobol, ki ga lahko spremljata slabost, bruhanje, vročina, izraženi meningealni znaki ter prizadetost možganskih živcev; najpogosteje je prizadet vidni živec (1, 2). Pri meningovaskularnem sifilisu so zaradi fokalne ali difuzne prizadetosti možganskih žil pogosti infarkti, kar se v klinični sliki odraža kot izguba zavesti, motorični in/ali senzorični izpadi ter epileptični napadi. Pri brezsimplomnem nevrosifilisu je bolnik brez simptomov in znakov nevrološke bolezni ali očesne prizadetosti, ob potrjeni okužbi OŽ z bakterijo *T. pallidum* (1).

Tabes dorsalis prizadene zadnje stebre hrbtenjače, zato se zmanjša občutek za položaj sklepov, vibracije in fini dotik, lahko tudi za bolečino in temperaturo. Značilne so spontane pekoče bolečine ter občutek elektrike vzdolž hrbtenice. Za napredujočo parezo pa je značilna atrofija možganov, ki se kaže kot demenca s psihotičnimi simptomi in znaki, motnjami govora ter krvavitvami v notranje organe (3).

Pri bolnikih, okuženih s HIV, je OŽ lahko prizadeto v katerikoli fazi sifilisa (zgodnji ali pozni), nevrosifilis se pojavlja pogosteje in hitreje kot v populaciji brez HIV okužbe (4). Ghanem s sodelavci je v raziskavi, v kateri je na kliniki Johns Hopkins sledil vse HIV pozitivne bolnike med leti 1990 in 2006, ugotovil, da je po-

javnost zgodnjega nevrosifilisa v kohorti HIV okuženih bolnikov 17,7 % (5). Pogosteje so prizadeti tudi različni kranialni živci, najpogosteje vidni živec, kar lahko vodi do slepote (2). Pri bolnikih, okuženih s HIV, je zdravljenje nevrosifilisa večkrat neuspešno (*non satis curare*), prihaja pa tudi do spontanih reaktivacij bolezni – brez ponovnega stika s *T. pallidum* (2). Pravilna in pravočasna diagnoza nevrosifilisa je pomembna, saj se s tem izognemo hudim in trajnim posledicam, ki jih bolezen lahko povzroči. Vpliva tudi na zdravljenje okužbe, ki je v tem primeru parentalno.

V prispevku prikazujemo primere naših bolnikov z nevrosifilisom in verjetnim nevrosifilisom, ko so bili sočasno okuženi s HIV, in laboratorijsko/mikrobiološko diagnostiko nevrosifilisa.

MIKROBIOLOŠKA DIAGNOSTIKA NEVROSIFILISA

Za diagnozo nevrosifilisa potrebujemo vzorec likvorja, ki ga odvajamo z lumbalno punkcijo. Pri osebi z dokazanim sifilisom se za preiskavo likvorja odločimo v primeru prisotne nevrološke simptomatike ali motenj vida/sluha (ne glede na stadij sifilisa) ter pri bolnikih s terciarnim sifilisom, ki imajo srčno-žilne zaplete ali sifilitične gume. Pri bolnikih z zgodnjim sifilisom (primarni, sekundarni, latentni sifilis) lumbalne punkcije rutinsko ne izvajamo, razen v primeru nevrološke simptomatike ali pri neustreznem odzivu na zdravljenje.

V likvorju nas zanimajo koncentracije proteinov, glukoze, levkocitov ter treponemska in netreponemska protitelesa. V primeru biokemičnih odstopanj v likvorju se preiskava likvorja ponovno izvede po 6 tednih do 6 mesecih po zdravljenju (6).

Na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani za diagnostiko nevrosifilisa v likvorju izvajamo netreponemski test RPR (angl. *Rapid Plasma Reagin*) ter treponem-

ske teste: FTA-ABS (angl. *Fluorescent Treponemal Antibody Absorption test*), TPHA (angl. *T. pallidum Haemagglutination test*) in LIA (angl. *Line Immuno Assay*, IgG Immunoblot test).

Test VDRL (angl. *Venereal Disease Research Laboratory*) ima zaradi nekoliko večje občutljivosti in specifičnosti prednost pred testom RPR. Reaktivna netreponemska testa v likvorju (v katerem ne sme biti krvi) sta diagnostična za nevrosifilis v poznem stadiju bolezni, medtem ko je njihov pomen v zgodnjem sifilisu še nepojasnen. Zaradi slabe občutljivosti netreponemskih testov (samo pri približno tretjini bolnikov z nevrosifilisom so pozitivni), negativni izvid ne izključuje nevrosifilisa.

Treponemski test FTA-ABS, ki ga tudi naredimo v likvorju, ima dobro občutljivost, vendar slabšo specifičnost (slabšo od VDRL ali RPR) zaradi možnega pasivnega prehoda specifičnih protiteles IgG preko krvno-možganske pregrade. Pozitivni FTA-ABS v likvorju ni potrditveni test za nevrosifilis; ob negativnem likvorskem VDRL ali RPR testu je diagnoza nevrosifilisa malo verjetna, ob dodatni odsotnosti biokemičnih/citoloških sprememb v likvorju in odsotnosti bolnikovih nevroloških simptomov in znakov pa je izključena (6-8). Negativen VDRL ali RPR test v likvorju diagnoze nevrosifilisa ne izključuje (9). Diagnostiko nevrosifilisa prikazujemo na sliki 1. Nekateri raziskovalci so poskušali z oceno intratekalne tvorbe protiteles izboljšati diagnostiko nevrosifilisa, vendar tovrstni pristopi nimajo praktične vrednosti (10, 11).

Molekularna diagnostika sifilisa z verižno reakcijo s polimerazo (angl. *Polymerase Chain Reaction*, PCR) še nima mesta v diagnostiki nevrosifilisa. Dandanes še niti mednarodno priznanega protokola niti komercialnega testa PCR. Večina specifič-

nih protokolov PCR dokazuje DNA gene za površinske lipoproteine, kot so geni *bmp*, *tpp47* in *tmpA*, ali gene, kot je *polA*, ki so vpleteni v podvojevanje genoma.

PCR je diagnostično uporaben v zgodnji fazi bolezni za izcedke iz razjed, ko so serološki testi še negativni. Potencialno prinaša korist v diagnostiki kongenitalnega sifilisa, nevrosifilisa in terciarnega sifilisa, ko v bolnikovih kužninah pričakujemo malo treponem in treponemske DNA. Metoda PCR za diagnostiko nevrosifilisa ni standardizirana, kaže, da ima tudi slabo občutljivost/specifičnost, in se za tovrstne namene (še) ne uporablja (6, 7, 12).

Pri bolnikih, okuženih s HIV, se za preiskavo likvorja odločimo pri enakih okoliščinah kot pri HIV-neokuženih osebah – v primeru nevrološke simptomatike, ki vključuje tudi motnje vida ali sluha (5). V primeru poznega sifilisa nekateri pri bolnikih, okuženih s HIV, vseeno svetujejo pregled likvorja za izključitev asimptomatskega nevrosifilisa. Lumbalna punkcija naj bi bila upravičena pri HIV-pozitivnih bolnikih s poznim sifilisom in s koncentracijo celic CD4+, manjšo kot 350/mm³ in/ali pri titru VDRL/RPR v serumu, ki je večji od 1 : 32 (6, 13).

NEVROSIFILIS V SLOVENIJI

Z uspešno mikrobiološko diagnostiko in učinkovitim zdravljenjem se pozni nevrosifilis v stadiju terciarne oblike bolezni pri nas pojavlja zelo redko. Opažamo pa primere zgodnjega nevrosifilisa (v sklopu latentne, sekundarne in celo primarne bolezni) predvsem pri bolnikih, ki so okuženi s HIV. V tabeli 1 prikazujemo naše bolnike z nevrosifilisom in verjetnim nevrosifilisom, ki so sočasno okuženi s HIV, v obdobju od leta 1995 do danes. Vsi bolniki so imeli pozitivne teste na sifilis v serumu. Dva tovrstna bolnika prikazujemo bolj natančno.

Tabela 1. Slovenski bolniki z nevrosifilisom in verjetnim nevrosifilisom, ki so sočasno okuženi s HIV, v obdobju od leta 1995 do danes. Vsi bolniki so imeli pozitivne teste na sifilis v serumu. B – bolnik, VDRL – angl. *Venereal Disease Research Laboratory*, TPHA – angl. *Treponema pallidum haemagglutination assay*, OŽ – osrednje živčevje, neg – negativno, poz – pozitivno, NO – ni opravljeno, LIA – angl. *Line Immuno Assay*, IgG Immunoblot test.

Bolnik, letnik rojstva	Klinična slika	Diagnoza	Likvor: levkociti	Likvor: proteini	Likvor: VDRL/TPHA/IgM/IgG
B1, letnik 1946	Bolečine v obeh golenih, pekoči prsti, glavobol	Sifilitični meningitis ob sekundarnem sifilisu?	9	0,79	neg/1:80/ neg/1:80
B2, letnik 1971	Makulopapulozni izpuščaj po celem telesu, okvara facialisa po centralnem tipu	Sifilitični meningitis ob sekundarnem sifilisu?	10	0,6	neg/neg/NO/NO
B3, letnik 1959	Brez težav, <i>st. post ulcus durum</i>	Asimptomatski nevrosifilis?	28	0,56	neg/neg/NO/1:20
B4, letnik 1969	Optični nevritis desno, meglen vid, črna lisa	Nevrosifilis s prizadetostjo vidnega živca	10	0,34	neg/1:80/ neg/1:80
B5, letnik 1969	Retrobulbarni nevritis desno - pešanje vida	Nevrosifilis s prizadetostjo vidnega živca	2	0,45	neg/1:40/ NO/1:160
B6, letnik 1978	Povešen desni ustni kot, zmanjšana moč in senzibiliteta, senzibiliteta desno	Meningovaskularni sifilis	162	1,22	1:8/1:2560/ NO/1:320
B7, letnik 1962	Levostranska hemipareza, ataksija, glavobol, vročina, oslabelost, kaheksija,	Meningovaskularni sifilis	75	1,9	poz/1:1280/1:128/ 1:2560
B8, letnik 1974	Ataksija, tinitus, parestezije levo, okvara facialisa po centralnem tipu desno	Meningovaskularni sifilis	30	0,70	neg/neg/1:20/neg LIA poz

KLINIČNA PRIMERA

Bolnik R. R., rojen 1978

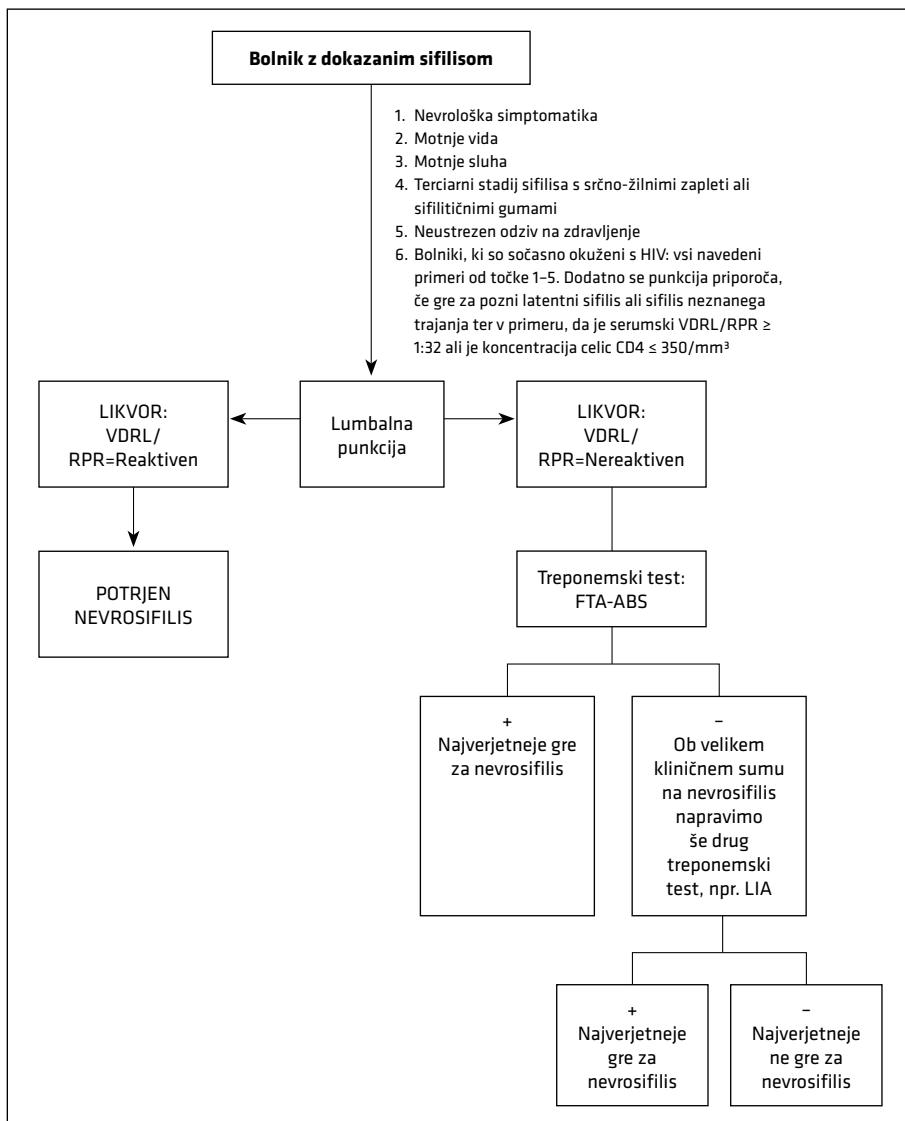
Dvaintridesetletni bolnik je bil sprejet na Oddelek za nevrologijo Splošne bolnišnice Izola zaradi tri dni trajajočega slabega počutja, nemoči v desnih okončinah in mravljinčenja po desni strani telesa. Vročine, mrzlice, glavobola, slabosti ali bruhanja ni navajal. Pred tem je bil zdrav. Vrsto let je delal kot natakar na ladji, je istospolno usmerjen.

Ob sprejemu je bil neprizadet, kardiopulmonarno kompenziran, afebrilen in vsestransko orientiran. Opažali so hipestezije po desni polovici obraza in povešen desni ustni kot. Obe desni okončini sta bili paretični in spastični, z živahnimi proprioceptivnimi refleksi. Spastična z ži-

vahnimi kitnimi refleksi je bila tudi leva spodnja okončina. Hoje ni bil sposoben.

V laboratorijskih izvidih ni bilo odstopanj od normale. Opravljena je bila magnetna resonanca (MR) glave. Na posnetku so opažali točkaste spremembe v desni polovici ponsa, v levem cerebelarnem pedunkulu in v levem posteriornem talamu. Sprememb niso mogli etiološko opredeliti, lahko bi šlo za demielinizacijsko bolezen OŽ. Bolniku so predpisali terapijo z metilprednizolonom i.v., tri zaporedne dni. Ob tem je prišlo do pomembnega izboljšanja nevrološke simptomatike, vendar ta ni v celoti izzvenela.

Zaradi načina življenja je bil postavljen sum na okužbo s HIV, ki je bil potrjen s presejalnim in potrditvenim testom. Bolnik je



Slika 1. Diagnostični postopek pri bolniku s sumom na nevrosifilis.

bil nato premeščen na Kliniko za infektivne bolezni in vročinska stanja Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani (UKCL) za nadaljnjo diagnostiko in zdravljenje.

Opravili smo lumbalno punkcijo; izvidi so ustrezali laboratorijskim kriterijem za serozni meningitis (levkociti 162/mm³, nevtrofilni granulociti 27/mm³, limfociti 155/mm³, proteini 1,22 g/L, glukoza 2,3

mmol/L ob serumski glukozi 4,9 mmol/L). Bolnik je tekom hospitalizacije začel prejemati protiretrovirusna zdravila (Combivir® in Kaletra®). V sklopu preiskav, ki jih opravimo pri vsakem bolniku, okuženim s HIV, so bile opravljene tudi serološke preiskave na sifilis, ki so bile pozitivne: RPR 1:512, TPHA 1:81920, IgG FTA-ABS 1:10240. Postavili smo sum na nevrosifi-

lis, ki je bil potrjen s testi na netreponem-ska in treponemska protitelesa v likvorju: RPR 1:8, TPHA 1:2560, IgG FTA-ABS 1:320. Glede na klinično sliko, slikovno diagnostiko in serološke preiskave je šlo pri bolniku za meningovaskularno obliko nevrosifilisa ob okužbi s HIV. Uvedeno je bilo 3-tedensko zdravljenje s kristalnim penicilinom. Ob odpustu je nevrološka simptomatika skoraj popolnoma izzvenela, vztrajala je le rahla spastična pareza desnih okončin.

Bolnik J. H., rojen 1974

Štiridesetletni bolnik je bil sprejet na Nevrološko kliniko UKCL zaradi nenadno nastale nestabilnosti pri hoji, tinitusa v levem ušesu in parestezij po levi strani obraza in telesa. Podobne težave je imel že nekaj dni pred sprejemom, vendar so takrat spontano izzvenele. Zanimal je glavobol, bruhanje in povišano telesno temperaturo. Pred tem je bil zdrav. Kadi 20 let po en zavojček cigaret dnevno.

Ob sprejemu je bil orientiran, afebrilen, evfazičen, kardiorespiratorno kompenziran. Ugotavljali so normalno odzivne zenice, primerno bulbomotoriko s horizontalno-rotatornim nistagmusom v desno, blago prizadetost obraznega živca desno po centralnem tipu, levostransko ataksijo in ataktično hojo.

Opravljenе so bile laboratorijske preiskave, ki so bile v mejah normale z izjemo povišanega holesterola. CT glave, perfuzijski CT in CT angiografija niso pokazali odstopanj od normale.

Drugi dan hospitalizacije se je nevrološka simptomatika poslabšala: ataksija in prizadetost obraznega živca po centralnem tipu sta bili izrazitejši, pojavil se je dvojni vid z desnostransko prizadetostjo *n. abducens*. Urgentna MR glave je pokazala infarkt posteriornega dela ponsa desno, velikega 9 x 4 mm, ob čemer so bile uvedene antiagregacijska, antihiperlipemična in antikoagulacijska terapija.

Za razjasnitev etiologije možganske kapi so opravili teste za trombofilijo, revmatološka obolenja, določili so nivoje homocisteina, B12, folne kisline in TSH; vse v mejah normale. Opravili so tudi presejalne teste na infekcijske povzročitelje možganske kapi: pozitivna sta bila testa na okužbo s HIV in serologija na sifilis (RPR in EIA). V likvorju so bili prisotni povečani proteini (0,70 g/L) in limfocitna pleocitoza (levkociti 30/mm³, limfociti 30/mm³). Bolnik je bil nato premeščen na Kliniko za infekcijske bolezni in vročinska stanja UKCL za nadaljnjo diagnostiko in zdravljenje.

Zaradi suma na nevrosifilis smo določili RPR in TPHA v likvorju, ki pa sta bila negativna, zato smo se odločili za razširjeno diagnostiko in v likvorju dodatno opravili teste IgG FTA-ABS, IgM FTA-ABS ter LIA. Testa IgG FTA-ABS in LIA sta bila pozitivna.

Glede na klinično sliko je šlo tudi pri drugem bolniku za meningovaskularno obliko nevrosifilisa ob okužbi s HIV. Uvedeno je bilo 3-tedensko zdravljenje s kristalnim penicilinom ter protiretrovirusno zdravljenje (Kivexa®, Prezista®, Norvir®).

Klinično stanje se je postopoma izboljševalo. Ob odpustu je imel bolnik še blag dvojni vid in parestezije po levi polovici telesa; težave so vztrajale tudi ob kontroli en mesec po odpustu (kontrolni izvidi RPR 1:64, TPHA 1:2560). Nadaljnja rehabilitacija je sledila na Univerzitetnem Rehabilitacijskem Inštitutu RS – Soča.

RAZPRAVA

Serološka diagnoza nevrosifilisa pri osebah, ki so sočasno okužene s HIV, je težja. Čeprav velja, da so obstoječi serološki testi enako zanesljivi za diagnozo nevrosifilisa pri HIV negativnih in HIV pozitivnih bolnikih, je pri slednjih večja možnost lažnih rezultatov; možni so tako lažno pozitivni kot lažno negativni izvidi, še posebno v poznem stadiju bolezni (14).

V Sloveniji je bil nevrosifilis pri bolnikih s sočasno okužbo s HIV in *T. pallidum* prvič ugotovljen leta 1995. Do danes smo obravnavali osem bolnikov z nevrosifilisom/verjetnim nevrosifilisom in HIV okužbo; vsi so bili moški, ki imajo spolne odnose z moškimi. Klinična slika je obsegala celoten spekter zgodnjega nevrosifilisa: asimptomatski nevrosifilis, sifilitični meningitis, meningovaskularni sifilis ter nevrosifilis s prizadetostjo vidnega živca. Oblik poznega nevrosifilisa, verjetno zaradi učinkovite diagnostike in uspešnega zdravljenja, v Sloveniji (tako kot drugod v razvitem svetu) skoraj ne vidimo več.

Pri prvem kliničnem primeru, ki smo ga predstavili, je bila postavitev diagnoze nevrosifilisa zanesljiva; v likvorju je bil pozitiven RPR, ki potrjuje diagnozo nevrosifilisa. Pri drugem kliničnem primeru smo uporabili še dodatne teste, saj sta bila v likvorju negativna testa RPR in TPHA. V likvorju sta bila pozitivna dva treponemska testa: IgG-FTA-ABS in LIA (test, s katerim ugotavljamo za sifilis specifična protitelesa IgG proti nekaterim rekombinantnim antigenom – TpN47, TpN17 in

TpN15, in sintetičnemu antigenu TmpA). Glede na klinično sliko, slikovne preiskave in učinkovito zdravljenje s penicilinom menimo, da je pri bolniku šlo za nevrosifilis, ki ga nismo uspeli potrditi s testom RPR, pozitivna pa sta bila dva treponemska testa. Zavedati se moramo, da negativni netreponemski in treponemski testi v likvorju oseb, okuženih s HIV, pri katerih je močan klinični sum za nevrosifilis, bolezni ne izključujejo. Vsakega bolnika, okuženega s HIV, pri katerem so pozitivni serološki testi na sifilis (serum) in ima biokemične/citološke spremembe v likvorju, moramo zdraviti za nevrosifilis (kristalni penicilin), tudi če so mikrobiološki testi v likvorju negativni.

ZAKLJUČEK

V zadnjem obdobju, posebno med populacijo HIV-pozitivnih bolnikov, narašča pojavljanje sifilisa in zato lahko pričakujemo, da bo naraščala tudi incidenca nevrosifilisa. Za pravočasno in uspešno zdravljenje tovrstnih bolnikov je pomembno sodelovanje infektologov in mikrobiologov, še bolj pomembna pa je ustrezna preventiva, da do tovrstnih bolezni ne bi prišlo.

LITERATURA

1. Gitaí LL, Jaláli PS, Takayanagui OM. Neurosyphilis in the age of AIDS: clinical and laboratory features. *Neurol Sci* 2009; 30: 465–70.
2. Kassutto S, Doweiko JP. Syphilis in the HIV era. *Emerg Infect Dis* 2004; 10: 1471–3.
3. Gjestland T. The Oslo study of untreated syphilis; an epidemiologic investigation of the natural course of the syphilitic infection based upon a re-study of the Boeck-Bruusgaard material. *Acta Derm Venereol* 1955; 35 Suppl 34: 3–368.
4. Johns DR, Tierney M, Felsenstein D. Alteration in the natural history of neurosyphilis by concurrent infection with the human immunodeficiency virus. *N Engl J Med* 1987; 316: 1569–72
5. Ghanem KG, Moore RD, Rompalo AM, et al. Neurosyphilis in a clinical cohort of HIV-1-infected patients. *AIDS* 2008; 22: 1145–51.
6. Janier M, Hegyi V, Dupin N, et al. European Guideline on the Management of Syphilis 2014. Dosegljivo na: <http://www.iusti.org/regions/europe/pdf/2014/2014SyphilisguidelineEuropean.pdf>
7. Ballard R, Ison C, Lewis D, et al. In: Unemo M, ed. Laboratory diagnosis of sexually transmitted infections, including human immunodeficiency virus. World Health Organization 2013. p. 107–29. Dosegljivo na: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/85343/1/9789241505840_eng.pdf
8. Kingston M, French P, Goh B, et al. UK National Guidelines on the Management of Syphilis 2008. *Int J STD AIDS* 2008; 19: 729–40.
9. Harding AS, Ghanem KG. The performance of cerebrospinal fluid treponemal-specific antibody tests in neurosyphilis: a systematic review. *Sex Transm Dis* 2012; 39: 291–7.
10. Kotnik V, Jordan K, Stopinšek S, et al. Intrathecal antitreponemal antibody synthesis determination using the INNO-LIA Syphilis Score. *Acta Dermatovenerol APA* 2007; 16: 135–41.
11. Levchik N, Ponomareva M, Surganova V, et al. Criteria for the diagnosis of neurosyphilis in cerebrospinal fluid: relationships with intrathecal immunoglobulin synthesis and blood –cerebrospinal fluid barrier dysfunction. *Sex Transm Dis* 2013; 40: 917–22.
12. Gayet-Ageron A, Lautenschlager S, Ninet B, et al. Sensitivity, specificity and likelihood ratios of PCR in the diagnosis of syphilis: a systematic review and meta-analysis. *Sex Transm Infect* 2013; 89: 251–6.
13. Libois A, De Wit S, Poll B, et al. HIV and syphilis: when to perform a lumbar puncture. *Sex Transm Dis* 2007; 34: 141–4.
14. Rompalo AM, Cannon RO, Quinn TC, et al. Association of biologic false-positive reactions for syphilis with human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis* 1992; 165: 1124–6.

Mateja Škamperle¹, Katja Seme², Kristina Fujs Komloš³, Janez Tomažič⁴, Mojca Matičič⁵, Maja M. Lunar⁶, Mario Poljak⁷

Okužbe z virusi hepatitisa pri slovenskih s HIV okuženih bolnikih

Hepatitis Virus Infections Among Patients with HIV Infection in Slovenia

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: HIV, virus hepatitisa B, virus hepatitisa C, sočasna okužba, prevalenca

IZHODIŠČA. Okužba z virusoma hepatitisa B (HBV) in hepatitisa C (HCV) je z uspešnostjo visoko aktivnega protiretrovirusnega zdravljenja postala najpogostejši vzrok obolenosti in smrtnosti pri s HIV okuženih bolnikih. V Sloveniji je prevalenca okužbe s HBV in HCV pri s HIV okuženih bolnikih nizka (nacionalni raziskavi 2002 in 2009). **METODE.** Retrospektivno smo pregledali podatke 639 s HIV okuženih oseb, pri katerih je bila okužba s HIV ugotovljena v obdobju 1986–2013. **REZULTATI.** Na prisotnost okužbe s HBV je bilo testiranih 543 (84,9 %) s HIV okuženih oseb. Aktivna okužba s HBV (prisotna HBsAg in protitelesa anti-HBc) je bila ugotovljena pri 3,5 % (19/543) testiranih osebah, medtem ko smo pri 20,8 % (113/543) testiranih dokazali v preteklosti prebolelo okužbo s HBV (prisotna samo protitelesa anti-HBc). Na okužbo s HCV je bilo testiranih 579 (90,6 %) oseb. Protitelesa proti virusu hepatitisa C so bila prisotna pri 7,6 % (44/579) testiranih, pri 75,0 % (33/44) seropozitivnih oseb smo dokazali HCV RNA. Okužba s HCV je bila pogostejša pri tistih, ki so se s HIV okužili parenteralno (91,8 %), kot pri tistih, kjer je šlo za spolni prenos HIV (2,8 %). Sočasno aktivno okužbo s HBV in HCV smo ugotovili le pri dveh s HIV okuženih posameznikih. **ZAKLJUČKI.** Slovenija ostaja še vedno država z nizko prevalenco okužbe s HBV in HCV pri s HIV okuženih osebah. Kljub temu je potrebno redno spremljanje omenjene populacije, še posebej zaradi porasta novih primerov okužbe s HIV in vse bolj tvegane spolnega vedenja pri moških, ki imajo spolne odnose z moškimi.

¹ Mateja Škamperle, dr. med., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

² Prof. dr. Katja Seme, dr. med., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

³ Asist. dr. Kristina Fujs Komloš, univ. dipl. mikr., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

⁴ Izr. prof. dr. Janez Tomažič, dr. med., Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Japljeva ulica 2, 1000 Ljubljana

⁵ Izr. prof. dr. Mojca Matičič, dr. med., Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Japljeva ulica 2, 1000 Ljubljana

⁶ Maja M. Lunar, univ. dipl. mikr., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

⁷ Prof. dr. Mario Poljak, dr. med., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana; mario.poljak@mf.uni-lj.si

ABSTRACT

KEY WORDS: HIV, hepatitis B virus, hepatitis C virus, co-infection, prevalence

BACKGROUND. Due to successful highly active antiretroviral therapy, infections with hepatitis B and C viruses (HBV and HCV) have become one of the leading causes of morbidity and mortality in patients with HIV infection. The prevalence of HBV and HCV infection among patients with HIV infection in Slovenia is low (nationwide studies 2002 and 2009). **METHODS.** In the study we retrospectively analyzed data of 639 patients who were diagnosed with HIV infection in Slovenia in the period 1986–2013. **RESULTS.** 543 (84.9 %) patients were tested for the presence of HBV infection. Current HBV infection (presence of HBsAg and anti-HBc antibodies) was confirmed in 3.5 % (19/543) patients, 20.8 % (113/543) patients had markers of the prior HBV infection (only presence of anti-HBc antibodies). 579 (90.6 %) patients were tested for the presence of HCV infection. Anti-HCV antibodies were present in 7.6 % (44/579) patients; 75 % (33/44) of seropositive patients also had HCV RNA. Anti-HCV positivity was significantly higher in those that acquired HIV by the parenteral route (91.8 %) than in those that acquired HIV by the sexual route (2.8 %). Presence of active HBV and HCV co-infection was detected in two HIV infected individuals. **CONCLUSIONS.** Slovenia remains a country with low prevalence of HBV and HCV infection among patients with HIV infection. Nevertheless, regular monitoring of that population should be held, especially when considering the increase of HIV infection and alarmingly risky sexual behaviour among men who have sex with men.

UVOD

Število novo odkritih primerov okužbe z virusom imunske pomanjkljivosti (HIV) v Sloveniji vztrajno narašča, zlasti v skupini moških, ki imajo spolne odnose z moškimi (MSM) (1, 2). Smrtnost zaradi aidsa se je z začetkom uspešne uporabe visoko aktivnega protiretrovirusnega zdravljenja (angl. *highly active antiretroviral therapy*, HAART) pomembno zmanjšala. Okužba s HIV je z ustrezno pozornostjo in hitro diagnostiko primerno obvladljiva, kar omogoča bolnikom zadovoljivo in kvalitetno življenje (3). Pri s HIV okuženih zdravljenih osebah tako v ospredje prihajajo druge bolezni, med katerimi so na prvem mestu bolezni jeter, v največjem deležu povzročene z virusoma hepatitisa B (HBV) in hepatitisa C (HCV) (4). Sočasna okužba s HIV in HBV oziroma HCV je eden vodilnih vzrokov večje obolevnosti in smrtnosti zaradi jetrnih bolezni pri s HIV okuženih

bolnikih (5). Zaradi podobnega načina prenosa HIV, HBV in HCV (parenteralni prenos, spolni stiki, vertikalni prenos z okužene matere na otroka), so s HIV okuženi bolniki populacija z visokim tveganjem za sočasno okužbo s HBV oziroma HCV (6).

Glede na trend naraščanja števila s HIV okuženih oseb v Sloveniji smo retrospektivno preverili, koliko bolnikov je bilo testiranih na okužbo s HBV in HCV, ter določili prevalenco sočasne okužbe s HBV oziroma HCV.

METODE

Od leta 1986 do vključno decembra 2013 je bilo v Sloveniji odkritih 639 oseb, okuženih s HIV, od tega 553 moških (86,5 %) in 86 žensk (13,5 %). Povprečna starost s HIV okuženih oseb ob postavljeni diagnozi je bila 37,3 leta (v razponu 0–81 let). Način prenosa okužbe s HIV je bil znan pri 547 osebah (85,6 %) (tabela 1). Med

njimi je bilo 91,2 % (583/639) testiranih na okužbo s HBV in/ali okužbo s HCV, od teh 92,6 % (540/583) tako na okužbo s HBV kot tudi na okužbo s HCV.

Za dokaz okužbe s HBV so bili bolniki testirani na prisotnost beljakovine zunanje ovojnice HBV (HBsAg) s testom Architect HBsAg Assay (Abbott, Chicago, ZDA) in na prisotnost protiteles proti beljakovini nukleokapside HBV (anti-HBc) z uporabo testa Ortho Anti-HBc Assay (Ortho Diagnostic Systems, Neckargemünd, Nemčija). Prisotnost protiteles proti HCV (anti-HCV) je bila določena s testom Ortho HCV Assay (Ortho Diagnostic Systems). Specifičnost anti-HCV reaktivnih vzorcev smo potrdili z imunoblot testom Inno-Lia HCV Ab III Update Assay (Innogenetics, Zwijndrecht, Belgija). Prisotnost HCV RNA smo dokazali z več generacijami komercialnih testov za dokazovanje HCV RNA.

REZULTATI

Sočasna okužba s HIV in z virusom hepatitisa B

Na prisotnost okužbe s HBV je bilo testiranih 84,9 % (543/639) s HIV okuženih oseb. Od tega je bilo 12,5 % žensk (68/543) in 87,5 % moških (475/543), od katerih je bilo 73,9 % MSM (351/475). Sočasna okužba s HIV in HBV je bila ugotovljena pri 24,3 % bolnikov (132/543). Med

132 bolniki smo aktivno okužbo s HBV zaznali pri 19 (14,4 %) (pozitivna HBsAg in protitelesa anti-HBc), pri 113 (85,6 %) je bila ugotovljena v preteklosti prebolela okužba s HBV (pozitivna samo protitelesa anti-HBc). 71,1 % (386/543) testiranih oseb je imelo negativna oba testirana serološka označevalca hepatitisa B (HBsAg in protitelesa anti-HBc). Pri 17 osebah so bila testirana samo protitelesa anti-HBc (pri vseh je bil rezultat negativen) in pri 8 osebah samo HBsAg (pri vseh je bil rezultat negativen).

Protitelesa anti-HBc smo pogosteje dokazali pri tistih osebah, kjer je bil prenos okužbe s HIV parenteralen (51,4 %) kot pri tistih, ki so se s HIV predvidoma okužili s spolnimi stiki (22,5 %).

Sočasna okužba s HIV in z virusom hepatitisa C

Podatki o deležu okužbe s HCV pri s HIV okuženih osebah v Sloveniji v istem obdobju so bili nedavno predstavljeni v retrospektivni raziskavi (8). Na sočasno okužbo s HCV je bilo testiranih 90,6 % (579/639) oseb. Od tega je bilo 12,8 % žensk in 87,2 % moških. Delež MSM med njimi je bil 62,9 %.

Protitelesa anti-HCV so bila prisotna pri 44/579 (7,6 %) testiranih s HIV okuženih osebah. HCV RNA je bila dokazana pri 75,0 % (33/44) seropozitivnih oseb. Pri

Tabela 1. Načini prenosa HIV pri s HIV okuženih osebah v Sloveniji med letoma 1986 in 2013.

Način prenosa	Število bolnikov, okuženih s HIV
Homo-/biseksualni stik	377
Heteroseksualni stik	129,5 ^a
Krvni pripravki (hemofilija)	17
Intravensko uživanje prepovedanih drog (IVDU)	13,5 ^a
Vertikalni prenos preko okužene matere	9
Človeški ugriz (7)	1
Neznan prenos	92

^a Način prenosa HIV pri enem izmed okuženih bolnikov: heteroseksualni stik/IVDU.

nobenem od 535 anti-HCV seronegativnih bolnikov nismo dokazali HCV RNA. Med s HIV okuženimi osebami prevladuje sočasna okužba z genotipom 1 (68,0 %), sledijo genotip 3 (20,0 %), genotip 4 (8,0 %) in genotip 2 (4,0 %).

Glede na zbrane podatke o načinu prenosa okužbe s HIV je bila okužba s HCV pomembno pogostejša pri tistih osebah, ki so se s HIV okužile parenteralno (91,8 %) kot pri tistih, kjer je šlo za spolni prenos HIV (2,8 %).

RAZPRAVA

V svetu je delež kronične okužbe s HBV pri s HIV okuženih osebah ocenjen na približno 10 %, vendar je delež s HIV okuženih, ki so bili v življenju kadarkoli okuženi s HBV (v preteklosti prebolela okužba), veliko višji (90 %) (9, 10). S HCV je v Evropi in ZDA okužena približno tretjina s HIV okuženih bolnikov (11). Delež okužbe s HCV pri s HIV okuženih bolnikih je odvisen predvsem od načina prenosa HIV in pri intravenskih uživalcih prepovedanih drog (angl. *intravenous drug users*, IVDU) ponekod tudi presega 90 % (9, 12).

V Sloveniji se v klinični praksi izvaja redno testiranje bolnikov, okuženih s HIV, na okužbo s HBV in HCV od leta 2001. Leta 2002 je bila izvedena prva raziskava, ki je ocenila prevalenco okužbe s HCV pri vseh do takrat s HIV okuženih bolnikih iz Slovenije in Hrvaške, testiranih na prisotnost okužbe s HCV. Ta je znašala 14,5 % (13). Ob ponovni oceni prevalence sočasne okužbe s HCV in HIV leta 2009, ko je bilo testiranih 87 % celotne populacije s HIV okuženih oseb v Sloveniji, je bil ta delež nižji (10,7 %), prevalenca sočasne okužbe s HBV in HIV pa je znašala 25,6 % (14). V zadnji raziskavi, ki je zajemala 90,6 % populacije s HIV okuženih oseb v Sloveniji, je bila prevalenca sočasne okužbe s HCV še nižja (7,6 %) (8). Po naših podatkih, s katerimi smo zajeli 84,9 % populacije s HIV okuženih oseb v

Sloveniji, je prevalenca sočasne okužbe s HBV 24,3 % in se bistveno ne razlikuje od prevalence, ocenjene leta 2009.

Sočasna aktivna okužba s HBV in HCV (pozitivna HBsAg in HCV RNA) je bila ugotovljena pri dveh s HIV okuženih posameznikih, in sicer pri IVDU, pri katerem je bila okužba s HIV ugotovljena leta 2000 in pri bolniku s hemofilijo z leta 1996 ugotovljeno okužbo s HIV.

Nizka prevalenca okužbe s HBV in HCV pri s HIV okuženih osebah v Sloveniji je lahko odraz tega, da je delež MSM med splošno populacijo okuženih s HBV ali HCV v Sloveniji majhen in da je intravenska uporaba prepovedanih drog v Sloveniji še vedno najpogostejši način prenosa HCV (15). Prav tako je okužba s HIV med IVDU v Sloveniji redka (16).

Številne države v svetu opažajo zaskrbljujoče povečevanje pojavljanja okužbe s HIV v populaciji MSM (17–19). Slika iz leta v leto naraščajočih novih primerov okužb s HIV v Sloveniji ni prav nič drugačna (2). Delež MSM med s HIV okuženimi bolniki, ki so imeli postavljeno diagnozo okužbe s HIV v Sloveniji v obdobju 1986–2013, znaša 59 % (377/639). Tudi v letu 2014 že opažamo nove primere akutne okužbe s HCV pri s HIV okuženimi MSM. O dramatičnem naraščanju incidence okužbe s HCV pri s HIV okuženih bolnikih v populaciji MSM poročajo iz več držav (20–22).

V povezavi z vse bolj tveganim spolnim vedenjem med MSM v svetu ter tudi v Sloveniji predstavljajo MSM najbolj ogroženo populacijo prenosa okužbe s HIV, virusnih hepatitisov in ostalih spolno prenosljivih okužb (2, 23, 24).

ZAKLJUČKI

V Sloveniji ostaja prevalenca okužbe s HBV in/ali s HCV pri s HIV okuženih osebah še vedno nizka, vendar se moramo glede na trend naraščanja števila okuženih s HIV, predvsem v populaciji MSM,

zavedati nevarnosti porasta novih primerov okužb s HBV in HCV. Zaradi možnosti nadzora, preprečevanja širjenja in uspe-

šnega zdravljenja ob čimprejšnji potrditvi okužbe s HBV in/ali HCV je redno spremljanje s HIV okuženih bolnikov nujno.

LITERATURA

1. Klavs I, Kustec T, Kastelic Z. Okužba s HIV v Sloveniji, letno poročilo 2013. Nacionalni inštitut za javno zdravje [internet]. 2014 [citirano 2014 Sep 13]. Dosegljivo na: http://www.ivz.si/hiv_spo
2. Klavs I, Bergant N, Kastelic Z, et al. Disproportionate and increasing burden of HIV infection among men who have sex with men in Slovenia: surveillance data for 1999–2008. *Euro Surveill.* 2009; 14 (47): 19419.
3. Palella FJ Jr, Delaney KM, Moorman AC, et al. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. *N Engl J Med.* 1998; 338 (13): 853–60.
4. Puoti M, Moioli MC, Travi G, et al. The burden of liver disease in human immunodeficiency virus-infected patients. *Semin Liver Dis.* 2012; 32 (2): 103–13.
5. Weber R, Sabin CA, Friis-Møller N, et al. Liver-related deaths in persons infected with the human immunodeficiency virus: the D:A:D study. *Arch Intern Med.* 2006; 166 (15): 1632–41.
6. Koziel MJ, Peters MG. Viral hepatitis in HIV infection. *N Engl J Med* 2007; 356 (14): 1445–54.
7. Vidmar L, Poljak M, Tomažič J, et al. Transmission of HIV-1 by human bite. *Lancet.* 1996; 347 (9017): 1762–3.
8. Škamperle M, Seme K, Lunar MM, et al. Prevalence, genotype distribution, and risk factors for hepatitis C infection among HIV-infected individuals in Slovenia: a 1986–2013 update. *Acta Dermatovenerol Alp Panonica Adriat.* 2014; 23 (2): 25–6.
9. Alter MJ. Epidemiology of viral hepatitis and HIV co-infection. *J Hepatol.* 2006; 44 (1): 6–9.
10. Thio CL. Hepatitis B in the human immunodeficiency virus-infected patient: epidemiology, natural history, and treatment. *Semin Liver Dis.* 2003; 23 (2): 125–36.
11. Sulkowski MS, Thomas DL. Hepatitis C in the HIV-infected person. *Ann Intern Med.* 2003; 138 (3): 197–207.
12. Sulkowski MS. Viral hepatitis and HIV coinfection. *J Hepatol.* 2008; 48 (2): 353–67.
13. Seme K, Poljak M, Begovac J, et al. Low prevalence of hepatitis C virus infection among human immunodeficiency virus type 1-infected individuals from Slovenia and Croatia. *Acta Virol.* 2002; 46 (2): 91–4.
14. Seme K, Lunar MM, Tomažič J, et al. Low prevalence of hepatitis B and C infections among HIV-infected individuals in Slovenia: a nation-wide study, 1986–2008. *Acta Dermatovenerol Alp Panonica Adriat.* 2009; 18 (4): 153–6.
15. Seme K, Vrhovac M, Močilnik T, et al. Hepatitis C virus genotypes in 1,504 patients in Slovenia, 1993–2007. *J Med Virol.* 2009; 81 (4): 634–9.
16. Pirš M, Poljak M, Seme K, et al. Clinical features and virologic characteristics of primary and early HIV-1 infection in Slovenian patients. *Coll Antropol.* 2006; 30 (2): 47–52.
17. Hall HI, Song R, Rhodes P, et al. Estimation of HIV incidence in the United States. *JAMA* 2008; 300 (5): 520–9.
18. Jaffe HW, Valdiserri RO, De Cock CM. The reemerging HIV/AIDS epidemic in men who have sex with men. *JAMA.* 2007; 298 (20): 2412–4.
19. European Centre for Disease Prevention and Control/WHO Regional office for Europe. HIV/AIDS surveillance in Europe 2012. [internet]. 2013 [citirano 2014 Sep 13]. Dosegljivo na: http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0018/235440/e96953.pdf
20. Danta M, Brown D, Bhagani S, et al. Recent epidemic of acute hepatitis C virus in HIV-positive men who have sex with men linked to high-risk sexual behaviours. *AIDS.* 2007; 21 (8): 983–91.
21. Urbanus AT, van de Laar TJ, Stolte IG, et al. Hepatitis C virus infections among HIV-infected men who have sex with men: an expanding epidemic. *AIDS.* 2009; 23 (12): 1–7.
22. Wandeler G, Gsponer T, Bregenzler A, et al. Hepatitis C virus infections in the Swiss HIV Cohort Study: a rapidly evolving epidemic. *Clin Infect Dis.* 2012; 55 (10): 1408–16.
23. Hasse B, Ledergerber B, Hirschel B, et al. Frequency and determinants of unprotected sex among HIV-infected persons: the Swiss HIV cohort study. *Clin Infect Dis.* 2010; 51 (11): 1314–22.
24. Finlayson TJ, Le B, Smith A, et al. HIV risk, prevention, and testing behaviours among men who have sex with men – National HIV Behavioral Surveillance System, 21 U.S. cities, United States, 2008. *MMWR Surveill Summ.* 2011; 60 (14): 1–34.

Mario Poljak¹, Boštjan J. Kocjan², Polona J. Maver Vodičar³, Katja Seme⁴, Kristina Fujs Komloš⁵, Mateja M. Jelen⁶, Lea Hošnjak⁷, Anja Oštrbenk⁸

Pregled raziskav človeških papilomavirusov v Sloveniji 2012–2014

A Review of Human Papillomavirus Research in Slovenia: 2012–2014

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: HPV, genotip, rak, karcinom, bradavice, papilom, Slovenija

Človeški papilomavirusi (HPV) so raznolika skupina DNA virusov, etiološko povezana z različnimi benignimi, predrakavimi in rakavimi novotvorbami epitelijske sluznice kože pri človeku. Podrobni pregled slovenskih raziskav na področju HPV, ki so bile od leta 1990 do oktobra 2011 objavljene v revijah, ki jih indeksira Science Citation Index (SCI) in/ali PubMed/Medline – skupaj 73 člankov, je bil objavljen konec leta 2011 (*Acta Dermatovenerol Alp Panonica Adriat* 2011; 20: 99–112). V tem prispevku predstavljamo 51 raziskovalnih, strokovnih in preglednih člankov slovenskih raziskovalcev, objavljenih od novembra 2011 do oktobra 2014 v revijah, ki jih indeksira SCI in/ali PubMed/Medline.

ABSTRACT

KEY WORDS: HPV, cancer, carcinoma, warts, papilloma, Slovenia

Human papillomaviruses (HPV), remarkably diverse DNA viruses etiologically linked with various benign and malignant neoplastic lesions of mucosal and skin epithelium, have been the subject of intensive research worldwide for more than three decades. Detailed review of HPV research papers published in Science Citation Index (SCI) and/or PubMed/Medline indexed journals by Slovenia researchers, from 1990 until October

¹ Prof. dr. Mario Poljak, dr. med., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana; mario.poljak@mf.uni-lj.si

² Znan. sod. dr. Boštjan J. Kocjan, univ. dipl. mikr., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

³ Asist. dr. Polona J. Maver Vodičar, dr. med., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

⁴ Prof. dr. Katja Seme, dr. med., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

⁵ Asist. dr. Kristina Fujs Komloš, univ. dipl. mikr., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

⁶ Dr. Mateja M. Jelen, univ. dipl. mikr., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

⁷ Lea Hošnjak, univ. dipl. mikr., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

⁸ Anja Oštrbenk, univ. dipl. mikr., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

2011 (73 papers) has been published in December 2011 (*Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat* 2011; 20: 99–112). Here we present a brief review of 51 original research papers and/or reviews, published in SCI and/or PubMed/Medline indexed journals from November 2011 until October 2014.

UVOD

Človeški papilomavirusi (angl. *human papillomavirus*, HPV) so raznolika skupina DNA virusov, etiološko povezana z različnimi benignimi, predrakavimi in rakavimi novotvorbami epitelijske sluznice in kože pri človeku. HPV so že skoraj četrt stoletja predmet številnih raziskav v Sloveniji. Podrobni pregled slovenskih raziskav na področju HPV, od leta 1990 do oktobra 2011, in sicer 73 člankov, objavljenih v revijah, ki jih indeksirajo Science Citation Index (SCI) in/ali PubMed/Medline, je bil objavljen konec leta 2011 (1). V tem prispevku bomo na kratko predstavili skupaj 51 raziskovalnih, strokovnih in preglednih člankov slovenskih raziskovalcev, objavljenih od novembra 2011 do oktobra 2014 v revijah, ki jih indeksirajo SCI in/ali PubMed/Medline.

NOVI GENOTIPI ČLOVEŠKIH PAPILOMAVIRUSOV

Po podatkih mednarodnega referenčnega centra za HPV (angl. *International Human Papillomavirus Reference Center*), ki deluje pod okriljem inštituta Karolinska (se. *Karolinska Institutet*) v Stockholmu na Švedskem, je bilo do 1. oktobra 2014 popolnoma opredeljenih in uradno priznanih 195 genotipov HPV. Nedavno je bilo na podlagi filogenetskih primerjav vseh dostopnih (delnih ali celotnih) nukleotidnih zaporedij genoma HPV v več neodvisnih raziskavah dokazano, da *in vivo* obstaja še več kot 250 možnih novih genotipov HPV. Večje število novoodkritih HPV v zadnjih sedmih letih je posledica uporabe novih, od nukleotidnega zaporedja neodvisnih tehnik pomnoževanja in novih, pogosto ro-

dovno-navzkrižnih širokospektralnih oligonukleotidnih začetnikov, ki omogočajo pomnoževanje širšega spektra HPV in/ali metode globokega sekveniranja.

V obdobju 2012–2014 smo odkrili in dokončno opredelili šest novih, uradno priznanih genotipov HPV. Trenutno smo v znanstvenih revijah objavili podatke za tri: HPV-120, HPV-159 in HPV-174 (2–4). Delno smo opredelili tudi več kot 35 kandidatskih izolatov za nove HPV-genotipe. Delna nukleotidna zaporedja HPV-120, HPV-159 in HPV-174 smo odkrili z uporabo verižne reakcije s polimerazo (angl. *polymerase chain reaction*, PCR) in različnih širokospektralnih oligonukleotidnih začetnikov. Temu je sledilo pomnoževanje in kloniranje celotnih virusnih genomov in njihova genetska oziroma filogenetska opredelitev. Genotip HPV-120, ki se filogenetsko uvršča v rod *Betapapillomavirus* (β -PV) v vrsto β 2 (najbližji sorodnik je HPV-23), je naša raziskovalna skupina odkrila v brisu zadnjičnega kanala, sočasno z raziskovalci v ZDA, ki so ta genotip odkrili v izpirku ustne votline (2). V nadaljevanju skupne raziskave smo z uporabo HPV-120-tipsko značilne PCR v realnem času (angl. *real time PCR*, RT-PCR) HPV-120 dokazali v večjem številu vzorcev ustne votline, zadnjika, anogenitalnih bradavic in dlačnih mešičkov obrvi, s čimer smo potrdili njegov dvojni tkivni tropizem. Z molekularno analizo gena L1 smo v nadaljevanju dokazali številne podtipske različice tega virusa, ki so tvorile dve možni genetski liniji (2). Genotip HPV-159 smo, podobno kot HPV-120, odkrili v brisu zadnjičnega kanala (3). Filogenetsko ga uvrščamo med β -PV, v vrsto

β 2, njegov najbližji sorodnik pa je HPV-9. Genotip HPV-174 smo odkrili v tkivnem vzorcu ploščatoceličnega karcinoma (angl. *squamous cell carcinoma*, SCC) kože, ki je vseboval še HPV-9 in HPV-150 (4). Tudi ta genotip uvrščamo med β -PV oziroma v vrsto β 2, njegov najbližji sorodnik pa je HPV-145. Vloga HPV-174 pri nastanku raka kože za zdaj ostaja neznana (4).

Vzporedno z naraščanjem števila novih HPV se večja tudi število novoodkritih živalskih papilomavirusov (angl. *Papillomavirus*, PV). Po podatkih zadnjega preglednega članka iz leta 2013 je bilo popolnoma opredeljenih 112 PV pri 54 različnih živalskih vrstah, ki se taksonomsko razvrščajo v 32 PV-rodov. Odkrivanje in potrjevanje novih živalskih PV naj bi spremljali v Referenčnem centru za živalske papilomaviruse (angl. *Animal Papillomavirus Reference Center*) v New Yorku (ZDA), ustanovljenem leta 2010, vendar center še vedno ni polno zaživel. Vsak novi genotip živalskih PV je označen z okrajšavo rodu in vrsto živali, pri kateri je bil osamljen ter z zaporedno številko osamitve (npr. kratici FdPV1 in FdPV2 označujeta PV, odkrita pri domači mački *Felis domesticus*).

V nedavni raziskavi smo s pomočjo novih širokospektralnih oligonukleotidnih začetnikov za HPV in posebne metode vgnezdene PCR (angl. *single tube nested 'hanging droplet' PCR*) odkrili prvi PV *Phodopus sungorus papillomavirus type 1* (PsuPV1), katerega naravni gostitelj je sibirski hrček (*Phodopus sungorus*). Novi živalski virus, ki izkazuje vse značilnosti organizacije genoma PV, smo uvrstili v rod *Pipapillomavirus*, kamor trenutno uvrščamo še šest PV, ki so bili osamljeni pri različnih glodavcih, vključujoč sirijskega hrčka, različne vrste miši in norveško podgano. PsuPV1 je pričakovano najbolj soroden MaPV1 (*Mesocricetus auratus Papillomavirus Type 1*), ki je bil osamljen iz ustne votline sirijskega hrčka (*Mesocricetus auratus*) (5).

GENETSKA RAZNOLIKOST IZBRANIH GENOTIPOV ČLOVEŠKIH PAPILOMAVIRUSOV

HPV so eden redkih primerov v humani virologiji, ko genotipe virusa lahko povežemo z določeno boleznijo. Genotipi HPV kažejo tkivno specifičnost in povezanost z razvojem značilnih bolezenskih sprememb v tarčnem epitelu. Ker se bolezen razvije le pri manjšini oseb, okuženih z določenim genotipom HPV, se je izoblikovala domneva, da znotraj posameznega genotipa HPV obstajajo podtipske različice, ki bi lahko prispevale k večji ali manjši patogenosti virusa. Patogenetska raznolikost podtipskih različic HPV naj bi izvirala iz genetskih sprememb v kodirajočih in/ali nekodirajočih oziroma uravnalnih področjih genoma HPV.

V sodelovanju z raziskovalci z Univerze Alberta Einsteina (New York, ZDA) smo na podlagi filogenetske analize in izračuna maksimalnih razlik parov nukleotidnih zaporedij med 43 celotnimi genomi HPV-6 in 32 celotnimi genomi HPV-11 predlagali kriterij za določevanje genetskih linij HPV-6/-11 (1–10 % odstopanje v celotnem genomu od ostalih podtipskih različic istega genotipa HPV) in genetskih podlinij (0,5–1,0 % odstopanje). Po opisanem predlogu imenujemo skupino podtipskih različic HPV, ki vključujejo referenčno različico, linija A in njene podlinije A1, A2 itd. Skupine podtipskih različic, ki ne vključujejo referenčne različice HPV, imenujemo po abecednem vrstnem redu (linija B, C itd.). Podtipske različice HPV-6 smo uvrstili v dve genetski liniji: A in B ter tri podlinije: B1, B2 in B3, medtem ko smo različice HPV-11 uvrstili v dve podliniji: A1 in A2. Postavili smo tudi sistem za poenoteno številčenje nukleotidnih mest v genomskih zaporedjih genotipov HPV iz rodu *Alphapapillomavirus* (α -PV) (6).

V letu 2014 smo izvedli raziskavo, v kateri smo na podlagi analize celotnih genomov kot prvi raziskali svetovno genom-

sko raznolikost genotipa HPV-6. V raziskavo smo vključili 530 HPV-6-pozitivnih vzorcev, pridobljenih iz 15 držav iz šestih celin (Evropa, Azija, Severna in Južna Amerika, Avstralija in Afrika). HPV-6-pozitivne vzorce smo pridobili iz različnih anatomskih mest okužbe (anogenitalnih bradavic, papilomov grla in brisov materničnega vratu). Izmed 530 vzorcev smo 492 opredelili nukleotidna zaporedja v genomskih področjih: E5a, E5b, L1 in LCR ter najbolj raznolikim različicam določili celotno nukleotidno zaporedje. Z omenjeno raziskavo smo v gensko banko GenBank prispevali največje število celotnih genomov HPV-6 do sedaj (130/190). Podtipske različice HPV-6 smo filogenetsko uvrstili v genetski liniji A in B ter pet podlinij B1–B5. Z geografsko in klinično povezavo med (pod)linijami HPV-6 smo pokazali, da so različice iz linije B prevladovale globalno, v Aziji različice iz linije A in v Afriki ter Severni in Južni Ameriki različice iz podlinije B3. Različice B3 so bile bolj pogoste pri ženskah in različice B1 in B3 v anogenitalnih okužbah (7).

V naslednji raziskavi, v kateri smo nadaljevali naše delo na področju genetske raznolikosti klinično pomembnih nizkorizičnih genotipov HPV (angl. *low-risk HPV*, LR-HPV), smo opredelili genomski področja L1, LCR in E6 14 izolatov HPV-40, 49 izolatov HPV-42, 10 izolatov HPV-43 in 35 izolatov HPV-44. Po podatkih iz doslejgljive literature je ta raziskava predstavljala prvo opredelitev podtipskih različic HPV-40, HPV-42 in HPV-43 doslej. Pri posameznem genotipu HPV smo opisali številne različice genomskih področij L1, LCR in E6, opredeljene s številni zamenjavami, vstavki ali izpadi nukleotidov, ki so skupno sestavljale 9 podtipskih različic HPV-40, 30 podtipskih različic HPV-42, tri podtipske različice HPV-43 in 19 podtipskih različic HPV-44. Na osnovi molekularno-filogenetskih analiz združenega zaporedja L1, LCR in E6 smo prvič doka-

zali, da obstoječe podtipske različice HPV-42 in HPV-43 tvorijo filogenetsko drevo z dvema izrazito ločenima skupinama različic, ki so najverjetneje nastale v procesu evlucijskega ločevanja na dve samostojni taksonomski enoti oziroma dva nova genotipa HPV. Podoben fenomen smo v raziskavi potrdili tudi za HPV-44 (8).

Leta 2008 je bila odkrita nova, domnevno manj patogena različica HPV-16 z značilnim, 63 baznih parov velikim vstavkom v genu E1, ki evlucijsko pripada skupini različic HPV-16 E6-T350G. V raziskavi, v katero smo vključili 390 HPV-16-pozitivnih vzorcev, ki so bili osamljeni pri istemu številu žensk z normalno citologijo, cervikalnimi intraepitelijskimi neoplazijami stopnje 1–3 (angl. *cervical intraepithelial neoplasia* 1–3, CIN 1–CIN 3) in rakom materničnega vratu, smo želeli ugotoviti kolikšen delež okužb s HPV-16 v Sloveniji dejansko povzroča različica z vstavkom v genu E1 HPV-16 E1. Različico HPV-16 E1, ki smo jo dokazovali s pomnoževanjem 146–210 baznih parov velikega dela gena E1 in sekveniranjem 167 baznih parov velikega dela gena E6, smo dokazali v sedmih od 48 (14,6 %) vzorcev žensk z normalno citologijo, enem od 21 (4,8 %) vzorcev žensk s CIN 1, dveh od 20 (10,0 %) vzorcev žensk s CIN 2, devetih od 131 (6,9 %) vzorcev žensk s CIN 3 in 12 od 170 (7,1 %) vzorcev žensk z rakom materničnega vratu. Čeprav smo zaznali trend upadanja prevalece različice HPV-16 E1 z naraščanjem stopnje cervikalnih sprememb, razlike v njeni prevalenci med ženskami z normalno citologijo, različnimi predrakavimi spremembami ali rakom materničnega vratu niso bile statistično pomembne (9).

DIAGNOSTIKA OKUŽBE S ČLOVEŠKIMI PAPILOMAVIRUSI

Na povabilo Svetovne zdravstvene organizacije (angl. *World Health Organisation*, WHO) smo s priznanimi tujimi raziskoval-

ci na področju HPV napisali dva pregledna članka, ki sta del obsežne HPV-monografije z naslovom »Comprehensive Control of HPV Infections and Related Diseases«, objavljene kot posebna izdaja revije *Vaccine* konec leta 2012. HPV-monografija 2012 še vedno predstavlja osnovni vir vseh najpomembnejših informacij na področju HPV in z njimi povezanih bolezni. V prvem članku smo naredili podroben pregled vseh komercialno dostopnih metod za dokazovanje okužbe z α -PV. S pregledom vseh pomembnejših podatkovnih baz smo ugotovili, da je bilo na svetovnem tržišču do aprila 2012 vsaj 125 različnih komercialnih HPV-testov in vsaj 84 njihovih različic. Kljub tako velikemu številu HPV-testov smo ugotovili, da je le 10–15 % teh izpolnjevalo minimalne kriterije za varno uporabo v klinične namene za vsaj eno od priznanih kliničnih indikacij za testiranje na okužbo s HPV. Poleg tega za več kot tri četrtine vseh HPV-testov nismo našli niti ene same objave v recenziranih znanstvenih revijah. Zaključili smo, da tako komercialno dostopnih HPV-testov kot tistih razvitih v laboratorijih (angl. *in-house test*), ki niso bili klinično preverjeni oziroma ne ustrezajo mednarodno dogovorjenim standardom za klinično specifičnost in klinično občutljivost, ne smemo uporabljati v klinični praksi (10).

V sklopu HPV-monografije 2012 smo napisali tudi povzetek ključnih meta-analiz in preglednih člankov, ki so obravnavali uporabnost testiranja HPV za tri ključne klinične indikacije (11):

- triažo bolnic s citološko diagnozo ASC-US (angl. *atypical squamous cells of undetermined significance*) ali LSIL (angl. *low grade squamous intraepithelial lesion*),
- kontrolo uspešnosti zdravljenja sprememb CIN 2+ in
- primarno presejalno testiranje za zgodnje odkrivanje raka materničnega vratu.

Naši izsledki so pokazali, da je triaža žensk z diagnozo ASC-US s testom HPV, če se uporabi metoda Hybrid Capture 2 assay (hc2, Qiagen Gaithersburg, Inc., MD, ZDA) ali primerljiv HPV DNA-test, statistično značilno občutljivejša metoda za odkrivanje hudih predrakavih sprememb materničnega vratu in enako specifična metoda kot ponavljajoči se brisi materničnega vratu. Test APTIMA (Gen-Probe Inc., San Diego, CA, ZDA), ki namesto DNA dokazuje mRNA E6/E7 visokorizičnih genotipov HPV (angl. *high-risk HPV*, HR-HPV), je bil načeloma enako občutljiv kot hc2 vendar bolj specifičen. V triazi žensk z blago diskariotičnimi celicami se je metoda hc2 izkazala za bolj občutljivo za odkrivanje hudih predrakavih sprememb materničnega vratu kot ponavljajoči se brisi materničnega vratu, vendar je imela znatno manjšo specifičnost. Test APTIMA je tudi tu izkazal enako klinično občutljivost kot hc2, vendar večjo klinično specifičnost. V nadaljevanju smo ugotovili, da je bilo HPV-testiranje statistično značilno občutljivejša in primerljivo specifična metoda za odkrivanje rezidualnega ali recidivnega CIN 2+ kot kontroliranje z brisom materničnega vratu. V primarnem presejalnem testiranju za raka materničnega vratu so bili testi hc2, GP5+/6+ PCR, cobas 4800 PCR (Roche Molecular Systems Inc., Alameda, CA, ZDA) in RealTime High Risk HPV (RealTime, Abbott Molecular, Des Plaines, IL, ZDA), s katerimi dokazujemo skupino HR-HPV, bolj občutljivi za odkrivanje CIN 2+ kot citologija toda nekoliko manj specifični. Specifičnost omenjenih testov lahko izboljšamo z refleksno citologijo in/ali refleksnim ali sočasnim določanjem HPV-16 in HPV-18 ali nekaterimi drugimi triažnimi testi (npr. imunohistocitokemično barvanje celične beljakovine p16^{INK4a} ali p16/Ki-67). Izsledki naše raziskave podpirajo uporabo testa HPV kot najbolj primerne metode za triažo žensk z atipičnimi ploščatimi celicami

materničnega vratu, za spremljanje žensk po zdravljenju CIN 2+ in pri primarnem presejanju za raka materničnega vratu pri ženskah starejših od 30 let (11).

Zaradi velikega odmeva HPV-monografije 2012 se je WHO odločila pripraviti tudi povzetek celotne monografije, ki je bil objavljen v vseh štirih t.i. regionalnih monografijah, objavljenih kot posebna izdaja revije *Vaccine* konec leta 2013. Ugotovili smo, da je bilo v letu 2008 med 12,7 milijoni novih primerov raka na svetu 4,8 % mogoče pripisati okužbi s HPV, incidenca in umrljivost pa je bila bistveno večja v državah v razvoju kot v razvitih državah. V zadnjih letih se je poznavanje naravnega poteka okužbe s HPV zelo izboljšalo, preizkušane in vpeljane so bile strategije za varno in učinkovito cepljenje proti okužbi s HPV, razvite so bile vedno bolj zanesljive molekularne diagnostične metode za odkrivanje in presejalno testiranje na raka materničnega vratu, svetovna oza-veščenost o HPV in o boleznih, povezanih z okužbo s HPV, se je občutno izboljšala. Hkrati s tem napredkom so se pojavili novi pereči izzivi: cena preprečevanja okužbe s HPV in zdravstvene obravnave, tehnične omejitve pri uvajanju preventivnih programov, družbeni in politični odpor do različnih možnosti preprečevanja okužb in zelo velike razlike v ekonomskih zmožnostih in zdravstvenih sistemih v različnih državah. Preoblikovanje paradigme preprečevanja raka materničnega vratu in ostalih bolezni, povezanih s HPV, zahteva vključitev strateške kombinacije vsaj štirih pomembnih komponent: (i) rutinske uvedbe cepljenja proti HPV za ženske v vseh državah, (ii) povečanja in poenostavitve obstoječih programov presejanja z uporabo novih tehnologij, (iii) povečanja in prilagoditve presejalnih programov za izvajanje v državah v razvoju in (iv) obravnave širšega spektra rakov in ostalih bolezni, ki jih je možno preprečiti s cepljenjem proti HPV pri ženskah in moških (12).

RealTime je HPV test naslednje generacije, ki temelji na metodi RT-PCR in je sposoben ločiti med okužbo s HPV-16, HPV-18 in 12 HR-HPV (HPV-31, HPV-33, HPV-35, HPV-39, HPV-45, HPV-51, HPV-52, HPV-56, HPV-58, HPV-59, HPV-66 in HPV-68) (13–16). Nemški raziskovalci so v sodelovanju z našim laboratorijem primerjali analitično in klinično občutljivost in specifičnost testa RealTime s testom hc2 pri 545 ženskah, ki so bile napotene na nadaljnjo kolposkopsko obravnavo. Raziskava je pokazala primerljive klinične in analitične rezultate med obema testoma, z izjemo višje analitične specifičnosti testa RealTime v primerjavi s hc2 (15). V nizozemski raziskavi, izvedeni v sodelovanju z našim laboratorijem, so neodvisno potrdili, da RealTime izpolnjuje vse kriterije mednarodnih priporočil za presejalni test za zgodnje odkrivanje raka materničnega vratu (klinično občutljivost, klinično specifičnost in znotraj- in med-laboratorijsko ponovljivost) (14). V pregledu literature, ki je zajemala vse objave analitičnih in kliničnih evalvacij testa RealTime med leti 2009 in 2013, smo ugotovili, da ima test RealTime zelo visoko klinično občutljivost za detekcijo CIN 2+ in CIN 3+ in primerljivo klinično specifičnost s testom hc2. Glede na objavljene rezultate lahko zaključimo, da se test RealTime lahko uporablja v klinični praksi kot validiran triažni test HPV za nadaljnjo obravnavo žensk s nejasnim oziroma mejnim citološkim izvidom ter kot presejalni test za zgodnje odkrivanje raka materničnega vratu (13).

V raziskavi, izvedeni leta 2012, smo primerjali učinkovitost testa RealTime z učinkovitostjo diagnostičnega kompleta INNO-LiPA HPV Genotyping *Extra* (INNO-LiPA, FujiRebio, Malvern, PA, ZDA) za dokazovanje in identifikacijo HPV v 60 arhivskih tkivnih vzorcih karcinoma ustne votline in ustnega dela žrela, fiksiranih v formalinu. Z obema metodama smo HPV

DNA oziroma HPV-16 dokazali v petih (8,3 %) primerih, s čimer smo dokazali, da je RealTime v kombinaciji s kompletom QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Nemčija) hitra, zanesljiva, občutljiva in specifična metoda za dokazovanje in delno genotipizacijo tarčnih genotipov HPV v arhivskih tkivnih vzorcih raka glave in vratu (16).

Najbolj pogosto uporabljen test za genotipizacijo HPV, Linear Array HPV Genotyping test (Linear Array, Roche Molecular Diagnostics, Branchburg, NJ, ZDA) zazna prisotnost 37 genotipov HPV, med drugimi tudi vseh 12 HR-HPV. Zaradi navzkrižno reaktivne HPV-33/35/52/58 lovke v vzorcih, kjer dokažemo prisotnost HPV-33, HPV-35 in/ali HPV-58, ne moremo potrditi okužbe s HPV-52. Z uporabo HPV-52 tipsko-značilnega RT-PCR smo dokazali, da ima Linear Array izjemno visoko analitično občutljivost (100 %) za dokazovanje okužbe s HPV-52 v vzorcih, kjer ni dokazane okužbe s HPV-33, HPV-35 in/ali HPV-58, vendar je dodatno testiranje nujno pri vzorcih, kjer dokažemo sočasno okužbo s HPV-33, HPV-35 ali HPV-58 (17).

PRESEČNA RAZISKAVA »OPOZORILNO EPIDEMIOLOŠKO SPREMLJANJE OKUŽB S HPV V PRILOŽNOSTNEM VZORCU ŽENSK, STARIH OD 20 DO 64 LET«

V presečno raziskavo »Opozorilno epidemiološko spremljanje okužb s HPV v priložnostnem vzorcu žensk, starih od 20 do 64 let«, ki je potekala med decembrom 2009 in avgustom 2010, je bilo vključenih več kot 4.400 žensk, ki so v 16 izbranih ginekoloških ambulantah po vsej Sloveniji prišle na ginekološki pregled v okviru nacionalnega presejalnega programa za raka materničnega vratu (18, 19). Ginekologi so odvzeli bris materničnega vratu za citološko preiskavo in bris za testiranje na HR-HPV s testom hc2 in RealTime. Prevalenca okužb z vsaj enim od 14 HR-HPV je

bila 12,9 %. Prevalenca okužb z HR-HPV je bila najvišja v starostni skupini 20–24 let in se je zniževala s starostjo in najnižja med ženskami z normalnim izvidom citološke preiskave brisa materničnega vratu in se je zviševala s stopnjo cervikalne patologije. Najbolj pogosta je bila okužba s HPV-16 (3,5 %), ki ji je sledila okužba s HPV-31 (2,6 %), HPV-51 (1,8 %) in HPV-52 (1,8 %) (18).

Naključno izbranih 1.000 brisov materničnega vratu je bilo dodatno testiranih na prisotnost 37 genotipov HPV s testom Linear Array v namen določitve prevalence 25 ne-visokorizičnih genotipov HPV. Prevalenca okužbe s temi 25 genotipi HPV je bila 10,0 %, brez sočasne okužbe s HR-HPV pa 4,0 %. Najbolj pogost genotip je bil HPV-53 (2,0 %), ki so mu sledili HPV-54 (1,7 %), HPV-42 (1,6 %) in HPV-89 (1,6 %) (19).

Pri 3.259 ženskah, ki so sodelovale v presečni raziskavi, smo poleg brisa materničnega vratu, ki smo ga testirali na HPV DNA, pridobili tudi serumski vzorec. S testiranjem izbranih genotip-specifičnih anti-HPV protiteles smo ocenili seroprevalenco 11 HR-HPV in 4 LR-HPV in sicer HPV-6, HPV-11, HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-33, HPV-35, HPV-39, HPV-45, HPV-52, HPV-56, HPV-58, HPV-59, HPV-68 in HPV-73. Kumulativna seropozitivnost na enega izmed 15 testiranih genotipov HPV je bila 56 %, na enega od 11 HR-HPV 59,2 % in na enega od 4 LR-HPV 33,1 %. Protitelesa, usmerjena proti kateremkoli od štirih genotipov HPV, ki so vključeni v štirivalentno cepivo proti HPV, so bila prisotna pri 40,8 % žensk. Seropozitivnost za posamezne cepilne genotipe HPV je bila: HPV-16 (25,2 %), HPV-18 (9,4 %), HPV-6 (19,1 %) in HPV-11 (5,8 %). Starostno-specifična seropozitivnost je bila najvišja pri ženskah, starih 30–39 let (29,6 %) in je upadala s starostjo (14 % pri ženskah, starih 60–64 let) (20). Istočasno s to raziskavo smo opisali

tudi validacijo uporabljene serološke metode, ki temelji na tehnologiji Luminex, pri kateri se HPV-specifična protitelesa iz bolnikovega seruma vežejo na HPV-specifične-virusom-podobne delce. Validacija serološke metode je temeljila na primerjavi prisotnosti DNA 15 izbranih genotipov HPV v brisih materničnega vratu in prisotnosti HPV-specifičnih protiteles v serumu. Statistično pomembno povezavo med prisotnostjo anti-HPV genotip-specifičnih protiteles in prisotnostjo HPV DNA smo dokazali pri 13 genotipih HPV. Statistična povezava je bila močnejša pri ženskah, ki so bile okužene samo z enim genotipom HPV, v primerjavi z ženskami, okuženimi z več genotipi HPV (21).

V podraziskavi, ki je vključevala 195 žensk iz osnovne presečne raziskave, okužba s HR-HPV ni imela vpliva na število ali odstotek zrelih jajčnih celic, odstotek oplojenih jajčnih celic, kakovost zarodka ali na stopnjo zanositve in tako ni bila povezana z uspehom postopkov zunajtelesne oploditve (22).

BREME IN PREPREČEVANJE S ČLOVEŠKIMI PAPILOMAVIRUSI POVEZANIH NOVOTVORB V DRŽAVAH VZHODNE IN SREDNJE EVROPE TER SREDNJE AZIJE

Na povabilo WHO smo koordinirali nastanek obsežne regionalne HPV-monografije z naslovom »Comprehensive Control of HPV Infections and Related Diseases in the Central and Eastern Europe and Central Asia Region«, objavljene kot posebna izdaja revije *Vaccine* konec leta 2013. Monografija, ki vsebuje 6 člankov, je prvi in najpopolnejši pregled bremena in trenutnega stanja programov za preprečevanje s HPV povezanih novotvorb v državah Vzhodne in Srednje Evrope ter Srednje Azije (23–26). Podatki za izdelavo monografije so bili poleg natančnega pregleda objav (večinoma objave v lokalnih jezikih) pridobljeni tudi s pomočjo dveh podrob-

nih vprašalnikov, ki smo jih pripravili ter njihovo izpolnjevanje in analizo koordinirali v našem laboratoriju. Zaradi omejenega prostora v regionalni HPV-monografiji smo del pridobljenih rezultatov objavili tudi v reviji *Acta Dermatovenerologica APA* (27–30).

V Srednji in Vzhodni Evropi z visoko incidenco raka materničnega vratu izstopata predvsem Romunija in Makedonija pred Bolgarijo, Litvo in Srbijo, v Srednji Aziji pa Kirgizistan, Kazahstan in Armenija (26, 31). Pomanjknje učinkovitega presejanja in visoko breme raka materničnega vratu vpliva na višjo umrljivost med mlajšimi ženskami. V nekaterih državah je opazen »efekt starostne kohorte«, kjer je tveganje za raka materničnega vratu povečano v zaporednih generacijah žensk, rojenih okrog let 1940–1950, kar je splošni pojav, ki kaže na spremembe spolnega vedenja v teh generacijah in povečano tveganje dolgotrajne okužbe s HPV (26). Možnosti za zmanjšanje bremena s HPV povezanih bolezni so odvisne od sredstev, ki so na razpolago. Zagotovo bi univerzalno cepljenje proti HPV z izboljšanjem presejanja bistveno zmanjšalo breme v teh dveh regijah Evrope in Azije (26, 31).

Objavljeni podatki o bremenu okužb s HPV, presejalnih programih za odkrivanje raka materničnega vratu in uvajanju cepljenja proti HPV v 16 državah Srednje in Vzhodne Evrope so zelo omejeni (24, 31). Analiza 28 najpomembnejših raziskav, narejenih na tkivnih vzorcih raka materničnega vratu, zadnjika in vulve v 16 državah Vzhodne in Srednje Evrope, je pokazala prisotnost HPV DNA v 86,6 % od 2.531 primerov raka materničnega vratu; 87,5 % HPV-pozitivnih rakov je vsebovalo HPV-16 in/ali HPV-18 (24, 30). Prevalenca HPV DNA pri raku zadnjika je bila 90,7 %, HPV-16 je bil prisoten v 86 %. Pri 164 primerih raka vulve je bila HPV DNA ugotovljena pri 32,9 %, delež HPV-16 pozitivnih rakov je znašal od 10,9 % do 27,5 % (30).

Prevalenca HPV DNA v rakah materničnega vratu, zadnjika in vulve in distribucija genotipov v Vzhodni in Srednji Evropi je bila primerljiva z ostalimi evropskimi regijami (24, 30).

V Vzhodni in Srednji Evropi se oportunistično presejanje na raka materničnega vratu izvaja v devetih od 16 in organizirano presejanje v sedmih od 16 držav. Presejalni programi večinoma temeljijo na uporabi citologije, pregledanost žensk pa niha med nekaj odstotkov do 70 % (24). Breme raka materničnega vratu v državah Vzhodne in Srednje Evrope je praviloma višje v primerjavi z Zahodno in Severno Evropo predvsem zaradi dolgoletne prakse oportunističnega presejanja, pa tudi zaradi močnega vpliva političnih in ekonomskih sprememb v obdobju prehoda iz komunizma (29). Dober primer vpliva teh sprememb je Latvija, kjer je bilo presejalno testiranje na raka materničnega vratu od začetka 60-ih let prejšnjega stoletja pomemben del preventivne dejavnosti s posledično pomembnim znižanjem incidence do leta 1989, vendar je bilo po letu 1991 prekinjeno. Po ponovni uvedbi presejalnega testiranja, ki je ostalo oportunistično, se je Latvija morala soočiti s številnimi problemi, ki so vplivali na nizko stopnjo presejanja tarčne populacije žensk, in šele uvedba organiziranega presejalnega testiranja leta 2009 je povzročila spremembo v trendu ter spodbudne rezultate (27). Večina držav v regiji se še vedno bori s težavami, ki ovirajo uspešno uvedbo programa, spodbudno dejstvo pa je, da se tudi države, ki so do zdaj imele le oportunistični program presejanja, pospešeno pripravljajo na prenovo programov, ki bodo zagotavljali organizirano nacionalno presejanje na raka materničnega vratu (29).

Pregled trenutnega stanja uvedbe cepljenja proti HPV v 16 državah Vzhodne in Srednje Evrope je pokazal, da je vsaj eno izmed obeh cepiv, ki sta trenutno na

tržišču, registrirano v vseh državah z izjemo Črne Gore (24). Do sedaj je le šest držav (Bolgarija, Češka, Latvija, Romunija, Slovenija in Makedonija) cepivo proti HPV uvedlo tudi v nacionalni program cepljenja in zagotovilo brezplačno rutinsko cepljenje tarčne populacije. Glavno oviro za uvedbo cepiva proti HPV v nacionalni program cepljenja pri ostalih 10 državah predstavlja predvsem visoka cena in negativno mnenje širše javnosti (24, 28). Cepljenje moških trenutno ni vključeno v nacionalni program cepljenja v nobeni izmed 16 držav v regiji (28).

Podatki o bremenu s HPV povezanih okužb v Rusiji, zahodnih državah nekdanje Sovjetske zveze, Kavkaški regiji in Centralni Aziji so zelo omejeni, incidenca in umrljivost zaradi raka materničnega vratu pa sta v tej regiji višji kot v večini zahodnoevropskih držav. Ocenjena prevalenca okužb s HPV pri ženskah z normalno citologijo na podlagi zelo omejenega števila raziskav je znašala od 0 % do 48 %, pri ženskah s predrakavimi spremembami višje stopnje od 77,2 % do 100 % in v rakah materničnega vratu od 89,9 % do 100 %. Programi presejanja so dokaj neuspešni zaradi oportunističnega značaja, problemi z odzivom žensk in pomanjkanja zanesljive citologije s centralnim registrom. Cepivo proti HPV je registrirano v desetih od 12 držav v regiji, vendar nikjer ni zares implementirano, predvsem zaradi visoke cene, slabe dostopnosti in pomanjkanja ozaveščenosti tako širše javnosti kot tudi zdravstvenih delavcev (25).

Na osnovi pridobljenih podatkov smo pripravili tudi prva uradna priporočila za preprečevanje raka materničnega vratu za države Vzhodne in Srednje Evrope ter Srednje Azije. Zaključili smo, da je potrebno takojšnje ukrepanje, ki bo vključevalo neprekinjene, usklajene in stopenjske programe preprečevanja raka materničnega vratu s kombiniranim pristopom cepljenja proti HPV (primarna preventiva) in

presejanja na raka materničnega vratu (sekundarna preventiva). Priporočene so tri različne strategije preprečevanja raka materničnega vratu za države Vzhodne in Srednje Evrope ter Srednje Azije, katerih je uvajanje odvisno od obstoječih možnosti in trenutnega stanja v posameznih državah (23):

- Države z organiziranim presejalnim programom si morajo prizadevati za povečanje pregledanosti žensk, ki se ne udeležujejo presejanja, za uvedbo testiranja na HPV v obstoječe programe in uvedbo cepljenja proti HPV v nacionalni program cepljenja.
- Države z oportunističnim programom z dobro delujočo mrežo citoloških laboratorijev naj poskušajo postopno spremeniti trenutni program v organizirano presejanje bodisi s testiranjem na HPV ali s citologijo in si hkrati prizadevati za uvedbo cepljenja proti HPV v nacionalni program.
- Države z nedelujočim oportunističnim presejanjem se morajo zavedati, da je uvedba presejalnega programa s citologijo lahko predraga ali celo nedosegljiva zaradi pomanjkanja znanja, usposobljenega kadra, infrastrukture in nadzora kvalitete, zato se v teh državah kot najprimernejša strategija priporoča uvedba cepljenja proti HPV v nacionalni program cepljenja in *de novo* uvedba presejanja s testiranjem na HPV v podaljšanih časovnih intervalih.

Zaradi odmevnosti regionalne HPV-monografije smo bili povabljeni k pisanju dveh preglednih člankov in sicer o bre-menu in preprečevanju raka materničnega vratu v Evropi ter cepljenju proti HPV (32, 33). Ugotovili smo, da kljub stabilnemu trendu incidence rak materničnega vratu ostaja pomemben javnozdravstveni problem v celi Evropi. Incidenčne stopnje se med evropskimi regijami pomembno razlikujejo in so najnižje v Zahodni Evro-

pi, kjer so preventivni programi bistveno bolj razviti, medtem ko so incidenčne in umrljivostne stopnje v Vzhodni in Srednji Evropi bistveno višje in so tesno povezane z intenzivnostjo organiziranega presejanja (32). V evropskih državah z visoko precepljenostjo tarčne populacije s cepivom proti HPV se že kažejo prvi učinki v obliki zmanjšanja prevalece tarčnih genotipov HPV in tudi bolezni, povezanih z okužbo s HPV (33).

ČLOVEŠKI PAPILOMAVIRUSI IN BENIGNI IN MALIGNI TUMORJI V ANOGENITALNEM PODROČJU

Profilaktično štirivalentno cepivo, ki ščiti pred okužbo z genotipi HPV-6, HPV-11, HPV-16 in HPV-18, se je v svetu že izkazalo za učinkovito pri nadzoru širjenja okužb in bolezni, povezanih s tarčnimi genotipi. Štirivalentno cepivo HPV je bilo v Sloveniji uvedeno brez predhodnih zanesljivih podatkov o prevalenci HPV in razporeditvi genotipov HPV v malignih in benignih tumorjih (razen pri raku materničnega vratu) pred uvedbo cepljenja, na podlagi katerih bi lahko ocenili učinek cepljenja s štirivalentnim cepivom.

V raziskavi, opravljeni na 422 histološko potrjenih tkivnih vzorcih anogenitalnih bradavic, odvzetih 315 imunokompetentnim bolnikom obeh spolov, smo DNA HPV dokazali pri 306 izmed 315 (97,1 %) bolnikov z anogenitalnimi bradavicami, od tega sta bila HPV-6 in/ali HPV-11 prisotna pri 92,4 % bolnikov, kar nakazuje, da bi nastanek večine teh tumorjev lahko preprečili s profilaktičnim štirivalentnim HPV cepivom. Prevalenca HPV-6 se v anogenitalnih bradavicah med spoloma statistično ni razlikovala, nasprotno je bil HPV-11 trikrat pogostejši pri moških z anogenitalnimi bradavicami. Več bradavic sočasno prisotnih na različnih anatomskih mestih smo našli pri 90 izmed 315 (29 %) bolnikov z anogenitalnimi bradavicami. Pri vseh 90 bolnikih smo v vseh

bradavicah posameznega bolnika dokazali prisotnost istega genotipa HPV (34).

V raziskavi, ki je sledila, smo na 45 izolatih HPV-6, osamljenih iz svežih tkivnih vzorcev anogenitalnih bradavic, odvzetih 18 naključno izbranim bolnikom s HPV-6 povzročeni sočasni bradavicami, s sekvenčno analizo štirih genomskih področij HPV-6 (L1, E5a, E5b in LCR) dodatno potrdili našo domnevo, da je nastanek multiplih bradavic pri posameznem bolniku posledica okužbe z eno samo genomsko različico HPV-6 in ne posledica okužbe z več različicami istega genotipa (35).

V mednarodni raziskavi, ki je vključevala tkivne vzorce iz 24 držav, in v kateri je sodeloval tudi naš laboratorij, smo med 43 histološko potrjenimi intraepitelijskimi neoplazijami zadnjika stopnje 2 in 3 (angl. *anal intraepithelial neoplasia*, AIN) dokazali prisotnost HPV v 95,3 % ter med 496 vzorcov raka zadnjika v 88,3 %. Najbolj pogosto zaznan genotip HPV, tako v AIN 2 oziroma AIN 3 kot v raku zadnjika je bil HPV-16, ki je bil dokazan v 75,4 % in 80,7 % vzorcev, v invazivnim raku zadnjika mu je sledil HPV-18 (3,6 %). V podzorcju 116 rakov zadnjika smo dokazali tudi povečano izražanje p16^{INK4A} v 95 % vseh HPV pozitivnih rakov, kar kaže na zelo podobno patogenetsko povezavo med okužbo s HPV in rakom zadnjika kot z rakom materničnega vratu (36).

V raziskavi, objavljeni leta 2011, v katero je bilo vključenih 21 vzorcev raka zadnjika, odvzetih istemu številu bolnikov iz Slovenije, smo prisotnost HPV DNA dokazali v vseh 21 preiskanih vzorcih. Pričakovano je bil najpogosteje najden genotip HPV-16 (v 19 izmed 21 vzorcev) (37).

V Sloveniji mikroinvazivni SCC predstavlja pomemben delež novoodkritih rakov materničnega vratu. V nedavno objavljeni raziskavi so želeli ugotoviti zanesljivost histopatološke ocene mikroinvazivnega SCC pri bolnicah, diagnosticira-

nih v naši državi v obdobju let od 2001 do 2007. Za ponoven histopatološki pregled je bilo primernih 250 primarnih biopsij, od tega je bilo 73,6 % ponovno ocenjenih kot mikroinvazivni SCC z izrazito prevladujočim FIGO-stadijem IA1 in velikim deležem zgodnje stromalne invazije znotraj tega stadija. Avtorji so zaključili, da je ponovni pregled biopsij pokazal znaten delež precenjenih diagnoz, najpogostejša histopatološka sprememba v precenjenih vzorcih pa je bil obsežen CIN 3 z vraščanjem v kripte endocervikalnih žlez (38).

Vpliv HPV na lastnosti semenske tekočine pri neplodni populaciji še ni dokončno opredeljen. V nedavni raziskavi smo želeli določiti prevalenco HPV v parnih vzorcih: brisih zunanega spolovila in vzorcih semenske tekočine, odvzetih 340 slovenskim moškim iz neplodnih parov ter opredeliti ali okužba s HPV vpliva na lastnosti semenske tekočine. Prisotnost HPV DNA je bila dokazana v 37,1 % brisov zunanega spolovila in 13,6 % vzorcev semenske tekočine, z visoko skladnostjo HPV genotipov prisotnih na obeh mestih vzorčenja. Najpogosteje dokazana genotipa v vzorcih zunanega spolovila sta bila HPV-CP6108 in HPV-84, v vzorcih semenske tekočine pa HPV-53 in HPV-CP6108. Prevalenca HPV v semenski tekočini z normalnimi in patološkimi lastnostmi se ni pomembneje razlikovala, prav tako okužba s HPV ni vplivala na kakovost semenske tekočine, zato sklepamo, da okužba s HPV ne vpliva bistveno na zmanjšanje plodnosti moških (39).

ČLOVEŠKI PAPILOMAVIRUSI IN BENIGNI IN MALIGNI TUMORJI GLAVE IN VRATU

Ploščatocelični papilomi grla so najbolj pogosti benigni tumorji grla, za katere je značilno ponavljajoče razraščanje papilomov na mestih, kjer se stikata migetalčni in ploščatocelični epitelij. Čeprav benigne narave, so papilomi grla povezani

z veliko obolevnostjo zaradi pogostih ponovitev, številčnosti papilomov in s progresivnim potekom bolezni, ki vključuje razraščanje papilomov v druge predele dihalne poti, najpogosteje v sapnik in pljuča, ter življenje ogrožajočo zaporo dihalnih poti, ki zahteva veliko operativnih posegov. Predhodne raziskave so pokazale, da je nastanek skoraj vseh papilomov grla vzročno povezan s HPV-6 in HPV-11. V raziskavi, opravljeni leta 2012, v katero smo vključili po podatkih iz literature do takrat največje število tkivnih vzorcev papilomov grla (152 vzorcev istega števila bolnikov), smo HPV-6 in/ali HPV-11 dokazali pri 138 (90,8 %) bolnikih. Razporeditev HPV-6 in HPV-11 se med spoloma ni razlikovala, se je pa HPV-6 statistično pogosteje pojavil v otroški obliki papilomov (78,4 %) v primerjavi z odraslo obliko (53 %) ($p = 0,007$), medtem ko se razporeditev HPV-11 med otroško (21,6 %) in odraslo (31,3 %) obliko statistično ni razlikovala ($p = 0,3$) (34).

V raziskavi izvedeni leto kasneje, smo želeli ugotoviti genetsko raznolikost virusov HPV-6 in HPV-11, ki v Sloveniji povzročajo papilome grla in, ali se ti tekom bolezni oziroma med ponovitvami papilomov genetsko spreminjajo. V raziskavo smo vključili izolate HPV-6 in HPV-11, osamljene iz 195 tkivnih vzorcev papilomov grla, 70 začetnih vzorcev in 125 ponovitev, ki so bili odvzeti pri 70 bolnikih v do 22-letnem obdobju. Z molekularno analizo celotnega virusnega genoma oziroma visoko variabilnih genomskih področij LCR in E5a smo dokazali, da so se pri 95,7 % bolnikih s papilomi grla genomske različice HPV-6 oziroma HPV-11 v vseh ponovitvah papilomov popolnoma ujemale z genomsko različico virusa v začetnem vzorcu papiloma. Rezultati naše raziskave so pokazali, da se HPV-6 in HPV-11 genetsko ne spreminjata oziroma da so pogoste ponovitve papilomov grla najverjetneje posledica dolgotrajne okuž-

be z eno samo virusno različico in ne ponovnih okužb z novimi različicami HPV-6 oziroma HPV-11 (40).

Cepljenje z obstoječim profilaktičnim štirivalentnim oziroma bodočim devtivalentnim cepivom proti HPV, ki ščiti tudi pred okužbo s HPV-6 in HPV-11, naj bi v prihodnosti znatno zmanjšalo incidenco papilomov grla. Za zdravljenje že razvite bolezni se trenutno najpogosteje uporablja mikrokirurška ali laserska odstranitev papilomov. V primeru agresivne oblike bolezni navadno uporabimo še pomožno zdravljenje z različnimi modulatorji imunosti (npr. interferon alfa) in/ali protivirusnimi zdravili kot so indol-3-karbinol, aciklovir, valaciclovir in cidofovir. V nedavno izvedeni raziskavi na skupini bolnikov s težko potekajočo obliko papilomatoze smo potrdili naše predhodne ugotovitve, da ima cepljenje s profilaktičnim štirivalentnim cepivom proti HPV pri teh bolnikih možen terapevtski učinek (41, 42). Namreč, po cepljenju, ki je potekalo po standardni cepilni shemi, se je potek bolezni v opazovanem obdobju 12–52 mesecev pomembno izboljšal pri osmih od 11 bolnikov s težko obliko papilomatoze grla, pri katerih so bila vsa predhodna zdravljenja neuspešna (41).

Sinonazalni invertni papilomom (IP) je redek benigni tumor, ki je lahko združen s SCC (IP/SCC), pri čemer naj bi bila maligna transformacija vsaj pri delu tumorjev povezana z okužbo s HPV, predvsem s HPV-16. V raziskavi, izvedeni leta 2011, smo v prospektivni podatkovni bazi Inštituta za patologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani identificirali 89 bolnikov z IP, med njimi pet bolnikov z IP/SCC. Prisotnost HPV je bila določena z metodo PCR v vseh petih tumorjih, trije izmed njih so bili pozitivni na HPV-11. Štirje bolniki so bili zdravljeni z namenom ozdravitve s kurativno operacijo in pooperativno radioterapijo (trije bolniki), peti bolnik z neoperabilnim tumorjem pa

je bil zdravljen z zmanjševalno operacijo, ki ji je sledilo obsevanje. Lokalna kontrola tumorja je bila dosežena pri treh bolnikih, in sicer 8, 46 in 58 mesecev po operaciji, medtem ko se je bolezen ponovila lokalno pri dveh bolnikih: po endoskopski odstranitvi T1 tumorja (kasneje uspešno zdravljen z dodatno operacijo) in pri bolniku z neoperabilnim tumorjem (43).

Trenutno veljavne smernice WHO za klasifikacijo predrakavih sprememb v ustni votlini in grlu iz leta 2005, niso optimalne, saj temeljijo na treh konceptualno in terminološko različnih modelih točkovanja oziroma opredeljevanja sprememb. Pri načrtovanju primernejše klasifikacije tovrstnih sprememb je potrebno upoštevati različno etiologijo predrakavih sprememb glave in vratu v primerjavi s spremembami materničnega vratu ter posebnosti v tem anatomskem predelu. V skladu s tem smo v članku, objavljenem v prestižni reviji s področja patologije glave in vratu, predlagali štiri ključne korake na osnovi katerih bi lahko postavili novo, enotno klasifikacijo predrakavih oziroma ploščatoceličnih intraepitelijskih sprememb (angl. *squamous intraepithelial lesions*, SIL) ustne votline in grla (44). Predlagani koraki so sledeči:

- Bodoča klasifikacija mora zajemati samo dve stopnji sprememb – spremembe nizke in visoke stopnje ter dodatno stopnjo, karcinom in situ (angl. *carcinoma in-situ*, CIS) za predel grla.
- Terminologija mora biti poenotena. Predlagali smo uporabo izraza SIL namesto izraza ploščatocelična intraepitelijska neoplazija (angl. *squamous intraepithelial neoplasia*, SIN).
- Vsi ključni morfološki kriteriji za opredelitev posamezne spremembe morajo biti jasno definirani.
- Kliniki in patologi se morajo dogovoriti glede najprimernejšega zdravljenja različnih stopenj SIL v različnih predelih glave in vratu.

Podobno kot večino drugih rakov, tudi raka glave in vratu zdravimo s tremi osnovnimi terapevtskimi načini: s kirurgijo, z obsevanjem oziroma radioterapijo in zdravili (kemoterapevtiki, tarčna zdravila). Po podatkih iz literature imajo HPV-pozitivni karcinomi glave in vratu boljše klinično napoved kot HPV-negativni karcinomi, kar se pripisuje boljšemu odzivu na kemoterapijo in radioterapijo. Cilj klinične raziskave, izvedene v letih 2008–2009 in objavljene leta 2014, je bil oceniti lokoregionalno kontrolo in toksičnost indukcijske kemoterapije z docetakselom, cisplatinom ter 5-fluorouracilom (TPF) in sočasne imunokemoradioterapije s cetuximabom (CMB) ter cisplatinom pri neresektabilnem SCC glave in vratu. V raziskavo je bilo vključenih 30 bolnikov z boleznijo stadija IV (56,7 %), med katerimi je bilo 26 (86,7 %) aktivnih kadircev. Trije bolniki (10 %), vsi aktivni kadirci, so imeli HPV-pozitiven tumor ustnega dela žrela, ostali tumorji so bili HPV-negativni. Vse štiri kroge indukcijske kemoterapije je prejelo 25 bolnikov (83,3 %), štirje izmed njih (16 %) so imeli infuzijsko reakcijo na CMB stopnje ≥ 3 , ≥ 6 ali več sočasnih aplikacij cisplatina. CMB je prejelo 13 od 25 (52 %) oziroma 18 od 25 (72 %) bolnikov. Po dveh letih je bila lokoregionalna kontrola, preživetje brez bolezni in celokupno preživetje 47 %, 47 % in 50 %. Izid zdravljenja je bil pri bolnikih s kožno reakcijo na CMB stopnje ≥ 2 ugodnejši ($p < 0,05$) kot pri bolniki brez reakcije ali z blago reakcijo. Zaključili smo, da je v prognostično skrajno neugodni skupini bolnikov z neresektabilnimi tumorji, nizko prevalenco HPV in prevlado aktivnih ali bivših kadircev, testirani režim pokazal spodbudno učinkovitost, pri čemer je kombinacija CMB in nizkodoznega cisplatina po indukciji s TPF povečala toksičnost in potencialno onemogočila aplikacijo enega izmed obeh zdravil (45).

Verukozni karcinom predstavlja redek, dobro izoblikovan histološki podtip SCC,

za katerega je značilno vdiranje v okoliška tkiva in nesposobnost tvorjenja metastaz. Ta vrsta raka se navadno razvije na sluznici ustne votline ali grla, redkeje tudi na koži, v anogenitalnem področju, sečnem mehurju in požiralniku. Medtem ko HPV igra pomembno vlogo pri nastanku dela navadnega SCC glave in vratu, je njegova vloga pri nastanku verukoznega karcinoma sporna, saj se objavljena prevalenca α -PV (do sedaj drugi rodovi niso bili preiskovani) v tem raku giblje med 0 in 100 %. Leta 2013 smo izvedli obsežnejšo raziskavo, v katero smo vključili 30 tkivnih vzorcev verukoznih karcinomov glave in vratu in 30 po anatomski lokaciji usklajenih histološko normalnih tkivnih vzorcev, jim določili stopnjo izražanja celične beljakovine p16 z imunohistokemično metodo, in jih testirali na prisotnost 87 različnih HPV-genotipov iz rodov α -PV, β -PV, *Gammapapillomavirus* (γ -PV) in *Mupapillomavirus* (μ -PV) s pomočjo PCR. β -PV smo dokazali v petih od 30 (16,7 %) primerov raka in v 18 od 30 (60 %) primerov histološko normalnih tkivnih vzorcev, medtem ko HPV iz ostalih rodov nismo dokazali. Izražanje celične beljakovine p16 v 12 od 30 verukoznih karcinomov in dveh od 30 kontrolnih vzorcev je bilo neznačilno za rake, povezane z okužbo s HR-HPV (npr. analnim SCC). Z našo raziskavo smo nedvomno dokazali, da verukozni karcinom glave in vratu ni povezan z okužbo s HPV iz rodov α -PV, γ -PV in μ -PV in da so za njegov nastanek najverjetneje odgovorni drugi dejavniki (46).

Kajenje ter žvečenje tobaka in prekomerno uživanje alkohola so najbolj znani povzročitelji ploščatoceličnega raka požiralnika. V vabljeni pregled literature o vlogi HPV pri nastanku raka požiralnika smo vključili vse raziskave, objavljene med leti 1982 in 2013 ter meta-analizo, objavljeno leta 2012. Skupno smo vključili 159 raziskav, ki so zajemale 11.310 vzorcev raka požiralnika, testiranih na

prisotnost HPV. HPV DNA je bila prisotna v 30,3 % testiranih rakov požiralnika, z majhnimi razlikami v geografski razporeditvi HPV-pozitivnih rakov. HPV-16 in HPV-18 sta bila najpogosteje dokazana genotipa HPV v vzorcih ploščatoceličnega raka požiralnika, tako na območjih z nizko kot tudi na območjih z visoko pojavnostjo raka požiralnika (47).

RAZISKAVE BETAPAPILOMAVIRUSOV

β -PV združuje genotipe HPV, povezane z nastankom predrakavih sprememb in raka kože, predvsem pri imunsko oslabljenih osebah in osebah z redko dedno boleznijo, imenovano bradavičasta epidermodisplazija. Po podatkih novejših raziskav lahko β -PV poleg kože in dlačnih mešičkov okužijo tudi epitel različnih sluznic, vključujoč glavo in vrat, požiralnik in anogenitalni predel. Okužba analnega kanala z α -PV je pogosta pri moških, ki imajo spolne odnose z moškimi in je etiološko tesno povezana z nastankom analnih bradavic, predrakavih sprememb in analnega raka, še posebej pri osebah s človeškim virusom imunske pomanjkljivosti 1 (*angl. Human immunodeficiency virus, HIV-1*). Nasprotno zaenkrat ni znano kakšna je prevalenca analnih okužb z ostalimi HPV-rodovi v populaciji moških, ki imajo spolne odnose z moškimi, in ali so tudi ti virusi povezani z nastankom novotvorb v analnem kanalu. Da bi odgovorili na tovrstna vprašanja, smo nedavno izvedli raziskavo v katero smo vključili 181 analnih brisov (135 začetnih in 46 naknadnih vzorcev), odvzetih 135 slovenskim moškim, ki imajo spolne odnose z moškimi (23 HIV-1-pozitivnih) in jih testirali na prisotnost β -PV DNA. Okužbo z β -PV smo dokazali pri 88 od 135 (65,2 %) osebah, vključenih v raziskavo. Okužbo z več genotipi HPV smo dokazali pri 26 osebah. Skupno smo dokazali 32 različnih genotipov HPV (od tega smo tri opisali prvič), od katerih so bili najbolj

pogosti HPV-36, HPV-38, HPV-23, HPV-24 in HPV-93. Dolgotrajno okužbo z najmanj enim genotipom β -PV v obdobju 7–58 mesecev smo dokazali pri sedmih od 30 (23,3 %) oseb. HIV-1 pozitiven status, promiskuitetno vedenje in uporaba alkilnih nitritov (t.i. »popersov«) so bili dejavniki, ki so bili značilno povezani v višjo prevalenco analne okužbe z β -PV (48).

Novije raziskave nakazujejo, da dlačni mešički predstavljajo pomemben endogeni rezervoar kožnih HPV. V dlačnih mešičkih je pogosto, če ne vedno, prisotnih več β -PV. Ker so v večini raziskav, ki so ugotovljale prevalenco β -PV, uporabili več dlačnih mešičkov združenih v en vzorec, zaenkrat ostaja neznano, kakšna je prevalenca in razporeditev genotipov β -PV v posamezni dlaki oziroma dlačnem mešičku. Z nedavno raziskavo smo poskusili oceniti prispevek posameznega mešička h genotipskemu profilu β -PV v vzorcu z več združenimi dlačnimi mešički. V raziskavo smo vključili 85 vzorcev dlačnih mešičkov obrvi: 64 posameznih in 21 združenih, ki so bili odvzeti 21 imunsko kompetentnim osebam. β -PV smo dokazali v 82 od 84 (97,6 %) vzorcev. Prisotnost β -PV je bila dokazana v vseh 21 vzorcih združenih dlak, od tega je bilo v večini vzorcev (19 od 21; 90,4 %) prisotnih več genotipov (od 1 do 12 genotipov). V posameznih dlakah smo β -PV dokazali v 61 izmed 63 (96,8 %) vzorcev, v veliki večini (68,2 %) je bilo prisotnih več različnih genotipov, povprečno štirje različni genotipi β -PV na dlako. Najpogostejši genotip v dlakah je bil HPV-23, sledila sta genotipa HPV-24 in HPV-38. Primerjava razporeditve β -PV v vzorcih združenih dlačnih mešičkov z razporeditvijo v vsaj enem dlačnem mešičku pri istem posamezniku je pokazala popolno ujemanje števila in vrste genotipov pri petih izmed 20 oseb. Dve od 20 oseb sta imeli v

vzorcju združenih dlačnih mešičkov enako oziroma podobno število vendar različne vrste genotipov HPV kot v posameznem mešičku, pri devetih od 20 oseb smo v vzorcih združenih dlačnih mešičkov dokazali več β -PV kot v večini posameznih dlak in štiri izmed 20 oseb so imele vsaj en dlačni mešiček z več β -PV, kot jih je bilo v pripadajočem vzorcju združenih dlačnih mešičkov. Rezultati so pokazali, da so β -PV neenakomerno razporejeni v obrveh in da celo vzorci, v katerih je združenih več dlačnih mešičkov, ne zagotavljajo popolne informacije o celotnem spektru genotipov HPV prisotnih v obrveh (49).

BAZIČNE RAZISKAVE ČLOVEŠKIH PAPILOMAVIRUSOV

V raziskavi Tlučkove in sodelavcev iz leta 2013 so raziskovalci s Kemijskega inštituta z namenom opredelitve potenciala za tvorjenje struktur štirih gvaninov preučevali z gvaninom-bogata območja nukleotidnega zaporedja vseh do sedaj opredeljenih genotipov HPV. Primerna območja so našli pri 8 genotipih (HPV-3, HPV-9, HPV-25, HPV-32, HPV-42, HPV-52, HPV-57 in HPV-58) in sicer v genomskih območjih LCR, L2, E1 in E4. Na podlagi rezultatov raziskave sklepajo, da strukture štirih gvaninov lahko vplivajo na uravnavanje izražanja virusnih genov HPV (50).

Mala plaščna beljakovina HPV (L2) in transportni kompleksi ESCRT (angl. *Endosomal Sorting Complexes Required for Transport*) sodelujejo pri endocitozi in imajo pomembno vlogo pri poteku okužbe s HPV. V raziskavi Broniarczyka in sodelavcev iz leta 2014, v kateri je sodelovala raziskovalka z Univerze v Novi Gorici, so kot najpomembnejši del ESCRT izpostavili komponento TSG101, ki je potrebna za optimalen potek okužbe s širokim spektrom PV (51).

LITERATURA

1. Poljak M. A review of 20 years of human papillomavirus research in Slovenia. *Acta Dermatovenol Alp Pannonica Adriat.* 2011; 20 (3): 99–112.
2. Botalico D, Chen Z, Kocjan BJ, et al. Characterization of human papillomavirus type 120: a novel betapapillomavirus with tropism for multiple anatomic niches. *J Gen Virol.* 2012; 93 (Pt 8): 1774–9.
3. Kocjan BJ, Hošnjak L, Seme K, et al. Complete genome sequence of a novel human betapapillomavirus HPV-159. *Genome Announc.* 2013; 1 (3): e00298–13.
4. Kocjan BJ, Steyer A, Sagadin M, et al. Novel human papillomavirus type 174 from a cutaneous squamous cell carcinoma. *Genome Announc.* 2013; 1 (4): e00445–13.
5. Kocjan BJ, Hošnjak L, Račnik J, et al. Complete genome sequence of Phodopus sungorus Papillomavirus Type 1 (PsPV1) isolated from a Siberian hamster - a novel member of the Pipapillomavirus genus. *Genome Announc.* 2014; 2 (2): e00311–14.
6. Burk RD, Chen Z, Harari A, et al. Classification and nomenclature system for human alphapapillomavirus variants: General features, nucleotide landmarks and assignment of HPV6 and HPV11 isolates to variant lineages. *Acta Dermatovenol Alp Pannonica Adriat.* 2011; 20 (3): 113–23.
7. Jelen MM, Chen Z, Kocjan BJ, et al. Global genomic diversity of human papillomavirus type 6 (HPV6) based on 724 isolates and 190 complete genome sequences. *J Virol.* 2014; 88 (13): 7307–16.
8. Maver PJ, Kocjan BJ, Seme K, et al. Genomic diversity of low-risk human papillomavirus genotypes HPV 40, HPV 42, HPV 43 and HPV 44. *J Med Virol.* 2014; 86 (2): 272–82.
9. Bogovac Ž, Lunar MM, Kocjan BJ, et al. Prevalence of HPV-16 genomic variant carrying a 63 bp duplicated sequence within the E1 gene in Slovenian women. *Acta Dermatovenol Alp Pannonica Adriat.* 2011; 20 (3): 135–9.
10. Poljak M, Cuzick J, Kocjan BJ, et al. Nucleic acid tests for the detection of alpha human papillomaviruses. *Vaccine.* 2012; 30 Suppl 5: F100–6.
11. Arbyn M, Ronco G, Anttila A, et al. Evidence regarding human papillomavirus testing in secondary prevention of cervical cancer. *Vaccine.* 2012; 30 Suppl 5: F88–99.
12. Bosch FX, Broker TR, Forman D, et al. Comprehensive control of human papillomavirus infections and related diseases. *Vaccine.* 2013; 31 Suppl 8: H1–31.
13. Poljak M, Oštrbenk A. The Abbott High Risk HPV test is a clinically validated human papillomavirus assay for triage in the referral population and use in primary cervical cancer screening in women 30 years and older: a review of validation studies. *Acta Dermatovenol Alp Pannonica Adriat.* 2013; 22 (2): 43–7.
14. Hesselink AT, Meijer CJ, Poljak M, et al. Clinical validation of the Abbott RealTime High Risk (HR) HPV assay according to the guidelines for HPV DNA test requirements for cervical screening. *J Clin Microbiol.* 2013; 51 (7): 2409–10.
15. Jentschke M, Soergel P, Lange V, et al. Evaluation of a new multiplex real time PCR assay for the detection of human papillomavirus infections in a referral population. *Int J Gynecol Cancer.* 2012; 22 (6): 1050–6.
16. Kocjan BJ, Maver PJ, Hošnjak L, et al. Comparative evaluation of the Abbott RealTime High Risk HPV test and INNO-LiPA HPV Genotyping Extra test for detecting and identifying human papillomaviruses in archival tissue specimens of head and neck cancers. *Acta Dermatovenol Alp Pannonica Adriat.* 2012; 21 (4): 73–5.
17. Oštrbenk A, Kocjan BJ, Poljak M. Specificity of the Linear Array HPV Genotyping Test for detecting human papillomavirus genotype 52 (HPV-52). *Acta Dermatovenol Alp Pannonica Adriat.* 2014; 23 (3): 53–6.
18. Učakar V, Poljak M, Klavs I. Pre-vaccination prevalence and distribution of high-risk human papillomavirus (HPV) types in Slovenian women: a cervical cancer screening based study. *Vaccine.* 2012; 30 (2): 116–20.
19. Učakar V, Poljak M, Oštrbenk A, et al. Pre-vaccination prevalence of infections with 25 non-high-risk human papillomavirus (HPV) types among 1000 Slovenian women in cervical cancer screening. *J Med Virol.* 2014; 86 (10): 1772–9.
20. Učakar V, Jelen MM, Faust H, et al. Pre-vaccination seroprevalence of 15 human papillomavirus (HPV) types among women in the population-based Slovenian cervical screening program. *Vaccine.* 2013; 31 (43): 4935–9.
21. Faust H, Jelen MM, Poljak M, et al. Serum antibodies to human papillomaviruses (HPV) pseudovirions correlate with natural infection for 13 genital HPV types. *J Clin Virol.* 2013; 56 (4): 336–41.
22. Jančar N, Vrtačnik Bokal E, Poljak M, et al. High-risk human papillomavirus (HPV) infection in women undergoing in vitro fertilization. *Zdrav Var.* 2013; 52 (3): 157–61.
23. Poljak M, Rogovskaya SI, Kesić V, et al. Recommendations for cervical cancer prevention in Central and Eastern Europe and Central Asia. *Vaccine.* 2013; 31 Suppl 7: H80–2.
24. Poljak M, Seme K, Maver PJ, et al. Human papillomavirus prevalence and type-distribution, cervical cancer screening practices and current status of vaccination implementation in Central and Eastern Europe. *Vaccine.* 2013; 31 Suppl 7: H59–70.

25. Rogovskaya SI, Shabalova IP, Mikheeva IV, et al. Human papillomavirus prevalence and type-distribution, cervical cancer screening practices and current status of vaccination implementation in Russian Federation, the Western countries of the former Soviet Union, Caucasus region and Central Asia. *Vaccine*. 2013; 31 Suppl 7: H46–58.
26. Bray F, Lortet-Tieulent J, Znaor A, et al. Patterns and trends in human papillomavirus-related diseases in Central and Eastern Europe and Central Asia. *Vaccine*. 2013; 31 Suppl 7: H32–45.
27. Vīberga I, Poljak M. Cervical cancer screening in Latvia: A brief history and recent improvements (2009–2011). *Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat*. 2013; 22 (1): 27–30.
28. Seme K, Maver PJ, Korać T, et al. Current status of human papillomavirus vaccination implementation in central and eastern Europe. *Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat*. 2013; 22 (1): 21–5.
29. Maver PJ, Seme K, Korać T, et al. Cervical cancer screening practices in central and eastern Europe in 2012. *Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat*. 2013; 22 (1): 7–19.
30. Škamperle M, Kocjan BJ, Maver PJ, et al. Human papillomavirus (HPV) prevalence and HPV type distribution in cervical, vulvar, and anal cancers in central and Eastern Europe. *Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat*. 2013; 22 (1): 1–5.
31. Znaor A, van den Hurk C, Primić-Zakelj M, et al. Cancer incidence and mortality patterns in South Eastern Europe in the last decade: gaps persist compared with the rest of Europe. *Eur J Cancer*. 2013; 49 (7): 1683–91.
32. Kesic V, Poljak M, Rogovskaya S. Cervical cancer burden and prevention activities in Europe. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2012; 21 (9): 1423–33.
33. Poljak M. Prophylactic human papillomavirus (HPV) vaccination and primary prevention of cervical cancer: issues and challenges. *Clin Microbiol Infect*. 2012; 18 Suppl 5: 64–9.
34. Komloš KF, Kocjan BJ, Košorok P, et al. Tumour-specific and gender-specific pre-vaccination distribution of human papillomavirus types 6 and 11 in anogenital warts and laryngeal papillomas: A study on 574 tissue specimens. *J Med Virol*. 2012; 84 (8): 1233–41.
35. Fujs Komloš K, Košorok P, Kocjan BJ, et al. Genetic diversity of HPV-6 in concurrent multiple anogenital warts. *Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat*. 2013; 22 (1): 31–3.
36. Alemany L, Saunier M, Alvarado I, et al. HPV DNA prevalence and type distribution in anal carcinomas worldwide. *Int J Cancer*. V tisku 2014.
37. Komloš KF, Kocjan BJ, Košorok P, et al. Distribution of HPV genotypes in Slovenian patients with anal carcinoma: preliminary results. *Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat*. 2011; 20 (3): 141–3.
38. Gutnik H, Matisic JP, Zakelj MP, et al. Microinvasive cervical squamous cell carcinoma in Slovenia during the period 2001–2007. *Radiol Oncol*. 2014; 48 (3): 282–8.
39. Golob B, Poljak M, Verdenik I, et al. High HPV infection prevalence in men from infertile couples and lack of relationship between seminal HPV infection and sperm quality. *BioMed Res Int*. 2014; 2014: 956901.
40. Kocjan BJ, Gale N, Hočvar-Boltežar I, et al. Identical human papillomavirus (HPV) genomic variants persist in recurrent respiratory papillomatosis for up to 22 years. *J Infect Dis*. 2013; 207 (4): 583–7.
41. Hočvar-Boltežar I, Matičič M, Šereg-Bahar M, et al. Human papilloma virus vaccination in patients with an aggressive course of recurrent respiratory papillomatosis. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. V tisku 2014.
42. Boltežar IH, Bahar MS, Žargi M, et al. Adjuvant therapy of laryngeal papillomatosis. *Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat*. 2011; 20 (3): 175–80.
43. But-Hadžic J, Jenko K, Poljak M, et al. Sinonasal inverted papilloma associated with squamous cell carcinoma. *Radiol Oncol*. 2011; 45 (4): 267–72.
44. Gale N, Zidar N, Poljak M, et al. Current views and perspectives on classification of squamous intraepithelial lesions of the head and neck. *Head Neck Pathol*. 2014; 8 (1): 16–23.
45. Strojjan P, Kuhar CG, Žumer B, et al. TPF induction chemotherapy and concomitant irradiation with cisplatin and cetuximab in unresectable squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head Neck*. 2014; 36 (11): 1555–61.
46. Odar K, Kocjan BJ, Hošnjak L, et al. Verrucous carcinoma of the head and neck - not a human papillomavirus-related tumour? *J Cell Mol Med*. 2014; 18 (4): 635–45.
47. Poljak M, Kocjan BJ, Hošnjak L. Role of human papillomaviruses in esophageal carcinoma: an updated systematic review from 1982 to 2013. *Future Virol*. 2014; 9 (1): 69–86.
48. Mlakar B, Kocjan BJ, Hošnjak L, et al. Betapapillomaviruses in the anal canal of HIV positive and HIV negative men who have sex with men. *J Clin Virol*. 2014; 61 (2): 237–41.
49. Komloš KF, Kocjan BJ, Šterbenc A, et al. Genomic distribution of beta papillomaviruses in single eyebrow hair samples and pools of eyebrow hair samples. *Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat*. 2011; 20 (3): 155–60.
50. Tlučková K, Marušič M, Tóthová P, et al. Human papillomavirus G-quadruplexes. *Biochemistry*. 2013; 52 (41): 7207–16.
51. Broniarczyk J, Bergant M, Goździcka-Józefiak A, et al. Human papillomavirus infection requires the TSG101 component of the ESCRT machinery. *Virology*. 2014; 460–461: 83–90.

Boštjan J. Kocjan¹, Mario Poljak²

Odkrivanje in opredeljevanje novih papilomavirusov in pregled v Sloveniji odkritih genotipov človeških papilomavirusov

Identification and Characterisation of Novel Papillomaviruses in Slovenia

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: papilomavirusi, človeški papilomavirusi, HPV, genotipi, Slovenija

Papilomavirusi (PV) so genetsko izredno raznolika skupina majhnih DNA virusov, ki so etiološko povezani z nastankom številnih benignih in malignih sprememb kože in sluznic pri ljudeh in živalih. Glede na skladnost nukleotidnih zaporedij PV razvrščamo v rodove, vrste in genotipe. PV genotipe, ki so pomembni v humani medicini, imenujemo človeški papilomavirusi (HPV). Za zdaj je bilo v celoti opredeljenih 339 genotipov PV pri 67 različnih živalskih vrstah, od tega 195 pri ljudeh, čeprav naj bi bilo po zadnjih ocenah njihovo število precej višje. Večina klinično pomembnih genotipov HPV je bila odkritih že v obdobju od konca 70-ih do sredine 90-ih let prejšnjega stoletja z uporabo metode direktnega kloniranja virusnega genoma. Nedavni napredek molekularnih tehnik je omogočil odkrivanje novih genotipov HPV, ki so v kužninah praviloma prisotni v nizkih koncentracijah oz. predstavljajo t. i. komenzalne viruse, katerih kliničen pomen za nastanek s HPV povezanih novotvorb za zdaj ni jasen. V tem pregledu bomo predstavili tako tehnike, ki so jih raziskovalci v preteklosti najpogosteje uporabljali za odkrivanje novih PV, kot tudi tiste, ki se uporabljajo danes. Predstavili bomo tudi krajši pregled desetih PV genotipov: HPV-120, HPV-125, HPV-150, HPV-151, HPV-159, HPV-174, HPV-179, HPV-184, HPV-199 in PsuPV1, ki so bili pred kratkim odkriti in opredeljeni v Sloveniji.

ABSTRACT

KEY WORDS: papillomaviruses, human papillomaviruses, HPV, genotypes, Slovenia

Papillomaviruses (PV) are remarkably heterogeneous DNA viruses that infect a wide variety of vertebrate species and are causally involved in the etiology of various neoplastic changes of the skin and mucosa. On the basis of nucleotide similarity, PVs are classified into genera, species and genotypes. At present, over 339 PV genotypes from

¹ Znan. sod. dr. Boštjan J. Kocjan, univ. dipl. mikr., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

² Prof. dr. Mario Poljak, dr. med., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana; mario.poljak@mf.uni-lj.si

67 different animal species have been completely characterized and officially recognized, of which 195 genotypes, termed as human papillomaviruses (HPV), have been detected in humans. However, according to the latest estimate, the number of PV genotypes could be substantially higher. The majority of clinically relevant HPV genotypes have already been discovered 15–40 years ago with the method of direct cloning of the viral genome. Recent advances in molecular techniques have allowed the discovery of a number of novel HPVs mainly present in clinical samples in minute quantities and showing commensal nature without apparent clinical significance. In this review, we focus on the methods that have been historically most frequently used to detect novel PV genotypes as well as on those used today. In addition, we present a short overview of ten PV genotypes: HPV-120, HPV-125, HPV-150, HPV-151, HPV-159, HPV-174, HPV-179, HPV-184, HPV-199 and PsuPV1, which have been recently discovered and characterized in Slovenia.

PAPILOMAVIRUSI IN NJHOVO RAZVRŠČANJE

Virusi iz družine *Papillomaviridae* ali papilomavirusi (PV) so velika in raznolika skupina majhnih virusov s krožno dvojnovažno DNA velikosti 7,5–8 kbp, ki so etiološko povezani z nastankom različnih benignih in malignih sprememb kože in sluznic pri ljudeh in živalih. Virusni genom je sestavljen iz nekodirajočih in kodirajočih področij, ki jih sestavlja do 10 odprtih bralnih okvirjev (angl. *open reading frame*, ORF). Kodirajoča področja delimo na zgodnje področje E (angl. *early*) in pozno področje L (angl. *late*). Večina do sedaj opredeljenih PV ima najmanj šest različnih genov E: E1, E2, E4, E5, E6 in E7, katerih beljakovinski pridelki so odgovorni za podvajanje in prepisovanje virusnega genoma ter proliferacijo in transformacijo okuženih celic. Področje L vsebuje zapisa za veliko (L1) in malo (L2) plaščno beljakovino oz. strukturni beljakovini virusne kapside. Nekodirajoče področje LCR (angl. *long control region*) se nahaja med genom L1 in E6 in vsebuje zaporedja DNA, pomembna za uravnavanje podvajanja in prepisovanja virusnega genoma (1).

Na podlagi skladnosti nukleotidnega zaporedja gena L1 PV taksonomsko uvrščamo v rodove, vrste in genotipe. Ge-

notipi predstavljajo najpomembnejši taksonomski nivo razvrščanja PV, saj so genotipi virusa etiološko povezani z nastankom različnih bolezni. PV najdemo pri večini sesalcev in ptičev ter nekaterih ribah in plazilcih, kot so kače in želve. Nekateri, predvsem evolucijsko nižje razviti sesalci, imajo samo en za vrsto značilen genotip, medtem ko je raznolikost PV pri opicah in ljudeh mnogo večja. Skupino genotipov PV, ki so pomembni v humani medicini, imenujemo človeški papilomavirusi (angl. *human papillomaviruses*, HPV) (2, 3).

Kot novi genotip PV opredelimo vsak izolat virusa, katerega nukleotidno zaporedje gena L1 se razlikuje za več kot 10 % od gena L1 vseh predhodno opredeljenih oz. uradno priznanih genotipov PV. V primeru ko je neskladnost med dvema zaporedjema gena L1 2–10 %, je to virusni podtip. Če je razlika manjša od 2 %, novi virus opredelimo kot podtipsko (genetsko) različico enakega genotipa PV. Do četke septembra 2014 je bilo popolnoma opredeljenih 339 genotipov PV, ki jih razvrščamo v najmanj 37 rodov (določeni genotipi še niso rodovno opredeljeni), od katerih jih je 23 označenih z grškimi črkami alfa–omega (α – ω). Ker je število novoodkritih virusov presegló število črk v grški abecedi, od leta 2010 preostale PV-rodov-

ve označujemo z grškimi črkami, ki imajo dodano predpono *dyo*. Skladnost nukleotidnih zaporedij v celotnem genu L1 je med različnimi rodovi PV manjša kot 60 %. Virusne vrste znotraj posameznega rodu izkazujejo 60–70 % nukleotidno skladnost v genu L1, medtem ko genotipi znotraj posamezne vrste izkazujejo 71–89 % nukleotidno skladnost v genu L1 (3).

Vse do sedaj znane genotipe HPV uvrščamo v pet PV-rodov: *Alphapapillomavirus* (α -PV), *Betapapillomavirus* (β -PV), *Gammapapillomavirus* (γ -PV), *Mupapillomavirus* (μ -PV) in *Nupapillomavirus* (ν -PV). V rodova α -PV in β -PV, poleg HPV, uvrščamo tudi nekatere PV, ki so bili osamljeni pri različnih vrstah opic. Posamezni rodovi HPV izkazujejo dokaj značilen tropizem za določeno vrsto epitela. Tako α -PV najpogosteje okužijo različne sluznice anogenitalnega področja in glave in vratu, β -PV in γ -PV najdemo tako v koži kot tudi v različnih sluznicah, medtem ko najdemo μ -PV in ν -PV izključno v vzorcih kože oz. dlačnih mešičkih (1, 3). Za večino genotipov HPV, uvrščenih v isto vrsto, velja, da imajo podoben tropizem za določena tkiva in/ali organe, lahko pa se razlikujejo po tumorogenem potencialu. Tako je npr. visoko rizični HPV-16 iz vrste α 9, kamor spadajo še genotipi HPV-31, HPV-33, HPV-35, HPV-52, HPV-58 in HPV-67, daleč najbolj patogen HPV, ki je na svetovni ravni odgovoren za nastanek približno 60 % vseh primerov raka materničnega vratu in večinski delež ostalih s HPV povezanih rakov (1, 3).

REFERENČNI CENTRI ZA PAPILOMAVIRUSE

Odkrivanje novih genotipov HPV spremljajo v Mednarodnem referenčnem centru za HPV (angl. *International Human Papillomavirus Reference Center*) na Karolinskem inštitutu (se. *Karolinska Institutet*) v Stockholmu na Švedskem, kjer tudi določajo zaporedne številke novo opre-

deljenih genotipov in jih redno objavljajo na svoji spletni strani. Genotipi HPV so tradicionalno oštevilčeni popolnoma naključno, glede na vrstni red osamitve in ne glede na biološke lastnosti virusov ali njihovo genetsko podobnost. Genotip HPV-16 tako na primer predstavlja šestnajsti po vrsti odkriti genotip HPV. Za opredelitev in uradno priznanje novega genotipa je potrebno celotni genom izolata HPV (lahko tudi po delih) vklonirati v plazmidne vektorje in mu določiti nukleotidno zaporedje oz. za PV značilna genomska področja. Plazmidni klon s celotnim genomom novega HPV predstavlja preprost način preverbe in trajnega shranjevanja referenčnega nukleotidnega zaporedja, tako da njegova pridobitev ostaja temeljni pogoj za uradno priznanje vsakega novega genotipa HPV (3, 4). Po podatkih Referenčnega centra za HPV je bilo do konca septembra 2014 uradno opredeljenih 195 različnih genotipov HPV, označenih od HPV-1 do HPV-199. Štirje predhodno uradno opredeljeni genotipi, HPV-46, HPV-55, HPV-64 in HPV-79, ne ustrezajo več kriteriju za uvrstitev med genotipe HPV in so zdaj uradno opredeljeni le kot podtipi posameznih genotipov HPV.

Z namenom zagotovitve organizirane in ažurnega vira informacij znanstveni skupnosti, ki se ukvarja z raziskavami na področju PV, je bila nedavno ustanovljena prosto dostopna podatkovna baza PapillomaVirus Episteme (PaVE), ki deluje pod okriljem ameriškega Nacionalnega inštituta za alergije in nalezljive bolezni (angl. *National Institute of Allergy and Infectious Diseases*). Baza PaVE, poleg seznama uradno priznanih genotipov HPV, ki se črpa s spletne strani Referenčnega centra za HPV, obsega tudi seznam celotnih genomov HPV (trenutno je takih 14), ki so bili pridobljeni samo s pomočjo tehnike globokega sekveniranja (angl. *deep sequencing, next generation sequencing, NGS*) oz. niso vodeni v uradnem sezna-

mu HPV centra. Poleg tega predstavlja ta baza trenutno najbolj zanesljivo in ažurno zbirko vseh do sedaj opredeljenih živalskih PV. Odkrivanje in potrjevanje novih živalskih PV naj bi sicer spremljali v Referenčnem centru za živalske papilomaviruse (angl. *Animal Papillomavirus Reference Center*) v New Yorku (ZDA), ustanovljenem leta 2010, vendar center še vedno ni zaživel. Po dogovoru iz leta 2010 naj bi bil vsak novi genotip živalskih PV označen s kratico rodu in vrsto živali, pri kateri je bil osamljen, ter z zaporedno številko osamitve (npr. kratici FdPV1 in FdPV2 označujeta PV, odkrita pri domači mački – *Felis domesticus*) (4). Po podatkih zadnjega preglednega članka je bilo do maja 2013 odkritih oz. popolnoma opredeljenih 112 živalskih PV pri 54 različnih živalskih vrstah (2). Po zadnjih podatkih baze PaVe je trenutno znanih 130 živalskih PV, ki okužujejo 66 različnih živalskih vrst.

ODKRIVANJE IN OPREDELJEVANJE PAPILOMAVIRUSOV

V preteklosti so genomska zaporedja novih genotipov HPV pridobivali iz različnih epitelnih sprememb kože in sluznic (npr. anogenitalne/kožne bradavice, papilomi grla in rak materničnega vratu) z uporabo direktnega kloniranja virusnih genomov v različne plazmidne vektorje, kar je bilo mogoče le pri tistih genotipih, ki so bili v kliničnih vzorcih prisotni v zelo visokih koncentracijah. Večina klinično pomembnih genotipov HPV, kot so npr. HPV-2, HPV-5, HPV-8, HPV-27, HPV-6, HPV-11, HPV-16 in HPV-18, je bila tako odkritih že v obdobju od konca 70-ih do sredine 90-ih let prejšnjega stoletja (3, 5).

Uporaba sodobnih molekularnih metod, ki so načeloma bolj občutljive, saj temeljijo na predhodnem pomnoževanju virusnega genoma, je predvsem v zadnjih nekaj letih pripeljala do odkritja in opredeljevanja številnih novih PV. Ti so v kliničnih vzorcih praviloma prisotni v zelo

nizkih koncentracijah in predstavljajo t. i. komenzalne viruse, ki najverjetneje nimajo nobenega ali zanemarljiv klinični pomen (3). Večino takih virusov predstavljajo β -PV, ki jih najdemo tako v zdravi kot tudi v rakavo spremenjeni koži, zaradi česar je opredeljevanje njihove vloge pri nastanku kožnega raka zelo težavno. Nedavno je bilo na podlagi filogenetskih primerjav vseh dostopnih nukleotidnih zaporedij HPV, pridobljenih večinoma z verižno reakcijo s polimerazo (angl. *polymerase chain reaction*, PCR), dokazano, da *in vivo* obstaja še več kot 250 potencialno novih genotipov HPV, ki jih v glavnem uvrščamo med β -PV in γ -PV (6). Nasprotno za nekatere nedavno odkrite α -PV in γ -PV velja, da so ti etiološko povezani s posameznimi primeri kožnih bradavic, predvsem pri osebah z oslabljenim imunskim sistemom (7–10). Ker je virusno breme α -PV in γ -PV v celicah benignih tumorjev tudi do 10^5 -krat višje kot v primeru, da so ti v celicah prisotni v latentni obliki, lahko njihovo vlogo pri nastanku tovrstnih sprememb preučujemo tudi z uporabo kvantitativnega PCR v realnem času (angl. *real-time PCR*, RT-PCR) (8). V nasprotju s HPV pri živalih zaradi doslej relativno zapostavljenega področja odkrivamo vse več tako klinično pomembnih kot tudi komenzalnih PV (2).

Odkritja novih genotipov PV v osnovi pomembno prispevajo k izboljšanju razumevanja genetske raznolikosti teh virusov, posebej pa so taka odkritja pomembna, če lahko dokažemo, da imajo novi genotipi tudi klinični pomen. V takih primerih lahko molekularna opredelitev novih PV pomembno prispeva k izboljšani diagnostiki in obravnavi bolnikov ter odpira nove možnosti za raziskovanje patogeneze PV. Največja pomanjkljivost današnjih raziskav, ki poročajo o odkritju novih genotipov HPV, je predvsem ta, da se te v večini primerov zadovoljijo z bolj ali manj natančno genetsko in filogenetsko oprede-

litvijo novih HPV genomov, ne skušajo pa opredeliti njihovega celičnega oz. tkivnega tropizma in drugih molekularno-bioloških značilnosti, na osnovi katerih bi lahko opredelili njihov pomen za nastanek značilnih boleznih povezanih s HPV (3).

Tradicionalne metode odkrivanja papilomavirusov

Tradicionalne metode dokazovanja HPV (oz. PV) temeljijo na opazovanju značilnih citopatskih sprememb epitelnih celic s svetlobnim mikroskopom, opazovanju virusnih delcev s pomočjo elektronskega mikroskopa in dokazovanju virusnih strukturnih beljakovin z uporabo protiteles z imunohistokemično ali imunofluorescenčno metodo (1, 11, 12). Virusne delce velikosti približno 52 nm, za katere se predvideva, da bi lahko bili HPV, so s pomočjo elektronskega mikroskopa prvič dokazali že leta 1949 v vodni raztopini izvlečka, pridobljenega iz kožne bradavice, odvzete pri otroku. V več neodvisnih raziskavah, izvedenih v obdobju od leta 1953 do 1962, so nato na podoben način HPV podobne delce dokazali v samih tankih tkivnih rezinah kožnih bradavic (11). Nekoliko kasneje so bili z elektronskim mikroskopom HPV dokazani tudi v tkivnih vzorcih anogenitalnih bradavic in papilomov grla (12). Hkrati s prvimi opisi delcev HPV je bilo na osnovi opaženih razlik v incidenci, načinu prenosa, starosti bolnikov in kliničnem poteku bolezni, povezanih s HPV, predpostavljeno, da le-te povzročajo različni »klinični tipi« istega virusa. Slednje predpostavke so bile kmalu potrjene z različnimi serološkimi testi, ki so pokazali, da HPV, prisotni v kožnih in anogenitalnih bradavicah, izkazujejo različne površinske antigene (12). Z začetkom osamitve HPV genomov in njihovo analizo z različnimi restriktivnimi in hibridizacijskimi metodami v 70-ih in 80-ih letih prejšnjega stoletja je postalo nedvomno jasno, da so PV genetsko izjemno ra-

znoliki oz. sestavljeni iz genotipov, ki so značilno povezani z določenimi boleznimi (3, 5, 12). Zaradi premajhne občutljivosti in/ali nezmožnosti določanja virusnega genotipa tradicionalnih metod danes v rutinski diagnostiki okužb s HPV ne uporabljamo več. Nasprotno pa so lahko zaradi svoje univerzalnosti tradicionalne metode še vedno zelo uporabne za odkrivanje novih PV (1).

Neposredno kloniranje virusnega genoma

Neposredno kloniranje PV genoma v plazmidni vektor je ena izmed prvih sodobnejših metod, ki se je uporabljala za odkrivanje, shranjevanje, pomnoževanje in kasneje tudi za določanje nukleotidnega zaporedja genoma novoodkritih PV. Tako shranjena PV-DNA se je uporabljala tudi za opredeljevanja oz. genotipizacijo PV, ki je v začetku temeljila izključno na ugotavljanju podobnosti med PV genomi z uporabo različnih restriktivskih in hibridizacijskih metod, vključujoč tekočinsko hibridizacijo pod strogimi pogoji (angl. *liquid hybridisation under stringent conditions*), hibridizacijo po Southernu (angl. *Southern blot hybridisation*) in/ali hibridizacijo dot-blot (angl. *dot-blot hybridisation*) (3, 5, 12-14).

Izvedba direktnega kloniranja HPV genoma je možna le v primeru, da je ta v klinično izraženi spremembi prisoten v velikih količinah -, taki so npr. α -PV v benignih in malignih anogenitalnih tumorjih. Pri tej metodi iz kliničnega vzorca najprej osamimo virusno DNA, čemur sledi aplikacija različnih restriktivskih encimov, ki krožni genom virusa idealno cepijo na enega ali več manjših delcev, in ločevanje dobljenih DNA delcev z elektroforezo v gelu; virusno DNA lahko režemo v celokupnem DNA ekstraktu ali samo po prehodni osamitvi z ločevalnim centrifugiranjem, ki je na začetku HPV-raziskav potekalo z gradienti cezijevga klo-

rida in etidijevega bromida oz. sukroze in etidijevega bromida. Temu sledi vključitev oz. ligacija virusnega genoma v plazmidni vektor ter transformacija HPV plazmida v kompetentne bakterijske celice, kar omogoča pridobitev večje količine vkloniranih virusnih DNA delcev in določanje njihovega nukleotidnega zaporedja (3, 5, 12–14).

Z direktnim kloniranjem so raziskovalci odkrili večino klinično pomembnih HPV genotipov, ki jih etiološko povežemo z nastankom različnih benignih in malignih sprememb kože in sluznic. To tehniko so uporabljali v času, ko drugih metod ni bilo na voljo, in tudi kasneje v izogib napakam, ki bi jih v nukleotidno zaporedje virusa lahko vnesle prve, še ne dovolj natančne, polimeraze. Zaradi strahu pred potencialnimi napakami v HPV genomu, nastalih z uporabo PCR, so leta 2004 predlagali poimenovanje novih genotipov, opredeljenih s pomočjo PCR, kot kandidatne genotipe HPV (angl. *candidate HPV, candHPV*) (5). Zaradi izjemne natančnosti novodobnih polimeraz in spoznanja, da je metoda PCR nujna za odkrivanje in pomnoževanje celotnih genomov HPV, v najnovejši klasifikaciji PV tako poimenovanje odpravljajo (3, 4). Čeprav direktno kloniranje velja za zlati standard odkrivanja novih HPV, lahko z uporabo restrikcije povzročimo izgubo krajših odsekov virusnega genoma iz referenčnih HPV plazmidnih klonov, kar ima za posledico obstoj nekaterih napak v referenčnih zaporedjih prvih genotipov HPV (3).

Večje število novoodkritih HPV genotipov v zadnjem času je posledica široke uporabe metod, ki jih navajamo v nadaljevanju prispevka. Te vključujejo: PCR v kombinaciji s konceptualno novimi, pogosto rodovno-navzkrižnimi širokospektralnimi oligonukleotidnimi začetniki (angl. *broad range primers*), nove, od nukleotidnega zaporedja neodvisne tehnike pomnoževanja nukleinskih kislin (angl. *whole genome amplification methods*, WGA), in

različne metode hitrega oz. masovnega določanja nukleotidnih zaporedij, vključujoč najsoodobnejšo – globoko sekveniranje.

Kloniranje s pomočjo verižne reakcije s polimerazo

Za odkrivanje novih PV načeloma uporabljamo t. i. konsenzne oz. širokospektralne oligonukleotidne začetnike, ki so izdelani na osnovi poravnanih nukleotidnih ali aminokislinskih zaporedij večjega števila različnih HPV, in s katerimi lahko pomnožimo del genoma že znanih kot tudi možnih novih genotipov HPV. Večina do sedaj znanih konsenznih oligonukleotidnih začetnikov, kot so FAP59/FAP64, E1Gamma-F/E1Gamma-R, CUT, CODEHOP, CPI/CPIg(s) in Ma/Ha, zbirka konsenznih oligonukleotidnih začetnikov CP in CN in ARL1 (E1) (živalski), cilja na najbolj ohranjena dela PV-genoma, to sta gena L1 in E1, ki v krožnem PV-genomu ležita simetrično (15–19). Z uporabo tovrstnih oligonukleotidnih začetnikov navadno pridobimo krajša zaporedja PV genoma (do 700 bp), in če se ta izkažejo za nova, lahko na njihovi osnovi izdelamo tipsko značilne oligonukleotidne začetnike, s katerimi potem pomnožimo celotni virusni genom, bodisi s pomočjo reverznega PCR (angl. *reverse PCR*) ali z metodo prekrivajočih se pridelkov PCR (angl. *overlapping PCR*). Pri metodi reverznega PCR na podlagi poznanega nukleotidnega zaporedja tipsko značilne oligonukleotidne začetnike postavimo enega ob drugega tako, da ti krožni genom HPV pomnožujejo v njegovi celotni dolžini. Pridobljen pridelok PCR nato vstavimo v plazmidni vektor in mu določimo celotno nukleotidno zaporedje, navadno z metodo pomikanja oligonukleotidnih začetnikov (angl. *primer walking*). Metoda prekrivajočih se pridelkov PCR temelji na pripravi dveh ali več pridelkov PCR, katerih konci se prekrivajo, kar zagotavlja pomnožitev celotnega genoma HPV. Pomnoževanje večjih odsekov virusnega

genoma danes izvajamo z uporabo posebnih polimeraz (angl. *long range polymerase*), ki so izjemno temperaturno obstojne, natančne, občutljive oz. robustne. Za povečanje občutljivosti metode PCR za pomnoževanje daljših odsekov HPV genoma lahko uporabimo metodo klasične ugnedene PCR (angl. *nested PCR*) ali njene še bolj občutljive izvedenke (angl. *single tube nested 'hanging droplet' PCR*) (15).

Ugotavljanje novih PV lahko v izbranem kliničnem vzorcu izvedemo tudi z osamitvijo celokupne mRNA na trdnih nosilcih, bogatih z oligonukleotidi dT, in njenim pomnoževanjem z obratno transkripcijo in PCR (angl. *reverse transcription and PCR*). Tako nastale pridelke PCR navadno vkloniramo v plazmidne vektorje, ki jih nato transformiramo v kompetentne bakterijske celice. Z analizo zraslih bakterijskih transformant nato ugotovljamo, ali je med vkloniranimi pridelki PCR tudi tak, ki je podoben PV. Ker je kloniranje relativno zamudno početje, se pri molekularni analizi mRNA amplikonov vse pogosteje poslužujemo tudi tehnike globokega sekveniranja.

Pomnoževanje celotnega genoma papilomavirusa po principu kotalečega se kroga

Od leta 2004 za odkrivanje novih PV zelo pogosto uporabljamo tudi posebno metodo WGA, imenovano »pomnoževanje po principu kotalečega se kroga« (angl. *rolling circle amplification*, RCA), ki temelji na pomnoževanju vseh krožnih molekul DNA s pomočjo bakteriofagne polimeraze phi29 in kratkih (heksamernih) na eksonukleazno aktivnost polimeraze odpornih oligonukleotidnih začetnikov (20). Tovrstno pomnoževanje ni odvisno od nukleotidnega zaporedja DNA in je zelo uporabno za pomnoževanje relativno majhne količine neznanih molekul krožne DNA. Z dodajanjem ali samostojno rabo HPV značilnih oligonukleotidnih začetnikov lahko

reakcijo RCA usmerjamo v bolj specifično pomnoževanje HPV genomov (21).

Pridelki RCA pomnoževanja predstavljajo konkatemerne ponovitve krožnega genoma HPV v količinah, ki omogočajo direktno določanje nukleotidnega zaporedja, nadaljnje pomnoževanje s PCR, analizo oz. HPV-tipizacijo s pomočjo restrikcijskih encimov in direktno kloniranje predhodno razrezanih RCA pridelkov. Ravno široka uporaba metode RCA je v zadnjem času omogočila opredelitev velikega števila novih HPV genotipov, predvsem tistih iz rodov β -PV in γ -PV, pa tudi številnih živalskih PV (3). Pomanjkljivost metode RCA je predvsem ta, da je izredno občutljiva na prisotnost zaviralcev polimeraze in da poleg krožnih genomov pomnožuje tudi ostale fizične oblike DNA (sicer v manjši meri), kar otežuje pomnoževanje oz. odkrivanje krožnih genomov (HPV), če so ti v izbranem vzorcu prisotni v zelo majhnih količinah.

Globoko sekveniranje

Z izrazom globoko sekveniranje označujemo sodobne metode neposrednega določanja nukleotidnega zaporedja, ki omogočajo večkratno vzporedno sekveniranje različnih molekul DNA v zelo kratkem času. Na voljo so številne različice te metode, ki se med seboj v grobem razlikujejo po načinu predpriprave vzorcev oz. izdelavi t. i. DNA knjižnic (angl. *NGS library*), kemiji in tehnologiji sekveniranja ter količini dobljenih sekvenčnih podatkov (22).

Z globokim sekveniranjem lahko analiziramo DNA knjižnice, nastale s fizično fragmentacijo celokupne DNA, metodo PCR ali različnimi od nukleotidnega zaporedja neodvisnimi tehnikami pomnoževanja. Zaradi specifičnih lastnosti lahko s to metodo v izbranem vzorcu dokažemo molekule, katerih koncentracije so izredno majhne oz. lahko te predstavljajo le 1 % celotne populacije. V primeru PV se globoko sekveniranje najpogosteje upo-

rablja za analizo pridelkov PCR, nastalih s širokospektralnimi oligonukleotidnimi začetniki – na ta način se izognemo kloniranju in dolgotrajni analizi bakterijskih transformant –, in za odkrivanje oz. opredeljevanje celotnih HPV-genomov po pomnoževanju celokupne DNA z metodo RCA in/ali kako drugo izotermalno (linearno) metodo (23–25). Za zdaj HPV genomi, pridobljeni samo s tehnologijo globokega sekveniranja, niso priznani s strani Referenčnega centra za HPV (3).

Prednosti globokega sekveniranja pri odkrivanju novih PV so predvsem hitrost, visoka občutljivost in avtomatizacija postopka, pomanjkljivosti pa visoka cena posameznih reakcij ter zahtevna analiza oz. interpretacija sekvenčnih podatkov.

PREGLED SLOVENSКИH PAPILOMAVIRUSOV

V obdobju od 2004 do 2014 je naša raziskovalna skupina odkrila in dokončno opredelila 9 uradno priznanih genotipov HPV in 1 živalski PV, in sicer: HPV-120, HPV-125, HPV-150, HPV-151, HPV-159, HPV-174, HPV-179, HPV-184, HPV-199 in PsuPV1. Poleg tega je delno opredelila 56 kandidatnih izolatov za nove genotipe HPV. Slednji so navadno označeni s kratico SIBX in zaporedno številko potencialno novega genotipa HPV (npr. SIBX1, SIBX2 itd.). Večino novih genotipov HPV, opredeljenih v našem laboratoriju (delno ali v celoti), smo odkrili v kliničnih vzorcih različnih kožnih sprememb, sluznici analnega kanala in dlačnih mešičkih obrvi; večino teh virusov uvrščamo med trenutno najhitreje rastoča PV-rodova: β -PV in γ -PV.

Delna nukleotidna zaporedja novih (H)PV v dolžini 300–400 bp smo odkrili z uporabo PCR in različnih širokospektralnih oligonukleotidnih začetnikov. Temu je sledilo pomnoževanje celotnih virusnih genomov z reverznim PCR ali metodo prekrivajočih se PCR pridelkov, in določanje nukleotidnega zaporedja vklo-

niranih pridelkov PCR z metodo pomikanja oligonukleotidnih začetnikov. Po naših izkušnjah je za pomnoževanje celotnih HPV genomov bolj praktičen reverzni PCR, saj na ta način dobimo samo en pridelek PCR v celotni dolžini virusnega genoma, ki ga je danes relativno enostavno vklonirati. Da bi povišali koncentracijo HPV-DNA pred izvedbo PCR, smo v posameznih primerih celokupno DNA kliničnega vzorca pomnožili oz. obogatili še z metodo RCA. Slednja je bila načeloma uspešnejša v vzorcih z višjo koncentracijo HPV-DNA, to je 100 ali več virusnih kopij na μ l DNA vzorca.

HPV-125 smo kot potencialno nov genotip s prvotno oznako SIBX9 odkrili leta 2004 v kožni bradavici, klinično opredeljeni kot *verruca vulgaris*, odvzeti z roke 19-letnega imunokompetentnega bolnika, dokončno pa je bil opredeljen leta 2011 (8). HPV-125, ki izkazuje organizacijo genoma, značilno za HPV, filogenetsko uvrščamo v rod α -PV oz. vrsto $\alpha 2$, kamor spadajo genotipi-HPV (npr. HPV-3, HPV-10, HPV-117 idr.), ki so etiološko podobno povezani z nastankom benignih sprememb kože. Z uporabo HPV-125 tipsko značilnega kvantitativnega RT-PCR oz. s presejalnim testiranjem reprezentativne zbirke vzorcev benignih in malignih sprememb kože oz. sluznic, ki jih povezujemo s HPV, in vzorcev dlačnih mešičkov, smo dokazali, da je HPV-125 relativno redek HPV s kožnim tropizmom, ki ga etiološko povezujemo z nastankom posameznih primerov navadnih kožnih bradavic (8).

HPV-150 in HPV-151 sta bila kot možna nova genotipa s prvotno oznako SIBX1 oz. SIBX2 odkrita leta 2005 v dlačnih mešičkih obrvi bolnikov z anogenitalnimi bradavicami, dokončno pa sta bila opredeljena leta 2011 kot nova β -PV (17, 26). Na podlagi filogenetskih analiz uvrščamo HPV-150 v vrsto $\beta 5$ (njegov najbližji sorodnik je HPV-96), medtem ko uvrščamo HPV-151 v vrsto $\beta 2$ (njegov najbližji soro-

dnik je HPV-22). S presejalnim testiranjem zbirke tumorjev, ki jih povezujemo s HPV, in vzorcev obrvi smo dokazali, da sta HPV-150 in HPV-151 relativno redka virusa s kožnim tropizmom, ki ju v nizkih koncentracijah najdemo tako v dlačnih mešičkih kot tudi v benignih in malignih spremembah kože, navadno ob prisotnosti več genotipov β -PV. Njun pomen za nastanek kožnih novotvorb za zdaj ni jasen (26).

HPV-120 smo kot možen nov genotip s prvotno oznako SIBX3 odkrili leta 2005 v obrveh bolnika z anogenitalnimi bradavicami (17). Celoten genom HPV-120, ki ga filogenetsko uvrščamo v rod β -PV oz. v vrsto β 2 (njegov najbližji sorodnik je HPV-23), pa je bil nato sočasno opredeljen leta 2012 v brisu analnega kanala bolnika z anogenitalnimi bradavicami s strani naše raziskovalne skupine in v izpirku ustne votline s strani raziskovalcev v ZDA (27). V nadaljevanju skupne raziskave smo ta virus dokazali v večjem številu vzorcev ustne votline, analnega kanala, anogenitalnih bradavic in dlačnih mešičkov obrvi, s čimer smo potrdili njegov dvojni tkivni tropizem. Z molekularno analizo gena L1 smo dokazali številne podtipske različice HPV-120, ki so tvorile genetski liniji, značilni za genotip in podtip (27).

HPV-159 smo kot možen nov genotip s prvotno oznako SIBX8 odkrili leta 2006 v dlačnih mešičkih anogenitalnega področja, dokončno pa smo ga opredelili sedem let kasneje iz brisa analnega kanala bolnika z anogenitalnimi bradavicami (28, 29). HPV-159, ki izkazuje kožno-sluznični tropizem, filogenetsko uvrščamo med β -PV oz. v vrsto β 2, njegov najbližji sorodnik pa je HPV-9. Za zdaj raziskave, ki bi raziskovale njegov klinični pomen, niso bile izvedene (29).

HPV-174 smo odkrili leta 2013 v svežem tkivnem vzorcu ploščatoceličnega karcinoma kože, ki je vseboval še HPV-9 in HPV-150 (30). Tudi ta genotip uvrščamo med β -PV oz. v vrsto β 2, njegov naj-

bližji sorodnik pa je HPV-145. Vloga HPV-174 pri nastanku raka kože za zdaj ostaja nepojasnjena (30).

Nedavno smo v dveh različnih tkivnih vzorcih kožnih bradavic, histološko opredeljenih kot *verruca vulgaris*, odvzetih z lica 64-letnega moškega po transplantaciji ledvic, dokazali prisotnost dveh novih genotipov HPV iz rodu γ -PV, ki so jima v Referenčnem centru za HPV določili zaporedni številki HPV-179 in HPV-184. Medtem ko HPV-179 uvrščamo v vrsto γ 15 (najbližji sorodnik je HPV-135), pa HPV-184 predstavlja čisto novo virusno vrsto (γ 25), kjer je za zdaj njen edini predstavnik. Preliminarni rezultati opredeljevanja kliničnega pomena HPV-179 in HPV-184 kažejo na kožno-sluznični tropizem obeh virusov, ki sta etiološko najverjetneje povezana z nastankom posameznih primerov navadnih kožnih bradavic pri imunsko oslabljenih osebah.

Zadnji novoodkriti HPV-genotip s strani naše raziskovalne skupine je HPV-199, ki smo ga odkrili v brisu nosno-žrelnega prostora. HPV-199 uvrščamo med γ -PV oz. v vrsto γ 12, njegov najbližji sorodnik je HPV-127. Raziskave, ki bi opredeljujejo njegov tkivni tropizem in klinični pomen, so v teku.

Poleg novih HPV smo s sistematično analizo različnih novotvorb domačih in divjih živali nedavno odkrili tudi prvi PV - *Phodopus sungorus* Papillomavirus Type 1 (PsvPV1), katerega naravni gostitelj je sibirski hrček (*Phodopus sungorus*) (31). Novi živalski virus, ki izkazuje vse značilnosti organizacije genoma PV, smo uvrstili v rod *Pipapillomavirus*, kamor trenutno uvrščamo še nekatere PV, ki so bili osamljeni pri različnih glodavcih, vključno s sirijskim hrčkom, različnimi vrstami miši in norveško podgano. PsvPV1 je najbolj soroden *Mesocricetus auratus* Papillomavirus Type 1 (MaPV1), ki je bil osamljen iz ustne votline sirijskega hrčka (*Mesocricetus auratus*) (32).

LITERATURA

1. Kocjan BJ, Poljak M. Papilomavirusi. In: Poljak M, Petrovec M, eds. Medicinska virologija. Ljubljana: Medicinski razgledi; 2011. p. 41–60.
2. Rector A, Van Ranst M. Animal papillomaviruses. *Virology* 2013; 445 (1-2): 213–23.
3. de Villiers EM. Cross-roads in the classification of papillomaviruses. *Virology* 2013; 445 (1-2): 2–10.
4. Bernard HU, Burk RD, Chen Z, et al. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology* 2010; 401 (1): 70–9.
5. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, et al. Classification of papillomaviruses. *Virology* 2004; 324 (1): 17–27.
6. Chouhy D, Bolatti EM, Pérez GR, et al. Analysis of the genetic diversity and phylogenetic relationships of putative human papillomavirus types. *J Gen Virol* 2013; 94 (11): 2480–8.
7. Köhler A, Gottschling M, Förster J, et al. Genomic characterization of a novel human papillomavirus (HPV-117) with a high viral load in a persisting wart. *Virology* 2010; 399 (1): 129–33.
8. Kovanda A, Kocjan BJ, Potočnik M, et al. Characterization of a novel cutaneous human papillomavirus genotype HPV-125. *PLoS One* 2011; 6 (7): e22414.
9. Mitsuishi T, Ohsawa I, Kato T, et al. Molecular cloning and characterisation of a novel type of human papillomavirus 160 isolated from a flat wart of an immunocompetent patient. *PLoS One* 2013; 8 (11): e79592.
10. Silling S, Wieland U, Werner M, et al. Resolution of novel human papillomavirus-induced warts after HPV vaccination. *Emerg Infect Dis* 2014; 20 (1): 142–5.
11. Rowson KE, Mahy BW. Human papova (wart) virus. *Bacteriol Rev* 1967; 31(2): 110–31.
12. Orth G, Favre M, Croissant O. Characterization of a new type of human papillomavirus that causes skin warts. *J Virol* 1977; 24 (1): 108–20.
13. Gissmann L, Diehl V, Schultz-Coulon HJ, et al. Molecular cloning and characterization of human papilloma virus DNA derived from a laryngeal papilloma. *J Virol* 1982; 44 (1): 393–400.
14. Kremsdorf D, Jablonska S, Favre M, et al. Human papillomaviruses associated with epidermodysplasia verruciformis. II. Molecular cloning and biochemical characterization of human papillomavirus 3a, 8, 10, and 12 genomes. *J Virol* 1983; 48 (2): 340–51.
15. Chouhy D, Bolatti EM, Piccirilli G, et al. Identification of human papillomavirus type 156, the prototype of a new human gammapapillomavirus species, by a generic and highly sensitive PCR strategy for long DNA fragments. *J Gen Virol* 2013; 94 (3): 524–33.
16. Staheli JP, Ryan JT, Bruce AG, et al. Consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers (CODEHOPs) for the detection of novel viruses in non-human primates. *Methods* 2009; 49 (1): 32–41.
17. Kocjan BJ, Poljak M, Seme K, et al. Distribution of human papillomavirus genotypes in plucked eyebrow hairs from Slovenian males with genital warts. *Infect Genet Evol* 2005; 5 (3): 255–9.
18. Harwood CA, Spink PJ, Surentheran T, et al. Degenerate and nested PCR: a highly sensitive and specific method for detection of human papillomavirus infection in cutaneous warts. *J Clin Microbiol* 1999; 37 (11): 3545–55.
19. Rector A, Van Doorslaer K, Bertelsen M, et al. Isolation and cloning of the raccoon (*Procyon lotor*) papillomavirus type 1 by using degenerate papillomavirus-specific primers. *J Gen Virol* 2005; 86 (7): 2029–33.
20. Rector A, Tachezy R, Van Ranst M. A sequence-independent strategy for detection and cloning of circular DNA virus genomes by using multiply primed rolling-circle amplification. *J Virol* 2004; 78 (10): 4993–8.
21. Marincevic-Zuniga Y, Gustavsson I, Gyllensten U. Multiply-primed rolling circle amplification of human papillomavirus using sequence-specific primers. *Virology* 2012; 432 (1): 57–62.
22. Bahassi EM, Stambrook PJ. Next-generation sequencing technologies: breaking the sound barrier of human genetics. *Mutagenesis* 2014; 29 (5): 303–31.
23. Bzhalava D, Mühr LS, Lagheden C, et al. Deep sequencing extends the diversity of human papillomaviruses in human skin. *Sci Rep* 2014; 4: 5807.
24. Foulongne V, Sauvage V, Hebert C, et al. Human skin microbiota: high diversity of DNA viruses identified on the human skin by high throughput sequencing. *PLoS One* 2012; 7 (6): e38499.
25. Tse H, Tsang AK, Tsoi HW, et al. Identification of a novel bat papillomavirus by metagenomics. *PLoS One* 2012; 7 (8): e43986.
26. Kovanda A, Kocjan BJ, Luzar B, et al. Characterization of novel cutaneous human papillomavirus genotypes HPV-150 and HPV-151. *PLoS One* 2011; 6 (7): e22529.

27. Bottalico D, Chen Z, Kocjan BJ, et al. Characterization of human papillomavirus type 120: a novel betapapillomavirus with tropism for multiple anatomical niches. *J Gen Virol* 2012; 93 (8): 1774-9.
28. Potočnik M, Kocjan BJ, Seme K, et al. Beta-papillomaviruses in anogenital hairs plucked from healthy individuals. *J Med Virol* 2006; 78 (12): 1673-8.
29. Kocjan BJ, Hosnjak L, Seme K, et al. Complete Genome Sequence of a Novel Human Betapapillomavirus, HPV-159. *Genome Announc* 2013; 1 (3): e00298-13.
30. Kocjan BJ, Steyer A, Sagadin M, et al. Novel human papillomavirus type 174 from a cutaneous squamous cell carcinoma. *Genome Announc* 2013; 1 (4): e00445-13.
31. Kocjan BJ, Hošnjak L, Račnik J, et al. Complete Genome Sequence of Phodopus sungorus Papillomavirus Type 1 (PsPV1), a Novel Member of the Pipapillomavirus Genus, Isolated from a Siberian Hamster. *Genome Announc* 2014; 2 (2): e00311-14.
32. Iwasaki T, Maeda H, Kameyama Y, et al. Presence of a novel hamster oral papillomavirus in dysplastic lesions of hamster lingual mucosa induced by application of dimethylbenzanthracene and excisional wounding: molecular cloning and complete nucleotide sequence. *J Gen Virol* 1997; 78(5): 1087-93.

Nina Jančar¹

Benigne in maligne novotvorbe ženskih spolovil, povezane z okužbo s človeškimi papilomavirusi

Benign and Malignant Lesions of the Female Genital Tract caused by Human Papillomavirus Infection

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: človeški papilomavirus, genitalne bradavice, cervikalna intraepitelijska neoplazija, vaginalna intraepitelijska neoplazija, vulvarna intraepitelijska neoplazija, rak materničnega vratu, rak nožnice, rak vulve

Človeški papilomavirusi povzročajo benigne in maligne spremembe kože in sluznic ženskih spolovil. Po okužbi z nizkorizičnimi genotipi lahko pride do nastanka genitalnih bradavic, cervikalne intraepitelijske neoplazije prve stopnje ter nizkorizičnih displazij nožnice in zunanjega spolovila. Dolgotrajna okužba z visokorizičnimi genotipi lahko vodi v nastanek visokorizičnih displazij materničnega vratu, nožnice in zunanjega spolovila in končno tudi raka materničnega vratu, nožnice in zunanjega spolovila. Vse te spremembe so pogosto asimptomatske, zato imajo pri odkrivanju in pravočasnem zdravljenju velik pomen preventivni ginekološki pregledi in presejalni program za odkrivanje raka materničnega vratu.

ABSTRACT

KEY WORDS: human papillomavirus, genital warts, cervical intraepithelial neoplasia, vaginal intraepithelial neoplasia, vulvar intraepithelial neoplasia, cervical cancer, vaginal cancer, vulvar cancer

Human papillomaviruses cause benign and malignant lesions of female genital tract. Low-risk genotypes can cause genital warts, cervical intraepithelial neoplasia grade 1, and vaginal and vulvar low-grade intraepithelial lesions. An infection with high-risk genotypes causes high-grade cervical, vaginal and vulvar intraepithelial lesions. A persistent infection with high-risk genotypes can cause cervical, vaginal and vulvar cancer. Most manifestations of human papillomavirus infection of female genital organs are asymptomatic, therefore preventive gynecological check-ups and cervical cancer screening program are very important for their diagnosis and early treatment.

¹ Doc. dr. Nina Jančar, dr. med., Klinični oddelek za reprodukcijo, Ginekološka klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Štajmerjeva ulica 3, 1000 Ljubljana; nina.jancar@kclj.si

UVOD

Človeški papilomavirusi (angl. *human papillomavirus*, HPV) povzročajo benigne in maligne novotvorbe kože in sluznic. V prispevku se bom osredotočila na spremembe, ki jih HPV povzročajo na ženskih spolovilih. Etiološko so z nastankom benignih novotvorb, med katerimi so najpogostejše genitalne bradavice, povezani nizkorizični genotipi HPV. Z nastankom malignih novotvorb, med katerimi je najpogostejši rak materničnega vratu (RMV), pa so povezani visokorizični genotipi HPV.

OKUŽBE ŽENSKIH SPOLOVIL S ČLOVEŠKIMI PAPILOMAVIRUSI

Okužbe s HPV so v veliki večini primerov prehodne, s povprečnim trajanjem od 6 do 12 mesecev. Ocenjujejo, da je večina spolno aktivnih žensk vsaj enkrat okužena s HPV. Prenos virusa se običajno zgodi med spolnim odnosom. Večina okužb je brez kliničnih znakov, zato lahko pride do prenosa okužbe, tudi če oseba nima izraženih nobenih znakov za okužbo s HPV. Dejavniki tveganja za okužbo so: zgodnji začetek spolnih odnosov, večje število spolnih partnerjev, uporaba hormonske kontracepcije in nezaščiteni spolni odnosi (brez kondoma) (1).

Pri spolnem odnosu pride do mikroskopsko majhnih poškodb na spolovilih, pri čemer lahko virus prodre skozi razpoko sluznice v globlje predele in povzroča značilne spremembe. Zaradi posledic okužbe s HPV se epiteljske celice ploščatega epitelijskega morfološko spremenijo – imenujemo jih koilociti. Za njih so značilna skrčena, temnejša jedra in obilna citoplazma s svetlejšim pasom okoli jeder. Pri dolgotrajni okužbi z visoko rizičnimi genotipi HPV pride v poteku okužbe do vključitve virusnega genoma v genom gostiteljske celice, do povečanega izražanja virusnih onkogenov in do motenj v delovanju popravnih mehanizmov okuženih celic. Zaradi tega se kopičijo mutacije in celice se lahko ma-

ligno preobrazijo. Posledica tega so hude oblike predrakavih sprememb in rak. Ker je okužba s HPV zelo pogosta, predrakave spremembe in rakava obolenja, ki jih leta povzroča, pa relativno redke, morajo imeti pri nastanku raka pomembno vlogo tudi drugi faktorji, kot so na primer cigaretni dim, obsevanje, UV žarki, kemični agensi in okvarjen imunski odziv (2).

BENIGNE SPREMEMBE ŽENSKIH SPOLOVIL POVEZANE Z OKUŽBO S ČLOVEŠKIMI PAPILOMAVIRUSI

Genitalne bradavice (GB) ali kondilomi (*Condylomata acuminata*) so najpogostejša oblika virusnih spolno prenosljivih okužb. Ocenjujejo, da ima GB približno 1 % spolno aktivne populacije. Najpogostejša povzročiteljica sta nizko rizična genotipa HPV-6 in HPV-11. GB najdemo pri ženskah na zunanjem spolovilu, presredku, perianalno, v nožnici in na materničnem vratu (MV). Inkubacijska doba traja 1–6 mesecev. Največkrat so GB v obliki cvetačastih ali pecljatih sprememb, ki so dvignjene od površine kože ali sluznice in so rožnate do sivo-bele barve. Običajno vznikne več GB hkrati. Na vhodu v nožnico so pogosto v obliki zelo nežnih, rožnatih papilomatoznih sprememb, ki jih pri površnem pregledu ženskega spolovila zlahka spregledamo. Na MV in v nožnici najdemo tako imenovane ploščate kondilome (angl. *flat condyloma*); to so keratotične spremembe, dvignjene od podlage, ki se po aplikaciji očetne kisline obarvajo intenzivno belo. Histološka slika ploščatih kondilomov je zelo podobna histološki sliki cervikalne intraepiteljske neoplazije 1. stopnje.

GB so običajno asimptomatske, nekatere bolnice pa navajajo pekoče občutke ali srbečico. Pri GB v nožnici ali na MV imajo lahko bolnice povečan belkast izcedek iz nožnice. GB lahko spontano izginejo v okoli 30 %, lahko vztrajajo v nespremenjeni obliki več mesecev, lahko

napredujejo v velikosti in številu, lahko pa se ponavljajo tudi po učinkovitem zdravljenju (3).

Diagnoza je običajno klinična, redko je potrebna biopsija. Biopsijo napravimo pri obsežni obliki bolezni, ki hitro napreduje, ali pri ranljivih kondilomatoznih spremembah z razjedami, zato da izključimo maligno neoplazmo, predvsem verukozni karcinom. V primeru ploščatih kondilomov na MV prav tako svetujemo biopsijo in histološko opredelitev, da izključimo cervikalno intraepitelijsko neoplazijo višjih stopenj.

Za zdravljenje GB imamo na voljo lokalno terapijo, ki si jo nanašajo pacientke same, ali tako, ki jo je potrebno nanašati v ambulanti. Pri obsežni obliki bolezni se odločimo za kirurško zdravljenje. Pacientke si lahko same aplicirajo imunomodulator imikvimod v obliki kreme (Aldara®) ali podofilox v obliki raztopine ali gela. Ambulantno zdravimo GB z aplikacijo trikloroacetne kisline, ali podofilina, s krioterapijo z uporabo tekočega dušika ali posebnih kriokirurških tipal in z lasersko vaporizacijo s pomočjo CO₂ laserja. Kirurško GB izrežemo z nožem, laserskimi instrumenti, električnim nožem ali zanko, ali z ekskolekcijo. Uspehi naštetih metod zdravljenja so po podatkih iz literature različni in variabilni tudi znotraj posamezne metode ter se gibljejo med 45–85 %. Stopnja ponovitve je prav tako variabilna, od 15–40 %. Uporaba podofiloxa, podofilina in imikvimoda v nosečnosti je kontraindicirana. Za zdravljenje GB v nosečnosti lahko varno uporabljamo krioterapijo, lasersko vaporizacijo ali lokalno aplikacijo trikloroacetne kisline (4). Zaenkrat nimamo enotnih smernic za zdravljenje GB. Način zdravljenja zato izberemo individualno, pri čemer upoštevamo obsežnost bolezni, dostopnost posameznih načinov zdravljenja in želje bolnic.

Na tem mestu velja omeniti še gigantski kondilom ali Buschke-Löwensteinov

tumor, ki je podvrsta verukoznega karcinoma. To je zelo redek tumor, ki je po podatkih iz literature najpogosteje povezan z okužbo s HPV-6 ali HPV-11 in izjemoma s HPV-16 in HPV-18. Najdemo ga na penisu in perianalno pri moških, pri ženskah pa na vulvi, perineju in perianalno. Za razliko od GB raste ta tumor lokalno invazivno in destruktivno, metastaz običajno ne najdemo, lahko pa so zaradi lokalnega draženja povečane bezgavke prizadetege področja. Diferencialna diagnoza med Buschke-Löwensteinovim tumorjem in GB je pogosto zahtevna tako makroskopsko kot mikroskopsko, zato so pogosto potrebne multiple biopsije. Zdravljenje je kirurško (5).

PREDRAKAVE SPREMEMBE MATERNIČNEGA VRATU

Epitelij MV je sestavljen iz večskladnega ploščatoceličnega epitelijskega epitelija na ektocerviksu in visokoprizmatskega epitelija na endocerviksu. Pri majhnih deklicah je ta meja običajno na zunanji odprtini cervikalnega kanala. Po puberteti se ta meja iz odprtine endocervikalnega kanala premakne distalno na ektocerviks. Ker je ranljiv žlezni epitelij sedaj v stiku s kislim okoljem nožnice, pride do ploščatocelične metaplazije. Predel med prvotno in novo mejo med obema epitelijema se imenuje transformacijska cona. Ker je na njej ves čas prisotna ploščatocelična metaplazija in s tem intenzivna mitotska aktivnost celic, je ta predel najbolj dovzeten za spremembe, ki jo lahko povzročijo HPV. Transformacijska cona je zato najpogostejša lokacija predrakavih sprememb in RMV.

Citološko razdelimo predrakave spremembe ploščatih celic v naslednje skupine: atipične ploščate celice (APC), neopredeljene (APC-N); atipične ploščate celice, pri katerih ni mogoče izključiti ploščatocelične intraepitelijske lezije (PIL) visoke stopnje (APC-VS); PIL nizke stopnje ali blago diskariotične celice (PIL-NS); PIL

visoke stopnje ali zmerno do hudo diskariotične celice (PIL-VS) in ploščatocelični karcinom (P-CA).

Histološko razdelimo predrakave spremembe ploščatih celic v naslednje stopnje: cervikalna intraepitelijska neoplazija 1. stopnje (CIN 1), cervikalna intraepitelijska neoplazija 2. stopnje (CIN 2) in cervikalna intraepitelijska neoplazija 3. stopnje (CIN 3) ter karcinom in situ (CIS).

CIN spremembe se po stopnjah razdelijo glede na to, kolikšen del epitelijskega je spremenjen. Normalni epitelij MV je zgrajen iz sloja bazalnih celic, dveh do treh slojev parabazalnih celic ter vmesnega in povrhnjega celičnega sloja, ki se na površini lušči. Mitoze zasledimo le v bazalnih celicah. Pri CIN 1 tretjino debeline epitelijskega tvorijo diskariotične, bazalne celice podobne celice s patološkimi mitozami. Pri CIN 2 podobne morfološke spremembe opazimo v do dveh tretjinah debeline epitelijskega. CIN 3 je sprememba, pri kateri so diskariotične celice razširjene skoraj po vsej debelini epitelijskega, celice s patološkimi mitozami pa najdemo tudi v zgornjem sloju. Na površini CIN 3 lahko opazimo tanek sloj keratinocitov, ki normalno dozorevajo. Tega dozorevanja pri CIS ne opazimo več. Do 60 % lezij CIN 1 in do 45 % lezij CIN 2 spontano izzveni v nekaj mesecih. Tudi lezije CIN 3 spontano izzvenijo v eni tretjini primerov, vendar jih večina brez ustreznega zdravljenja napreduje do invazivnega karcinoma. Do 30 % lezij CIN 1 napreduje v višje stopnje predrakavih sprememb (6, 7). Povprečen čas, ki je potreben, da iz CIN 1 nastane RMV, naj bi bil 10 let. Vendar pa so opisani primeri, ko je iz predrakave spremembe nastal invaziven RMV v obdobju 18 mesecev ali celo v enem letu.

Spremembe žleznihih celic so v izvidih citoloških brisov razdeljene v naslednje kategorije: atipične žlezne celice, neopredeljene (AŽC-N), atipične žlezne celice, verjetno noplastične (AŽC-VN), endo-

cervikalni adenokarcinom in situ (AIS) in adenokarcinom (A-CA). Spremembe žleznihih celic so zahtevne za obravnavo tako s strani ginekologa-kolposkopista kot tudi s strani citopatologa. Prav zato se incidenca adenokarcinoma MV, kljub učinkovitem presejalnem programu, ne znižuje.

V Sloveniji imamo Smernice za celostno obravnavo žensk s predrakavimi spremembami materničnega vratu, ki so bile zadnjič prenovljene leta 2011 in jih ginekologi s pridom uporabljamo in upoštevamo (8). V njih so opredeljeni postopki pri ženskah z začetno patološkimi brisi, pri ženskah s citološkimi izvidi, ki nakazujejo veliko verjetnost za visoko tvegane displazije (CIN 2 in CIN 3), pri ženskah s histološko potrjenim CIN in postopki za spremljanje žensk po zdravljenju CIN.

Predrakave spremembe materničnega vratu so običajno asimptomatske, zato ima pri odkrivanju le-teh izjemen pomen državni presejalni program za zgodnje odkrivanje RMV (ZORA). Na podlagi patološkega citološkega izvida se odločimo za nadaljnje postopke, ki vključujejo uporabo triažnega testa HPV, kolposkopijo in ciljano biopsijo MV. Pri kolposkopiji tuširamo MV s 3–5 % očetno kislino in jodovo raztopino. Pod povečavo si ogledamo MV in opišemo spremembo barve displastičnega epitelijskega (postane bel po aplikaciji očetne kisline in se ne obarva po aplikaciji jodove raztopine) in žilne fenomene. Na podlagi tega izberemo ustrezno mesto za ciljano biopsijo. Izkušnost kolposkopista in pravilno izbrano mesto biopsije sta ključna za pravilno diagnozo in obravnavo bolnice.

Zaradi visokega odstotka mladih žensk, ki še niso rodile, v populaciji žensk s CIN 1, ravnamo pri takih spremembah bolj konzervativno. Te nizko tvegane displazije spremljamo ali pa zdravimo z destruktivnimi metodami (laserska vaporizacija, krioterapija). Zaradi relativno visokega potenciala visokotveganihih dis-

plazij, CIN 2 in CIN 3 za napredovanje v RMV, ravnamo pri teh spremembah drugače. Te spremembe zdravimo z ekscizivskimi metodami, največkrat z ekscizijo transformacijske cone z veliko električno zanko (angl. *large loop excision of the transformation zone*, LLETZ). Razen v izjemnih primerih se lahko odločimo za natančno spremljanje ali za uporabo destrukcijskih metod (8).

PREDRAKAVE SPREMEMBE NOŽNICE

Podobno kot predrakave spremembe MV, so tudi predrakave spremembe nožnice razdeljene v tri skupine, glede na debelino epitelija, ki je prizadet. Ločimo vaginalno intraepitelijsko neoplazijo 1. stopnje (VAIN 1), vaginalno intraepitelijsko neoplazijo 2. stopnje (VAIN 2) in vaginalno intraepitelijsko neoplazijo 3. stopnje /karcinom in situ (VAIN 3). VAIN 2 in VAIN 3 najdemo po navadi pri ženskah, ki so bile zdravljene zaradi CIN 2 in CIN 3. Povprečna starost žensk z VAIN je okoli 40–60 let (9).

VAIN 1 je sprememba, ki je največkrat posledica okužbe z nizko rizičnimi HPV ali prehodne okužbe z visoko rizičnimi genotipi. Sprememba v večini primerov spontano izzveni, zato jo lahko samo spremljamo.

Za razvoj VAIN 2 in VAIN 3 potrebna dolgotrajna okužba z visoko rizičnimi genotipi HPV (10). Večino VAIN sprememb najdemo v zgornji tretjini nožnice. Spremembe so običajno asimptomatske. Nanje posumimo pri ženskah s CIN 2 in CIN 3, pri ženskah s patološkim citološkim brisom po uspešnem zdravljenju CIN in pri ženskah s patološkim brisom krna nožnice po histerektomiji – predvsem če so bile v preteklosti zdravljene zaradi CIN. Spremembe so lahko na prvi pogled neopazne, lahko opazimo predele belih sprememb ali hiperkeratoze, lahko so dvignjene od podlage in rdečkaste barve. Diagnozo po-

stavimo na podlagi kolposkopije nožnice in ciljane biopsije.

VAIN 2 in VAIN 3 zdravimo s CO₂ laserjem, aplikacijo lokalnih imunomodulatorjev (imikvimod, 5-fluorouracil), kirurško ali z obsevanjem (11). Nema lokrat je kirurško zdravljenje zelo zahtevno, če je lezija obsežna ali če gre za stanje po histerektomiji.

PREDRAKAVE SPREMEMBE VULVE

Incidenca predrakavih sprememb vulve narašča in se pojavlja pri čedalje mlajših ženskah. Predrakave spremembe vulve so bile v preteklosti razdeljene analogno CIN in VAIN na vulvarno intraepitelijsko neoplazijo 1. stopnje (VIN 1), vulvarno intraepitelijsko neoplazijo 2. stopnje (VIN 2) in vulvarno intraepitelijsko neoplazijo 3. stopnje (VIN 3). Ker spremembe, ki so bile v preteklosti imenovane VIN 1, ne napredujejo v displazijo višje stopnje, VIN 1 ni predrakava sprememba in je ni potrebno agresivno zdraviti. Leta 2004 je Sekcija za onkologijo vulve pri Združenju za raziskave bolezni vulve (angl. *Vulvar Oncology Subcommittee of the International Society for the Study of Vulvar Diseases*) predlagala novo terminologijo VIN (12). Spremembe, ki jih histološko vidimo kot koilocitozo, hiperplazijo bazalnih celic s povečano mitotsko aktivnostjo, in so bile prej imenovane VIN 1, sedaj označujemo s kondilomi ali GB vulve. Pod diagnozo VIN pa mislimo le na displazijo visoke stopnje, ki je bila prej imenovana VIN 2 in VIN 3. Po novem VIN razdelimo v dve podskupini: običajni VIN in diferenciran VIN.

Običajni VIN predstavlja okoli 95 % vseh VIN in ga najdemo pri mlajših, predmenopavzalnih ženskah. Ločimo bradavičasti (kondilomatozni), bazaloidni in mešani tip običajnega VIN. Običajni VIN je povezan s HPV okužbo v okoli 90 %. Pogostejši je pri ženskah s CIN 3 in VAIN 3 in pri imunokomprimiranih (13). Običajno so lezije multifokalne in se klinično

manifestirajo zelo različno, zato je za diagnozo potrebna biopsija.

Diferencirani VIN predstavlja do 5 % vseh VIN in ga najdemo pri starejših, pomenopavzalnih ženskah. Ta VIN ni povezan s HPV okužbo, temveč je povezan z lichen sclerosus vulve. Spremembe so običajno omejene na eno mesto. Diferencirani VIN je predrakava sprememba za HPV negativno obliko raka vulve.

V polovici primerov je VIN asimptomatski, običajno pa bolnice navajajo srbečico, opazijo spremembo na spolovilu, redko pekoč občutek, bolečine ali dizurijo. Pri kliničnem pregledu najdemo bradavičaste spremembe, ki so dvignjene od podlage in belkaste barve. Spremembe so lahko roza ali rdeče, sive, ali rjave in v nivoju zdravega epitelija. Diferencialno diagnostično pridejo v poštev: lichen sclerosus, lichen planus, GB, condyloma latum in rak vulve. Diagnozo potrdimo z biopsijo lezije.

Za zdravljenje imamo na voljo kirurško ekscizijo, zdravljenje z laserjem ali zdravljenje s topičnimi imunomodulatorji (imikvimod, 5-fluorouracil). Cilj zdravljenja je, da odstranimo lezijo v celoti in preprečimo napredovanje v rak vulve, ob tem pa ohranimo normalno anatomijo in funkcijo vulve.

RAK MATERNIČNEGA VRATU

Zaradi počasnega razvoja preko več stopenj predrakavih sprememb je RMV eden redkih primerov raka, ki ga lahko preprečimo z učinkovitim presejalnim programom. Redni preventivni pregledi nam omogočijo tudi, da RMV odkrijemo v zgodnjem stadiju, ko je kirurško zdravljenje še zelo uspešno. Zaradi znane virusne etiologije se je z razvojem profilaktičnih cepiv uveljavila nova možnost preprečevanja RMV in ostalih rakavih in predrakavih sprememb, ki jih povzročajo HPV.

Ločimo več histoloških vrst RMV. Najpogostejši so epitelijski tumorji, med katerimi je najpogostejši ploščatocelični

karcinom, ki se pojavlja v 80 do 85 %, sledi mu žlezni karcinom, ki se pojavlja v 15 do 20 %. Ostale histološke vrste so redkejše (14). RMV je tretji najpogostejši ginekološki rak, incidenca v Sloveniji je po podatkih Registra raka za Slovenijo zadnjih nekaj let okoli 12/100.000 žensk.

Ploščatocelični karcinom, žlezni karcinom in žlezno-ploščatocelični karcinom so povezani z dolgotrajno okužbo z visokorizičnimi genotipi HPV (15). Pred leti smo izvedli raziskavo, s katero smo opredelili zastopanost visokorizičnih genotipov HPV pri bolnicah z RMV v Sloveniji. Analizirali smo 284 vzorcev in HPV našli v 94,2 % vzorcev. Genotipi HPV so si sledili v naslednjem vrstnem redu po padajoči pogostnosti: HPV-16, HPV-18, HPV-33, HPV-45, HPV-31, HPV-51, HPV-58, HPV-59, HPV-35, HPV-52, HPV-73 in HPV-82. HPV-16 in HPV-18 sta bila prisotna v 77,1 % primerov RMV v Sloveniji (16).

Zgodnji invazivni RMV je asimptomatski in ga odkrijemo le z dobro organiziranimi presejalnimi pregledi. Z rastjo tumorja se pojavi rjavkast izcedek iz nožnice, krvavitve po spolnem odnosu ali spontana krvavitev. Zasevke najdemo najprej v lokalnih bezgavkah (paracervikalne, parametrijske, hipogastrične, presakralne, sakralne in bezgavke ob skupni in zunanji arteriji iliaki), hematogene pa v pljučih in možganih.

Za obliko zdravljenja se odločimo glede na stadij tumorja, starost bolnice in željo po ohranitvi plodnosti. Pri intraepitelijskem karcinomu je priporočeno zdravljenje izrezanje z diatermično zanko ali s klasično konizacijo. Osnovni načeli primarnega zdravljenja invazivnega RMV sta kirurški poseg ali radioterapija. Dokončna odločitev o zdravljenju temelji na mnenju multidisciplinarnega ginekološko-onkološkega konzilija. Z radioterapijo lahko zdravimo vse stadije RMV, primarno kirurško pa zdravimo le bolnice v stadijih I do IIA (konizacija, vaginalna ali

abdominalna histerektomija z ali brez vaginalne manšete oz. abdominalna histerektomija z limfadenektomijo in vaginalno manšeto). Pri stadijih IIB, III in IV zdravimo z radioterapijo ali s kombinacijo radioterapije in kemoterapije (14).

RAK NOŽNICE

Je redek, saj predstavlja le 1–2 % ginekoloških rakov. V 85 % gre histološko za ploščatocelični karcinom. Adenokarcinom je redkejši, pojavi se pri mlajših ženskah, pogosteje metastazira v bezgavke in pljuča ter ima slabšo prognozo. Svetlocelični adenokarcinom je povezan z izpostavljenostjo dietilstilbestrolu med embrionalnim razvojem (14).

Pogosto se razvije iz VAIN 3 in je povezan z okužbo z visoko rizičnimi genotipi HPV (v okoli 70 %). Pogosto se pojavi v zgornji tretjini vagine pri ženskah, ki so bile zdravljene zaradi CIN in RMV (17). Klinični znaki so nenormalne krvavitve, krvavitve po odnosu, serozen ali krvavi izcedek iz nožnice. V diagnostiki napravimo kolposkopijo in biopsijo sumljive spremembe (18).

Za zdravljenje zgodnjih stadijev bolezni pride v poštev vaginektomija z limfadenektomijo, po možnosti z rekonstrukcijo, ali intrakavitarna radioterapija in obsevanje pelvičnih ter ingvinalnih bezgavk, v primeru da tumor zajema spodnjo tretjino vagine. Za stadij II je možna radikalna vaginektomija, pelvična ekscizija ali obsevanje. Za napredovale stadije pride v poštev le obsevanje (14, 18).

RAK VULVE

Je tudi redek, saj predstavlja okoli 4 % ginekoloških rakov. Pojavlja se predvsem pri starejših, povprečna starost je 60–75 let. Ima dvojno etiologijo. Pri starejših, pomenopavzalnih ženskah je povezan z diferenciranim VIN, ki se razvije iz prekanceroze lichen sclerosus ali Pagetove bolezni. Ta ni povezan s HPV okužbo. Približno 40 % pa ga je povezanega z VIN, ki se razvije po okužbi z visoko rizičnimi genotipi HPV. Ta se pojavi večinoma pri mlajših od 50 let.

Večinoma so simptomi izraženi s srbečico vulve, vidno spremembo na vulvi, krvavitvijo v postmenopavzi ali s povečanimi ingvinalnimi bezgavkami. Za diagnozo je potrebno odvzeti biopsijo s tumorja, za zamejitev pa oceniti bezgavke s CT ali MRI. Večinoma se pojavi na velikih labijah in je histološko planocelularen (90–95 %). V Bartolinijevi žlezi ali v povezavi s Pagetovo boleznijo lahko vznikne adenokarcinom, redki so še melanom vulve, bazalno-celični karcinom in verukozni karcinom (14, 19).

Stadij IA zadostno zdravimo s široko ekscizijo. Pri višjih stadijih napravimo široko ekscizijo ali vulvektomijo in ingvino-femoralno limfadenektomijo povrhnjih in globokih bezgavk. Dodatno obsevanje je potrebno pri stadiju IIIB in več, ali če tumor ni izrezan z zadostnim varnostnim robom. Pri napredovali bolezni zdravimo z neoadjuvantno kemo- in radioterapijo in nato operiramo ali pa zdravimo z radikalno kemo- in radioterapijo (19).

LITERATURA

1. Ho CY, Bierman R, Beardsley L, et al. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med.* 1998; 338 (7): 423–8.
2. Hildesheim A, Wang SS. Host and viral genetics and risk of cervical cancer: a review. *Virus Res.* 2002; 89 (2): 229–40.
3. Yanofsky VR, Patel RV, Goldenberg G. Genital warts. A comprehensive review. *J Clin Aesthet Dermatol.* 2012; 5 (6): 25–36.
4. Scheinfeld N, Lehman DS. An evidence-based review of medical and surgical treatments of genital warts. *Dermatol Online J.* 2006; 12 (3): 5.
5. Dubina M. Viral-associated non-melanoma skin cancers: a review. *Am J Dermatopathol.* 2009; 31 (6): 561–73.
6. Kiviat N. Natural history of cervical neoplasia: overview and update. *Am J Obstet Gynecol.* 1996; 175 (4): 1099–104.
7. Moscicki AB, Shiboski S, Hills NK, et al. Regression of low-grade squamous intra-epithelial lesions in young women. *Lancet.* 2004; 364 (9446): 1678–83.
8. Uršič Vrščaj M, Rakar S, Možina A, et al. Smernice za celostno obravnavo žensk s predrakavimi spremembami materničnega vratu. Ljubljana: Onkološki inštitut; 2011.
9. Dodge JA, Eltabbakh GH, Mount SL, et al. Clinical features and risk of recurrence among patients with vaginal intraepithelial neoplasia. *Gynecol Oncol.* 2001; 83 (2): 363–9.
10. Insinga RP, Liaw KL, Johnson LG, et al. A systematic review of the prevalence and attribution of human papillomavirus types among cervical, vaginal, and vulvar precancers and cancers in the United States. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008; 17 (7): 1611–22.
11. Yalcin QT, Rutherford TJ, Chambers SK, et al. Vaginal intraepithelial neoplasia: treatment by carbon dioxide laser and risk factors for failure. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2003; 106 (1): 64–8.
12. Sideri M, Jones RW, Wilkinson EJ, et al. Squamous vulvar intraepithelial neoplasia: 2004 modified terminology, ISSVD Vulvar Oncology Subcommittee. *J Reprod Med.* 2005; 50 (11): 807–10.
13. Garland SM, Insinga RP, Singh HL, et al. Human papillomavirus infections and vulvar disease development. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009; 18 (6): 1777–84.
14. Jhingran A, Russell AH, Seiden MV, et al. Cancers of the cervix, vulva, and vagina. In: Abeloff M, Armitage JO, Niederhuber JE, eds. *Abeloff's clinical oncology.* 4th ed. Philadelphia, PA: Elsevier Churchill Livingstone; 2008. p. 1496–1543.
15. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol.* 1999; 189 (1): 12–9.
16. Jančar N, Kocjan BJ, Poljak M, et al. Distribution of human papillomavirus genotypes in women with cervical cancer in Slovenia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2009; 145 (2): 184–8.
17. Madsen BS, Jensen HL, van den Brule AJ, et al. Risk factors for invasive squamous cell carcinoma of the vulva and vagina - population-based case-control study in Denmark. *Int J Cancer.* 2008; 122 (12): 2827–14.
18. Beller U, Sideri M, Maisonneuve P, et al. Carcinoma of the vagina. *J Epidemiol Biostat.* 2001; 6 (1): 141–52.
19. Tying SK. Vulvar squamous cell carcinoma: guidelines for early diagnosis and treatment. *Am J Obstet Gynecol.* 2003; 189 (3 Suppl): 17–23.

Vesna Tlaker Žunter¹, Pavle Košorok², Matic Bunič³, Nina Sojar Košorok⁴

S človeškim papilomavirusom povezane benigne in maligne spremembe moškega spolovila in zadnjika

Human Papillomavirus-Related Benign and Malignant Conditions of Male Genitals and Anus

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: anogenitalne bradavice, kondilomi, HPV, rak penisa, rak zadnjika, okužba s HPV

S spremembami spolovila in zadnjika je povezanih več kot 40 od skoraj 200 znanih genotipov človeškega papilomavirusa (HPV). Nizkorizični genotipi HPV, najpogostejša sta genotipa 6 in 11, povzročajo anogenitalne bradavice. Te zdravimo z destruktivnimi metodami ali lokalnimi imunomodulatorji. Zdravljenje je večinoma boleče in dolgotrajno, bradavice pa se rade ponavljajo. Pojavnost anogenitalnih bradavic je zaradi slabega prijavljanja podcenjena. Karcinom penisa je razmeroma redek rak, ki je v 30–50 % primerih povezan z okužbo z visokorizičnimi genotipi HPV, zlasti z genotipoma 16 in 18. Pomemben dejavnik tveganja predstavljajo tudi kronične vnetne bolezni, kot je lichen sklerozus. Tudi rak zadnjika in analnega kanala je razmeroma redek. Bolj so ogrožene ženske ter moški, ki imajo analne spolne odnose. Rak zadnjika in analnega kanala kaže močno povezavo z okužbo s HPV, in sicer v 80–85 %. Najpogostejša genotipa sta HPV-16 in HPV-18.

ABSTRACT

KEY WORDS: anogenital warts, condylomas, HPV, penile cancer, anal cancer, HPV infection

Genital and anal lesions are associated with over 40 out of almost 200 known human papillomavirus (HPV) genotypes. Low-risk HPV genotypes, mostly genotypes 6 and 11, cause anogenital warts. Warts may be treated with destructive methods or with topical immunomodulatory therapy. Any treatment for anogenital warts is usually painful and needs to be repeated, and the warts have a strong tendency to recur. Due to underreporting, the incidence of anogenital warts is underestimated. Carcinoma of the penis is a rare cancer, with 30–50 % of cases being associated with high-risk HPV genotypes, particularly HPV-16 and HPV-18. Associated chronic inflammatory diseases, e.g. lichen

¹ Vesna Tlaker Žunter, dr. med., Dermatovenerološka klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Zaloška cesta 2, 1525 Ljubljana; vesna.zunter@kclj.si

² Prof. dr. Pavle Košorok, dr. med., Medicinski center IATROS d.o.o., Parmova ulica 51b, 1000 Ljubljana

³ Matic Bunič, štud. med., Medicinski center IATROS d.o.o., Parmova ulica 51b, 1000 Ljubljana

⁴ Nina Sojar Košorok, štud. med., Medicinski center IATROS d.o.o., Parmova ulica 51b, 1000 Ljubljana

sclerosus, also represent an important risk factor. The carcinoma of anus and anal canal is also one of rare cancers. At higher risk for anal cancer are women, and men who practise anal intercourse. With 80–85 % of cases being associated with HPV, anal cancer bears a strong relationship with HPV, predominantly genotypes 16 and 18.

UVOD

Okužba s človeškim papilomavirusom (HPV) je najpogostejša virusna spolno prenosljiva okužba. S spremembami spolovila in zadnjika je povezanih več kot 40 od skoraj 200 znanih genotipov HPV. Genotipe delimo na visoko in nizko rizične glede na njihovo povezavo z benignimi bradavicami ali rakom zadnjika in spolovila oz. predrakavimi spremembami. HPV se prenaša pretežno s spolnimi odnosi, vendar za prenos ni nujen spolni stik (1, 2).

Najpogostejši učinek okužbe s HPV na splošno je nastanek bradavic (veruk). Ti virusno povzročeni tumorji so raznolikega videza in lahko nastanejo na različnih mestih na koži in sluznici spolovil, ust, žrela in grla (3). Nizkorizični alfa HPV genotipi (večinoma HPV-6 in HPV-11) so vzročno povezani s praktično vsemi anogenitalnimi bradavicami in laringalnimi ploščatoceličnimi papilomi pri obeh spolih (4).

Med približno 40 HPV tipi iz rodu alfa, za katere je znano, da lahko okužijo epitelij sluznic, je 10–15 visokorizičnih tipov HPV. Ti so povezani s spremembami, ki lahko napredujejo v raka. Poleg raka materničnega vratu imajo visokorizični tipi HPV, med njimi je najpogostejši HPV-16, vodilno etiološko vlogo pri nastanku raka zadnjika in pomembnem deležu raka nožnice, penisa, vulve ter raka ust in žrela (večinoma tonzil) (4).

ANOGENITALNE BRADAVICE

Anogenitalne bradavice, imenovane tudi kondilomi, so mehki kožni izrastki, veliki od nekaj milimetrov do več centimetrov. V toplem in vlažnem okolju anogenitalnega predela spremembe nikoli ne zrastejo

v podobni obliki kot trde, poroženele bradavice na rokah in nogah, kjer je okolje bolj hladno in kjer je veliko drgnjenja. V večini primerov merijo nekaj milimetrov, lahko pa tudi več centimetrov. Včasih so zelo drobne, premera enega milimetra ali manj, in jih klinično težko ločimo od moluskov. Večinoma so kožne barve, lahko tudi temneje pigmentirane od okolice in lahko posnemajo seboroične keratoze ali melanocitne nevuse. Anogenitalne bradavice so lahko nizke in ploščate, včasih pa rastejo kot izrazito visoke, koničaste papule, lahko tudi z ožjo bazo ali na peclju, še posebej v pregibih. Površina je papilomatozna, žametasta, včasih je izrazito resičasta, le redko pa je gladka. Vzniknejo lahko kjer koli na koži ali sluznici spolovila. Anogenitalne bradavice so lahko posamezne, običajno pa jih pri bolniku najdemo več. Večinoma so brez simptomov, včasih srbijo, bolijo ali krvavijo. Pri moških se najpogosteje nahajajo na koronarnem sulkusu in na korpusu penisa ter pubično ob korenu penisa. Na vlažnih mestih, kot je v vulvi ali perianalnem področju, se lahko zelo razrastejo in imajo zaradi zadrževanja izločkov v resicah izrazito neprijeten vonj.

V približno 70 % anogenitalnih bradavic ugotovijo prisotnost HPV genotipa 6. Večino ostalih primerov je povezanih s HPV genotipa 11, opisali pa so tudi številne druge genotipe (med drugim HPV genotipa 2, 16, 18, 30–33, 35, 39, 41–45, 51–56, 59, 62, 70, 73 in 84, med katerimi so tudi visoko rizični). Prisotnih je lahko več povzročiteljev hkrati (5–8).

V letu 2013 je bilo v Sloveniji prijavljenih 466 primerov anogenitalnih bra-

davic (22,6/100.000 prebivalcev), 59 % več kot v letu 2012 in več kot trikrat več kot v kateremkoli letu v obdobju od 2004–2008. Največja starostno specifična incidenca je bila pri moških v starostni skupini 25–29 let (124,4/100.000 moških). Podatki o prijavi incidenti anogenitalnih bradavic zagotovo močno podcenjujejo njihovo breme v prebivalstvu (9). Velik navidezni porast incidence v letu 2013 je posledica doslednejšega prijavljanja v ljubljanski regiji.

Anogenitalne bradavice so kadar koli prisotne pri približno 1 % spolno dejavne populacije v Ameriki in so bolj razširjene pri moških, ki imajo spolne odnose z moškimi, kot pri moških, ki imajo spolne odnose z ženskami (10, 11). Mednarodna raziskava pri moških, starih od 18 do 70 let, je pokazala 4,5-krat večjo verjetnost za anogenitalne bradavice pri moških, ki so imeli v zadnjih treh mesecih tri analne spolne partnerje ali več (12).

Anogenitalne bradavice večinoma zdravimo z destruktivnimi metodami, najpogosteje s krioterapijo, lahko tudi z izrezanjem, laserjem, elektrokavterizacijo ali radiofrekvenco. Druga pri nas dostopna možnost je lokalna imunoterapija z imikvimodom. Zdravljenje je pogosto boleče in za bolnika mučno, postopke pa je treba praviloma večkrat ponavljati.

KARCINOM PENISA

Karcinom je najpogostejši tumor penisa. V Sloveniji, tako kot drugod v razvitem svetu, je redek. V letu 2010 je bilo v Sloveniji registriranih 10 primerov karcinoma penisa, kar predstavlja incidenco 1,2/100.000 moških. Dva bolnika sta zaradi te bolezni v letu 2010 umrla (13).

Podobno kot pri karcinomu vulve ter glave in vratu je videti, da se nekateri primeri karcinoma penisa razvijejo v povezavi z okužbo s HPV, nekateri pa neodvisno od nje (14, 15). Samo 30–50 % karcinoma penisa kaže povezavo s HPV (14–16).

Med vzročnimi genotipi HPV najpogosteje opisujejo HPV-16, ki mu sledijo genotipi HPV 18, 33 in 45 (16, 17). Možna je tudi hkratna okužba z več genotipi HPV.

Obrezovanje novorojenčkov zmanjšuje pojavnost karcinoma penisa. Razlog je morda povezan s tem, da obrezovanje zmanjšuje kronično vnetje. Kronični vnetji, kot sta balanopostitis in lihen sklerozus, sta med najpomembnejšimi dejavniki tveganja za karcinom penisa. Karcinoma penisa praktično ni v predelih sveta, kjer je zgodnje obrezovanje dečkov tradicionalno (18–20).

Najpogostejše mesto nastanka karcinoma penisa je glans, sledijo mu prepucij, koronarni žleb in korpus penisa. Pri večini bolnikov se pojavi lokalizirana bolezen, npr. tvorba, razjeda ali sprememba, ki spominja na vnetje (18). Neinvazivni tumor lahko zdravimo lokalno, npr. z laserjem, imikvimodom, 5-fluorouracilom ali lokalno ekscizijo. Pri razširjeni bolezni pridejo v poštev penektomija, odstranitev bezgavk, obsevanje in kemoterapija (18).

KARCINOM ZADNJIKA

Analni kanal je končni del širokega črevesa, ki se začne na zgornji površini anorektalnega obroča in prehaja skozi medenično dno na zadnjiku. Spodnji del sega od zobate črte navzdol do meje zadnjika. 85 % analnih skvamozno-celičnih karcinomov vznikne v analnem kanalu. V Sloveniji je Register raka v letu 2010 zabeležil 15 primerov raka zadnjika in analnega kanala, od tega 6 pri moških in 9 pri ženskah. Samo en bolnik je bil mlajši od 60 let. Zaradi raka zadnjika in analnega kanala so v letu 2010 umrli trije bolniki (13). Povprečna starost bolnikov se giblje med 58 in 67 leti. Ti karcinomi so pogostejši pri ženskah, razmerje je 5:1. V populaciji ogroženih moških se to razmerje približuje 1:1. V nasprotju z analnimi karcinomi so perianalni karcinomi pogostejši pri moških, kjer gre za razmerje 4:1.

V ZDA je incidenca skvamozno-celičnega karcinoma analnega kanala in perianalne kože v populaciji moških, ki imajo spolne odnose z moškimi, ocenjena kot 11–34-krat večja kot pri moških, ki nimajo spolnih odnosov z moškimi. Posebej izpostavljeni bolniki so okuženi s HIV. Drugi dejavniki, močno povezani z analnim skvamozno-celičnim karcinomom, so večje število spolnih partnerjev, analni spolni odnosi med moškim in moškim ali moškim in žensko, sočasna druga spolno prenosljiva okužba ter anamneza raka materničnega vratu, vulve in nožnice. Pomembna je tudi uporaba zdravil za zaviranje imunosti po presaditvi organov in stanje po kemoterapiji.

Okužba s HPV povzroča analni karcinom na način, ki ga lahko enačimo z vlogo HPV pri nastanku karcinoma materničnega vratu (21, 22). Mnogi bolniki imajo istočasno analne in genitalne virusne spremembe. Običajno spadajo med populacijo, ki ima podobne navade, med drugim tudi večje število spolnih partnerjev. Analni karcinom je praviloma povezan z visoko rizičnima genotipoma HPV-16 in HPV-18 (23–25). S HPV je povezanih 80–85 % primerov analnega karcinoma (23). HPV genotipa 6 in 11 na splošno povzročata benigne lezije, anogenitalne bradavice in analno intraepitelialno neoplazijo (AIN) nizke stopnje, ki redko napreduje do karcinoma. Nasprotno pa HPV genotipi 16, 18, 31, 33, 34 in 35 povzročajo intraepitelijsko displazijo visoke stopnje, karcinom *in situ* ter invazivni karcinom zadnjika. Študije Palmerja in sodelavcev kažejo na to, da epitelij prehodne cone analnega kanala kaže embriološke in histološke podobnosti s prehodno cono materničnega vratu (24).

V študiji o analnem skvamoznoceličnem karcinomu je imelo 47 % bolnikov v anamnezi okužbo z anogenitalnimi bradavicami (26). Med prizadetimi bolniki brez anamneze anogenitalnih bradavic je bil rak prisoten pri pacientih z anamnezo gonoreje, virusa herpes simpleksa tipa 2 in okužbe s klamidijo (*Chlamydia trachomatis*). Tudi kajenje predstavlja enega od dejavnikov tveganja (25).

Pri ugotovljeni analni intraepitelijski neoplaziji zdravimo samo bolnike z visoko stopnjo analne intraepitelijske neoplazije. To stališče temelji na izkušnjah s spremembami na materničnem vratu (angl. *Cervical intraepithelial neoplasia*, CIN), kjer opažamo, da večina sprememb nizke stopnje spontano regresira. Spremembe večinoma zdravimo z elektrokoagulacijo ali ekscizijo. AIN nizke stopnje nadziramo s citološkimi pregledi na 3–6 mesecev (27). Redni nadzor HIV pozitivnih moških, ki imajo spolne odnose z moškimi, za intraepitelijske lezije in skvamoznocelični karcinom nudi zadovoljiva pričakovanja glede življenjske dobe ob stroških, ki so primerljivi z drugimi preventivnimi posegi (28).

Perianalno intraepitelijsko neoplazijo, s starim nazivom perianalna Bownova bolezen, danes smatramo kot AIN visoke stopnje. V glavnem jo povzročata HPV-16 in HPV-18, za razliko od AIN nizke stopnje, ki jo povzročata večinoma HPV-6 in HPV-11 (29–31).

Za AIN nizke stopnje agresivnejši posegi niso potrebni, če je stanje asimptomatsko, vendar naj bi bili pacienti občasno kontrolirani. AIN visoke stopnje lahko zdravimo lokalno z imikvimodom, 5-fluorouracilom ali lasersko. Pri bolj razširjenih spremembah ali kadar ne moremo izključiti invazivne rasti, pride v poštev operacija.

LITERATURA

1. Gross G. Genitoanal human papillomavirus infection and associated neoplasias. *Curr Probl Dermatol.* 2014; 45: 98–122.
2. Cardoso JC, Calonje E. Cutaneous manifestations of human papillomaviruses: A review. *Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat.* 2011; 20 (3): 145–54.
3. Sterling JC. Virus infections. In: Burns T, Breathnach S, Cox N, eds. *Rook's Textbook of Dermatology.* Oxford: Wiley-Blackwell. 2010: 33.37–33.60.
4. Poljak M. A review of 20 years of human papillomavirus research in Slovenia. *Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat.* 2011; 20 (3): 99–112.
5. Potocnik M, Kocjan B, Seme K, et al. Distribution of human papillomavirus (HPV) genotypes in genital warts from males in Slovenia. *Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat.* 2007; 16 (3): 91–6, 98.
6. Komloš KF, Kocjan BJ, Košorok P, et al. Tumor-specific and gender-specific pre-vaccination distribution of human papillomavirus types 6 and 11 in anogenital warts and laryngeal papillomas: a study on 574 tissue specimens. *J Med Virol.* 2012; 84 (8): 1233–41.
7. Grayson W. Infectious diseases of the skin. In: Calonje E, Brenn T, Lazar A, eds. *Mckee's skin pathology with clinical correlations.* 4th ed. Toronto: Elsevier, 2012. p. 760–895.
8. Langenberg A, Cone RW, McDougal J, et al. Dual infection with human papillomavirus in a population with overt genital condylomas. *J Am Acad Dermatol.* 1993; 28: 434–42.
9. Klavs I, Kustec T, eds. *Spolno prenesene okužbe v Sloveniji: letno poročilo 2013* [internet]. Ljubljana: Nacionalni inštitut za javno zdravje, 2013 [citirano 2014 Sep 30]. Dosegljivo na: http://www.ivz.si/hiv_spo?pi=56_5_FileName=attName.png&_5_MediaId=8350&_5_AutoResize=false&pl=107-5.3
10. Genital HPV infection – fact sheet [internet]. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention; 2014 [citirano 2014 Sep 30]. Dosegljivo na: <http://www.cdc.gov/std/HPV/STDFact-HPV.htm>
11. Swedish KA, Goldstone SE. Prevention of anal condyloma with quadrivalent human papillomavirus vaccination of older men who have sex with men. *PLoS One.* 2014; 9 (4): e93393.
12. Anic GM, Lee JH, Villa LL, et al. Risk factors for incident condyloma in a multinational cohort of men: the HIM study. *J Infect Dis.* 2012; 205 (5): 789–93.
13. Primic Žakelj M, ed. *Rak v Sloveniji 2010* [internet]. Ljubljana: Onkološki inštitut Ljubljana. Epidemiologija in register raka, Register raka Republike Slovenije; 2014 [citirano 2014 Sep 30]. Dosegljivo na: http://www.onko-i.si/fileadmin/onko/datoteke/dokumenti/RRS/LP_2010.pdf
14. Chaux A, Netto GJ, Rodríguez IM, et al. Epidemiologic profile, sexual history, pathologic features, and human papillomavirus status of 103 patients with penile carcinoma. *World J Urol.* 2013 Aug; 31 (4): 861–7.
15. Rubin MA, Kleter B, Zhou M, et al. Detection and typing of human papillomavirus DNA in penile carcinoma: evidence for multiple independent pathways of penile carcinogenesis. *Am J Pathol.* 2001; 159 (4): 1211–8.
16. Gregoire L, Cubilla AL, Reuter VE, et al. Preferential association of human papillomavirus with high-grade histologic variants of penile-invasive squamous cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 1995; 87 (22): 1705–9.
17. Hernandez BY, Goodman MT, Unger ER, et al. Human papillomavirus genotype prevalence in invasive penile cancers from a registry-based United States population. *Front Oncol.* 2014; 4: 9.
18. Sonpavde G, Pagliaro LC, Buonerba C, et al. Penile cancer: current therapy and future directions. *Ann Oncol.* 2013 May; 24 (5): 1179–89.
19. Schoen EJ. The relationship between circumcision and cancer of the penis. *CA Cancer J Clin.* 1991; 41: 306–9.
20. Kochen M, McCurdy S. Circumcision and the risk of cancer of the penis. A life-table analysis. *Am J Dis Child.* 1980; 134: 484–6.
21. Frisch M. On the etiology of anal squamosum carcinoma. *Dan Med Bull.* 2002; 49: 194–209.
22. Chang GJ, Sheldon A, Welton ML. Epidemiology and natural history of anal HPV infection and ASIL and cancer in the general population. *Semin Colon Rect Surg.* 2004; 15: 210–4.
23. Glyne-Jones R, Nilsson PJ, Aschele C, et al. Anal cancer: ESMO-ESSO-ESTRO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Radiother Oncol.* 2014; 111 (3): 330–9
24. Palmer JG, Schoelefield JH, Coates PJ, et al. Anal cancer and human papilloma viruses. *Dis Colon Rectum* 1989; 32: 1016–22.
25. Shroyer KR, Kim JG, Manos MM, et al. Papilloma virus found in anorectal squamous carcinoma, not in colon adenocarcinoma. *Arch Surg* 1992; 127 (6): 741–4.

26. Noffsinger A, Witte D, Fenoglio-Preiser CM. The relationship of human papillomaviruses to anorectal neoplasia. *Cancer* 1992; 70: 1276–87.
27. Goldstone SE, Winkler B, Wifford LJ, et al. High prevalence of anal squamous intraepithelial lesions and squamous-cell carcinoma in men who have sex with men as seen in a surgical practice. *Dis Colon Rectum* 2001; 44 (5): 690–8.
28. Goldie SJ, Kuntz KM, Weinstein MC, et al. Cost-effectiveness of screening for anal squamous intraepithelial lesions and cancer in human immunodeficiency virus-negative homosexual and bisexual men. *Am J Med* 2000; 108 (8): 634–41.
29. Chang CJ, Welton ML. Anal neoplasia. *Seminars Colon Rectal Surg* 2003; 14: 111–8.
30. Halverson AL. Perianal Bowen's disease then and now: evolution of the treatment for anal high-grade intraepithelial neoplasia. *Semin Colon Rectal Surg* 2003; 14: 213–7.
31. Brown SR, Skinner P, Tidy J, et al. Outcome after surgical resection for high-grade anal intraepithelial neoplasia (Bowen's disease). *Br J Surg* 1999; 86 (8): 1063–6.

Kristina Fujs Komloš¹, Boštjan J. Kocjan², Polona J. Maver Vodičar³, Lea Hošnjak⁴, Nina Gale⁵, Boštjan Luzar⁶, Nina Jančar⁷, Mario Poljak⁸

Razporeditev genotipov pri s človeškim papilomavirusom povezanih benignih in malignih novotvorbah v Sloveniji

Genotype Distribution in Human Papillomavirus-Related Benign and Malignant Tumours in Slovenia

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: človeški papilomavirus, HPV, genotip, rak, karcinom, bradavice, papilom, Slovenija

Človeški papilomavirusi (HPV) so raznolika skupina DNA virusov, ki so etiološko povezani z različnimi benignimi, predrakavimi in rakavimi novotvorbami epitelija sluznic in kože pri človeku. Visokorizični genotipi HPV iz rodu alfa (najpomembnejša sta HPV-16 in HPV-18) so odgovorni za nastanek skoraj vseh primerov rakov materničnega vratu in njegovih predstopenj (cervikalna intraepitelijska neoplazija (CIN) visoke stopnje), raka zadnjika ter rakov nožnice, penisa, ženskega zunanega spolovila in raka ustnega dela žrela. Nasprotno so nizkorizični genotipi HPV iz rodu alfa (najpomembnejša sta HPV-6 in HPV-11) odgovorni za nastanek benignih novotvorb: anogenitalnih bradavic in ploščatoceličnega papiloma grla. Prevalenca HPV in razporeditev genotipov HPV v malignih in benignih tumorjih pred začetkom cepljenja proti HPV sta pomembni za načrtovanje programa cepljenja proti HPV in ocenjevanje učinkovitosti pri preprečevanju širjenja okužb s HPV in z njimi povezanih bolezni. Slovenske raziskave prevalence okužbe s HPV in razporeditve genotipov HPV v benignih in malignih tumorjih so pokazale, da bi s profilaktičnim cepljenjem proti HPV s trenutno dostopnimi cepivi v Sloveniji lahko preprečili veliko večino anogenitalnih bradavic (92,4 %) in papilomov grla (90,8 %), skoraj 70 % CIN-3, 77 % rakov materničnega vratu in skoraj vse primere raka

¹ Asist. dr. Kristina Fujs Komloš, univ. dipl. mikr., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana; kristina.fujs@mf.uni-lj.si

² Znan. sod. dr. Boštjan J. Kocjan, univ. dipl. mikr., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

³ Asist. dr. Polona J. Maver Vodičar, dr. med., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

⁴ Lea Hošnjak, univ. dipl. mikr., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

⁵ Prof. dr. Nina Gale, dr. med., Inštitut za patologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Korytkova ulica 2, 1000 Ljubljana

⁶ Prof. dr. Boštjan Luzar, dr. med., Inštitut za patologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Korytkova ulica 2, 1000 Ljubljana

⁷ Doc. dr. Nina Jančar, dr. med., Klinični oddelek za reprodukcijo, Ginekološka klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Šljajmerjeva ulica 3, 1000 Ljubljana

⁸ Prof. dr. Mario Poljak, dr. med., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

zadnjika. Izsledki slovenskih raziskav o pomenu HPV v etiologiji papilomov ustne votline in požiralnika, sinonazalnih invertiranih papilomov ter ploščatoceličnega raka ustne votline in grla pri slovenskih bolnikih kažejo na omejeno ali nepomembno vlogo HPV.

ABSTRACT

KEY WORDS: human papillomavirus, HPV, cancer, carcinoma, warts, papilloma, Slovenia

Human papillomaviruses (HPV) are a diverse group of DNA viruses etiologically associated with various benign, precancerous and cancerous epithelial neoplasms of skin and epithelia in humans. High-risk HPV genotypes from genus alpha (the most important being HPV-16 and HPV-18) are responsible for development of virtually all cases of cervical cancers and its precursors (high-grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN)), anal cancer, vaginal, penile, vulvar cancers and oropharyngeal cancer. In contrast, low-risk HPV genotypes from genus alpha (the most important being HPV-6 and HPV-11) are responsible for development of two benign tumours – anogenital warts and laryngeal squamous cell papillomas. Pre-vaccination HPV prevalence and HPV genotype distribution in malignant and benign tumours represent important information for prophylactic HPV vaccination program planning and for the evaluation of its effectiveness. Published Slovenian data on HPV prevalence and HPV genotype distribution in benign and malignant tumours showed that prophylactic HPV vaccination with currently available vaccines can prevent the vast majority of anogenital warts (92.4%) and laryngeal papillomas (90.8%), almost 70% of CIN-3, 77% of cervical cancers and nearly all cases of anal cancer. According to our data, HPV does not play any significant role in the etiology of papillomas of the oral cavity and esophagus, sinonasal papillomas, epithelial hyperplastic lesions of the larynx and oral squamous cell carcinomas in Slovenia.

UVOD

Človeški papilomavirusi (HPV) so izredno raznolika in razširjena skupina DNA virusov, vzročno povezana z nastankom različnih benignih, predrakavih in rakavih sprememb sluznice ter kože pri človeku. Več kot 195 do sedaj uradno dokončno opredeljenih genotipov HPV, taksonomsko uvrščenih v družino *Papillomaviridae*, je na osnovi podobnosti v genomu razvrščenih v pet rodov, imenovanih alfa, beta, gama, mu in nu. Najštevilčnejši in za človeka najpomembnejši je rod alfa, ki se deli na 14 vrst. Posamezni rodovi HPV izkazujejo dokaj značilen tropizem za določeno vrsto epitela. V rod alfa so uvrščeni genotipi HPV, povezani z nastankom števil-

nih benignih in malignih sluzničnih, kožno-sluzničnih in kožnih sprememb pri človeku. Sluznične (imenovane tudi anogenitalne) genotipe HPV rodu alfa (približno 40 genotipov HPV) povezujemo z nastankom predrakavih, rakavih in benignih sprememb ploščatoceličnega epitelijskega sluznic anogenitalnega in ustno-žrelnega predela. Na osnovi molekularno epidemioloških raziskav so anogenitalni genotipi rodu alfa glede na rakotvorni potencial oz. zmožnost povzročanja rakave preobrazbe ploščatoceličnega epitelijskega sluznic dodatno razdeljeni v štiri skupine: visokorizični genotipi, verjetno visokorizični genotipi (njihova zmožnost rakave preobrazbe še ni dokončno opredeljena), nizkorizični

genotipi in genotipi HPV z nejasnim rakotvornim potencialom. Visokorizični genotipi HPV (najpomembnejša sta HPV-16 in HPV-18) so odgovorni za nastanek skoraj vseh primerov rakov materničnega vratu in njegovih predrakavih predstopenj (CIN visoke stopnje). Poleg raka materničnega vratu visokorizični genotipi HPV igrajo vodilno etiološko vlogo pri razvoju raka zadnjika in v pomembnem deležu rakov nožnice, penisa, ženskega zunanega spolovila (vulve) ter raka ustnega dela žrela. Nasprotno so nizkorizični genotipi HPV iz rodu alfa (najpomembnejša sta HPV-6 in HPV-11) odgovorni za nastanek skoraj vseh primerov benignih anogenitalnih bradavic in ploščatoceličnega papiloma grla pri obeh spolih.

Od 90. let prejšnjega stoletja so bili HPV predmet obsežnih raziskav različnih aspektov tudi v Sloveniji. Podrobnejše poznavanje povzročiteljev s HPV povezanih bolezni, kot sta prevalenca HPV in razporeditev genotipov HPV v malignih in benignih tumorjih, pomeni pomembno informacijo pri načrtovanju ukrepov, kot je npr. profilaktično cepljenje proti HPV, in pri ocenjevanju njihove učinkovitosti pri preprečevanju širjenja okužb s HPV in z njimi povezanih bolezni.

ČLOVEŠKI PAPILOMAVIRUSI IN BENIGNI TUMORJI

Anogenitalne bradavice (AGB) in papilomi grla (PG) sta dve najpomembnejši benigni novotvorbi, etiološko povezani z nizkorizičnimi genotipi rodu alfa, med katerimi sta najpomembnejša in najpogostejša HPV-6 in HPV-11.

Ploščatocelični papilom je najpogostejša benigna epitelijska novotvorba grla. Predhodne raziskave so pokazale, da so skoraj vsi PG etiološko povezani z okužbo s HPV, v glavnem s HPV-6 in HPV-11. Že leta 1994 so Galetova in sod. s kombinacijo in situ hibridizacije in verižne reakcije s polimerazo (angl. *polymerase chain*

reaction, PCR) testirali serijo 79 arhivskih vzorcev PG, pridobljenih od 36 slovenskih bolnikov, in dokazali prisotnost DNA HPV v 89,9 %, od tega HPV-6 in HPV-11 v 28 od 29 (97 %) otroških papilomov in v 43 od 50 (86 %) odraslih papilomov (1).

Anogenitalne bradavice so najpogostejša benigna novotvorba povezana z okužbo z nizkorizičnimi genotipi HPV rodu alfa. Vsi primeri AGB so povzročeni s HPV, in sicer v več kot 90 % z genotipoma HPV-6 in HPV-11. Za AGB so značilne številčne lezije, ki se pojavljajo v manjših skupinah in lahko prizadenejo širše anogenitalno področje, ter pogoste ponovitve (recidivi) bolezni. Prva raziskava, v kateri so Potočnik in sod. določali razporeditev genotipov HPV v genitalnih bradavicah slovenskih bolnikov, je bila opravljena na 55 tkivnih vzorcih genitalnih bradavic, zbranih pri istem številu imunokompetentnih moških. S kombinacijo različnih metod PCR je bila DNA HPV dokazana v vseh 55 tkivnih vzorcih, od tega sta bila HPV-6 ali HPV-11 prisotna v 53 od 55 (96,4 %) bradavic oz. bolnikov in HPV-44 ter HPV-91 vsak v enem primeru (2). Okužba s HPV-6 je bila štirikrat pogostejša kot okužba s HPV-11.

Obe omenjeni raziskavi sta vključevali manjšo, nereprezentativno skupino bolnikov s papilomi grla oz. genitalnimi bradavicami. V raziskavi iz leta 2012, ki je tako v svetovnem kot slovenskem okviru po podatkih iz literature vključevala do takrat največje število tkivnih vzorcev PG (152 vzorcev, odvzetih istemu številu bolnikov) in največje število histološko potrjenih tkivnih vzorcev AGB (422 vzorcev AGB, odvzetih 315 bolnikom), zbranih pri bolnikih obeh spolov z geografsko in etnično omejenega področja, smo DNA HPV dokazali v 139 od 152 (91,4 %) PG in 413 od 422 (97,9 %) AGB (3). HPV-6 in/ali HPV-11 sta bila dokazana pri 138 od 152 (90,8 %) bolnikov s PG in 291 od 315 (92,4 %) bolnikov z AGB. Pre-

valenca HPV-6 se tako v PG kot AGB med spoloma statistično ni razlikovala. Nasprotno je bil v AGB HPV-11 trikrat pogostejši pri moških, medtem ko pri PG razlika v razporeditvi HPV-11 med spoloma ni bila statistično pomembna. Skupna prevalenca DNA HPV v AGB (97,1 %) se je pomembno razlikovala od skupne prevalenice DNA HPV v PG (91,4 %) ($p = 0,01$). V prvi primerjavi tipsko specifične razporeditve HPV-6 in HPV-11 med bolniki s PG in AGB z geografsko zaprtega in etnično homogenega področja smo dokazali pomembno neravnovesje v tumor-specifični razporeditvi HPV-6 in HPV-11; HPV-6 je bil statistično pogostejši v AGB (79 %) kot v PG (59,2 %) ($p = 0,000013$), medtem ko je bil HPV-11 statistično pogostejši v PG (28,9 %) kot v AGB (12,4 %) ($p = 0,00003$). V isti raziskavi je bilo dokazano, da je bil pri vseh 90 bolnikih z multiplimi bradavicami, v vseh sočasno odvzetih bradavicah posameznega bolnika, prisoten isti genotip HPV (3).

Domnevna etiološka vloga HPV pri nastanku treh redkih benignih sprememb v predelu glave in vratu pri slovenskih bolnikih je bila opisana v treh raziskavah. V primerjalni študiji, v katero so bili vključeni tkivni vzorci ploščatoceličnih papilomov ustne votline in tkivni vzorci histološko normalne ustne sluznice posameznikov, katerih starost, spol in lokalizacija odvzetega tkiva se je ujemala z istimi parametri bolnikov s papilomi v ustni votlini, je bil z uporabo treh metod PCR HPV-6 dokazan v treh in HPV-16 pri enem od 44 testiranih papilomov (4). Trije od 45 tkivnih vzorcev normalne ustne sluznice so bili DNA HPV pozitivni, vsebujoč HPV-6, HPV-11 in HPV-31. Ker v prevalenci DNA HPV med bolniki in kontrolami ni bilo pomembne razlike menimo, da ima HPV omejeno vlogo v etiologiji papilomov ustne votline, vsaj v tem delu Evrope (4).

Etiologija in patogeneza ploščatoceličnih papilomov požiralnika, redkega be-

nignega tumorja v požiralniku, je še vedno nepojasnjena in kontroverzna. Vlogo okužb s HPV v etiopatogenezi teh tumorjev so Poljak in sod. ugotavljali v raziskavi, ki je vključevala 29 ploščatoceličnih papilomov požiralnika, odvzetih 28 bolnikom iz Slovenije in Poljske z uporabo in situ hibridizacije in metode PCR (5). HPV-6 je bila zaznana le v dveh papilomih, kar kaže, da so v etiologiji teh tumorjev pomembni patogenetski mehanizmi, ki niso povezani s HPV.

Sinonazalni invertni papilomi (IP) so benigni, vendar destruktivni tumorji z visoko stopnjo ponovitev, najverjetneje povezano z nepopolno odstranitvijo. Pojavnost okužb s HPV pri bolnikih z IP in pri bolnikih z IP, združenih s ploščatoceličnim karcinomom (PCK), ter vpliv na pogostost ponovitev IP so preučevali Jenko in sod (6). V tej retrospektivni raziskavi so bili vključeni tkivni vzorci 68 bolnikov z IP in 5 bolnikov s papilomi, združenimi s PCK, ter kontrolna skupina 47 bolnikov. DNA HPV je bila dokazana pri 20 (30,3 %) bolnikih z IP, treh (60 %) bolnikih z IP/PCK in šestih (13 %) bolnikih iz kontrolne skupine. Pri 19 bolnikih je bil v IP dokazan HPV-11, pri enem bolniku z IP je bil dokazan HPV-6, med bolniki z IP/PCK pa je bil HPV-11 dokazan pri treh od petih bolnikov. V kontrolni skupini je bilo pet bolnikov HPV-11 pozitivnih in en bolnik HPV-16 pozitiven. Čeprav je bil HPV-11 dominanten genotip v skupinah bolnikov z IP, IP/PCK in v kontrolni skupini, domnevamo, da okužba s HPV predstavlja prej naključno kolonizacijo kot pa pomemben etiološki dejavnik, povezan z nastankom IP (6).

ČLOVEŠKI PAPILOMAVIRUSI IN MALIGNI TUMORJI

Najpogostejšo rakavo spremembo, povzročeno s HPV, predstavlja rak materničnega vratu. V predhodnih raziskavah je bila prisotnost visokorizičnih genoti-

pov HPV (najpogosteje HPV-16 in HPV-18) dokazana v več kot 99 % rakov materničnega vratu, 70–90 % rakov zadnjika in nožnice, 50 % raka penisa, 36–40 % raka ženskega zunanega spolovila in 25–30 % raka ustnega dela žrela.

Leta 2009 sta bili objavljeni dve raziskavi o predcepilni razporeditvi genotipov HPV pri slovenskih ženskah s CIN-3 in rakom materničnega vratu. Izsledki raziskave, v katero je bilo vključenih 261 brisov materničnega vratu s histološko potrjenim CIN-3, so pokazali, da je bil v lezijah CIN-3 najpogosteje dokazan genotip HPV-16 (59 %), ki so mu sledili HPV-31 (7,5 %), HPV-33 (7,1 %), HPV-58 (5 %) in HPV-51 (4 %) (7). Podobna raziskava, izvedena na reprezentativni populaciji slovenskih žensk z rakom materničnega vratu, je pokazala, da je v 262 od 278 (94,2 %) vzorcev rakov materničnega vratu prisotna DNA HPV. Najpogosteje prisotni genotipi, najdeni pri slovenskih ženskah z rakom materničnega vratu, so bili: HPV-16 (64,9 %), HPV-18 (12,2 %), HPV-33 (4,7 %) in HPV-45 (4,1 %) (8).

V raziskavi, objavljeni leta 2011, smo želeli pridobiti prve podatke o razporeditvi genotipov HPV pri bolnikih z rakom zadnjika v Sloveniji (9). V raziskavo je bilo vključenih 21 histološko potrjenih vzorcev analnega raka (17 ploščatoceličnih karcinomov in 4 karcinomi in situ), odzvetih istemu številu bolnikov (10 žensk, 11 moških). Prisotnost DNA HPV je bila dokazana v vseh 21 preiskanih vzorcih, najpogosteje najden genotip je bil HPV-16 (19 od 21 vzorcev). V enem vzorcu je bila dokazana le prisotnost nizkorizičnega genotipa HPV-6 in v enem vzorcu dvojna okužba z visokorizičnim genotipom HPV-52 in nizkorizičnim genotipom HPV-61.

V primerjalni raziskavi, izvedeni na tkivnih vzorcih ploščatoceličnega karcinoma ustne votline in histološko normalne ustne sluznice posameznikov, katerih starost, spol in lokalizacija odvzete

ga ter navade pitja in kajenja so se ujemali z istimi parametri bolnikov s karcinomom v ustni votlini, smo prisotnost DNA genotipov HPV-16, HPV-33 in HPV-58 dokazali pri 5 izmed 59 (8,4 %) karcinomov ustne votline in DNA genotipov HPV-11, HPV-16, HPV-31 in HPV-68 pri 4 od 61 (6,6 %) vzorcev normalne ustne sluznice (10). Podobno kot v raziskavi, izvedeni na papilomih ustne sluznice, tudi med bolniki s karcinomom ustne votline in njihovimi kontrolami ni bilo zaznati pomembne razlike v prevalenci DNA HPV, zato menimo, da ima HPV omejeno vlogo tudi v etiologiji karcinomov ustne votline v Sloveniji.

V nasprotju s papilomi grla je vloga HPV v etiologiji epiteljskih hiperplastičnih lezij grla in raka grla še vedno kontroverzna. Leta 1997 smo dokazovali prisotnost HPV v seriji epiteljskih hiperplastičnih lezij grla (od enostavne hiperplazije do invazivnega ploščatoceličnega karcinoma grla) s pomočjo treh različnih metod PCR (11). DNA HPV je bila dokazana le v dveh od 88 testiranih vzorcev: HPV-6 je bil prisoten v enem primeru enostavne hiperplazije in HPV-16 v enem primeru invazivnega ploščatoceličnega karcinoma grla (11).

Nekatere raziskave, v glavnem s področij z visoko prevalenco raka požiralnika, so namigovale na možno vlogo HPV v karcinogenezi raka požiralnika. Leta 1993 je bila v Sloveniji izvedena pilotna raziskava na 22 vzorcih raka požiralnika, kjer je bila prisotnost DNA HPV-16 dokazana le v dveh primerih (12). Da bi dodatno razjasnili domnevno vlogo okužb s HPV v etiologiji raka požiralnika, smo leta 1998 z uporabo osmih različnih protokolov PCR testirali 121 tkivnih vzorcev raka požiralnika, vendar DNA HPV nismo dokazali v nobenem od pregledanih tumorjev (13). Izsledki te raziskave podpirajo domnevo, da nastanek raka požiralnika na geografskih področij z nizko incidenco te vrste raka ni povezan z okužbo s HPV.

Tako kot pri že omenjenih rakah glave in vratu, je vloga HPV pri nastanku redkega histološkega podtipa ploščatoceličnega karcinoma, verukoznega karcinoma, prav tako sporna, saj se objavljena prevalenca DNA HPV rodu alfa (drugi HPV rodovi še niso bili preiskovani) v tem raku giblje med 0 in 100 %. V obsežni raziskavi iz leta 2013 smo določali prisotnost 87 različnih genotipov HPV iz rodov alfa, beta, gama in mu v 30 tkivnih vzorcih verukoznih karcinomov glave in vratu ter 30 po anatomski lokaciji usklajenih histološko normalnih tkivnih vzorcih (14). HPV rodu beta so bili dokazani v 5 od 30 (16,7 %) primerov raka in v 18 od 30 (60 %) primerov histološko normalnih tkivnih vzorcev, medtem ko HPV iz ostalih HPV rodov niso bili dokazani. V vzorcih verukoznega karcinoma smo dokazali genotipe HPV-19, HPV-24 in HPV-36, v histološko normalnem tkivu pa genotipe HPV-5, HPV-9, HPV-12, HPV-23, HPV-24, HPV-38, HPV-47, HPV-49 in HPV-96, medtem ko v dveh od petih verukoznih karcinomov in v 6 od 18 histološko normalnih tkivnih genotipa HPV ni bilo mogoče dokončno opredeliti. S to raziskavo je bilo nedvomno dokazano, da verukozni karcinom glave in vratu ni povezan z okužbo s HPV iz rodov alfa, gama in mu. Prisotnost HPV rodu beta v verukoznih karcinomi in normalnih tkivnih najverjetneje odraža naključno kolonizacijo, njihov možni biološki pomen pa bo potrebno še raziskati.

ZAKLJUČEK

Profilaktično cepljenje proti HPV se je že izkazalo kot učinkovit ukrep pri nadzoro-

vanju širjenja okužb s HPV in z njimi povezanih boleznih. Danes sta na tržišču dve cepivi HPV: dvovalentno (ščiti pred okužbo s HPV-16 in HPV-18) in štirivalentno (ščiti pred okužbo s HPV-6, HPV-11, HPV-16 in HPV-18). Kmalu pričakujemo še prihod devetvalentnega cepiva, ki bo nudilo zaščito proti dodatnim petim genotipom (HPV-31, HPV-33, HPV-45, HPV-52 in HPV-58). Za ocenjevanje učinkovitosti cepljenja s profilaktičnim HPV cepivom pri preprečevanju s tarčnimi genotipi povezanih boleznih na državnem nivoju je podatek o predcepilni prevalenci HPV in razporeditvi genotipov HPV v malignih in benignih tumorjih skoraj nepogrešljiv.

Slovenske raziskave o prevalenci HPV in razporeditvi genotipov HPV v benignih in malignih tumorjih, pri katerih HPV igrajo pomembno etiološko vlogo, so pokazale, da bi s profilaktičnim cepljenjem proti HPV s trenutno dostopnimi cepivi v Sloveniji lahko preprečili veliko večino anogenitalnih bradavic (92,4 %) in papilomov grla (90,8 %), skoraj 70 % CIN-3, 77 % rakov materničnega vratu in skoraj vse primere raka zadnjika. Prihod devetvalentnega cepiva predstavlja možnost, da bi v bližnji prihodnosti lahko preprečili nastanek skoraj vseh primerov rakov materničnega vratu in zadnjika ter deleža s HPV povezanih rakov nožnice, penisa, ženskega zunanjšega spolovila in raka ustnega dela žrela. Izsledki slovenskih raziskav o pomenu HPV v etiologiji papilomov ustne votline in požiralnika, sinonazalnih invertnih papilomov ter ploščatoceličnega raka ustne votline in grla kažejo na omejeno ali nepomembno vlogo HPV.

LITERATURA

1. Gale N, Poljak M, Kambič V, et al. Laryngeal papillomatosis: molecular, histopathological, and clinical evaluation. *Virchows Arch.* 1994; 425 (3): 291–5.
2. Potočnik M, Kocjan BJ, Seme K, et al. Distribution of human papillomavirus (HPV) genotypes in genital warts from males in Slovenia. *Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat.* 2007; 16 (3): 91–6.
3. Fujs Komloš K, Kocjan BJ, Košorok P, et al. Tumour-specific and gender-specific pre-vaccination distribution of human papillomavirus types 6 and 11 in anogenital warts and laryngeal papillomas: A study on 574 tissue specimens. *J Med Virol.* 2012; 84 (8): 1233–41.
4. Kansky AA, Seme K, Maver PJ, et al. Human papillomaviruses (HPV) in tissue specimens of oral squamous cell papillomas and normal oral mucosa. *Anticancer Res.* 2006; 26 (4B): 3197–201.
5. Poljak M, Orlowska J, Cerar A. Human papillomavirus infection in esophageal squamous cell papillomas: a study of 29 lesions. *Anticancer Res.* 1995; 15 (3): 965–9.
6. Jenko K, Kocjan B, Zidar N, et al. In inverted papillomas HPV more likely represents incidental colonization than an etiological factor. *Virchows Arch.* 2011; 459 (5): 529–38.
7. Kovanda A, Juvan U, Šterbenc A, et al. Pre-vaccination distribution of human papillomavirus (HPV) genotypes in women with cervical intraepithelial neoplasia grade 3 (CIN 3) lesions in Slovenia. *Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat.* 2009; 18 (2): 47–52.
8. Jančar N, Kocjan BJ, Poljak M, et al. Distribution of human papillomavirus genotypes in women with cervical cancer in Slovenia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2009; 145 (2):184–8.
9. Fujs Komloš K, Kocjan BJ, Košorok P, et al. Distribution of HPV genotypes in Slovenian patients with anal carcinoma: preliminary results. *Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat.* 2011; 20 (3): 141–3.
10. Kansky AA, Poljak M, Seme K, et al. Human papillomavirus DNA in oral squamous cell carcinomas and normal oral mucosa. *Acta Virol.* 2003; 47 (1): 11–6.
11. Poljak M, Gale N, Kambič V. Human papillomaviruses: a study of their prevalence in the epithelial hyperplastic lesions of the larynx. *Acta Otolaryngol Suppl.* 1997; 527: 66–9.
12. Poljak M, Cerar A. Human papillomavirus type 16 DNA in oesophageal squamous cell carcinoma. *Anticancer Res.* 1993; 13 (6A): 2113–6.
13. Poljak M, Cerar A, Seme K. Human papillomavirus infection in esophageal carcinomas: a study of 121 lesions using multiple broad-spectrum polymerase chain reactions and literature review. *Hum Pathol.* 1998; 29 (3): 266–71.
14. Odar K, Kocjan BJ, Hošnjak L, et al. Verrucous carcinoma of the head and neck - not a human papillomavirus-related tumour? *J Cell Mol Med.* 2014; 18 (4): 635–45.

Mateja M. Jelen¹, Boštjan J. Kocjan², Polona J. Maver Vodičar³, Lea Hošnjak⁴, Nina Jančar⁵, Mario Poljak⁶

Molekularna epidemiologija izbranih klinično pomembnih genotipov človeških papilomavirusov

Molecular Epidemiology of Selected Clinically Important Human Papillomavirus Genotypes

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: genomsko raznolikost, človeški papilomavirusi, HPV, Slovenija

Človeški papilomavirusi (angl. *human papillomavirus*, HPV) so zelo heterogena skupina DNA virusov, ki povzročajo različne benigne in maligne novotvorbe na koži in sluznicah. Glede na delež razlik v nukleotidnem zaporedju gena L1 jih delimo v rodove, vrste, genotipe in podtipe. Vsak genotip je v kliničnih vzorcih zastopan v obliki podtipskih različic (2 % nukleotidna neskladnost v genu L1), ki se lahko med seboj razlikujejo glede na njihov patogenetski potencial. Naša raziskovalna skupina je v obdobju 2007–2014 objavila 11 raziskav, v katerih je opredelila genetsko raznolikost 11 klinično pomembnih genotipov HPV: HPV-6, -11, -16, -18, -33, -38, -40, -42, -43, -44 in HPV-53. V raziskave smo vključili klinične vzorce iz različnih anatomskega mest okužbe. Z analizo delnih nukleotidnih zaporedij (~1.400–3.200 bp) in/ali celotnih genomov (~8.000 bp) izbranih genotipov HPV smo v gensko banko GenBank prispevali več kot 1.600 nukleotidnih zaporedij; od tega > 90 % vseh celotnih genomov HPV-6 in 70 % vseh celotnih genomov HPV-11. V prispevku so opisane raziskave, v katerih smo izvedli prve (filo)genetske analize na podlagi delnih nukleotidnih zaporedij in celotnih genomov HPV, predlagali klasifikacijski sistem za opredeljevanje genomskih različic HPV-6 in HPV-11, določili nove podtypeske različice HPV ter raziskali pojavnost genetskih različic HPV v benignih spremembah, ki jih povezujemo z nizkorizičnimi genotipi HPV.

¹ Dr. Mateja M. Jelen, univ. dipl. mikr., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

² Znan. sod. dr. Boštjan J. Kocjan, univ. dipl. mikr., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

³ Asist. dr. Polona J. Maver Vodičar, dr. med., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

⁴ Lea Hošnjak, univ. dipl. mikr., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

⁵ Doc. dr. Nina Jančar, dr. med., Klinični oddelek za reprodukcijo, Ginekološka klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Šljajmerjeva ulica 3, 1000 Ljubljana

⁶ Prof. dr. Mario Poljak, dr. med., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana; mario.poljak@mf.uni-lj.si

ABSTRACT

KEY WORDS: genomic diversity, human papillomaviruses, HPV, Slovenia

Human papillomaviruses (HPV) are a highly heterogenetic group of DNA viruses associated with various benign and malignant neoplastic lesions in both skin and mucosa. According to the nucleotide similarity within the L1 gene, they are divided into genera, species, genotypes and subtypes. In clinical samples, each HPV genotype is represented in the form of genomic variants, which exhibit 2% genetic distance within the L1 gene and may differ in their pathogenicity. In the period of 2007–2014, our research group has published 11 genomic diversity studies, analyzing a total of 11 clinically important HPV genotypes: HPV-6, -11, 16, -18, -33, -38, -40, -42, -43, -44 and HPV-53. All studies included clinically important samples from different anatomical sites of infection. By analyzing partial (~1,400–3,200 bp) and complete (~8,000 bp) nucleotide sequences of the selected HPV genotypes, our research group identified several novel genomic variants and contributed more than 1,600 nucleotide sequences to the GenBank database; of these, more than 90% and 70% of all HPV-6 and HPV-11 currently available complete genomes, respectively. The article summarizes our first comprehensive partial and/or complete HPV genome (phylo)genetic analyses, establishment of classification system for HPV-6 and HPV-11 genomic variants, identification of several novel HPV genomic variants, including the study of occurrence and persistence of specific genomic variants in common benign manifestations related to low-risk HPV infections.

UVOD

Človeški papilomavirusi (angl. *human papillomavirus*, HPV) iz družine *Papillomaviridae* so genetsko zelo heterogena skupina DNA virusov, ki povzročajo različne benigne in maligne novotvorbe kože in sluznic. Glede na skladnost v nukleotidnem zaporedju gena L1 jih delimo v rodove (skladnost < 60 %), vrste (60–70 % skladnost), genotipe (71–89 % skladnost) in podtipe (90–98 % skladnost). Do septembra 2014 je bilo opredeljenih 195 genotipov HPV, ki jih uvrščamo v 5 rodov: alfa, beta, gama, mu in nu. Klinično najpomembnejši so sluznični genotipi HPV iz rodu alfa, ki jih glede na vrsto novotvorb delimo na visokorizične, nizkorizične in genotipe z nejasnim rakotvornim potencialom (1–3).

Vsak genotip HPV je v kliničnih vzorcih zastopan v obliki zelo sorodnih podtipskih različic, ki se od nukleotidnega zaporedja referenčnega izolata istega ge-

notipa v genu L1 razlikujejo v manj kot 2 % ali v zaporedju LCR v manj kot 5 % (3, 4). Številne raziskave so pokazale, da lahko različne podtipske različice določenega genotipa prispevajo k večji ali manjši patogenosti virusa. Raziskave visokorizičnih genotipov HPV-16 in HPV-18 so potrdile povezave med določenimi podtipskimi različicami, njihovim (etno)geografskim izvorom, virusno perzistenco ter večjim tveganjem za razvoj predrakavih in rakavih sprememb (5, 6).

Medtem ko je raziskovanje genomske raznolikosti in kliničnega pomena podtipskih različic visokorizičnih genotipov HPV v ospredju že dobri dve desetletji, je bilo raziskovanje genomske raznolikosti nizkorizičnih genotipov HPV (z izjemo HPV-6 in HPV-11), genotipov HPV z nejasnim rakotvornim potencialom in genotipov HPV iz drugih rodov zapostavljeno (5–9). K boljšemu razumevanju genomske raznolikosti omenjenih genotipov HPV je

pomembno prispevala tudi naša raziskovalna skupina.

V obdobju 2007–2014 smo objavili 11 raziskav, v katerih smo opredelili genomsko raznolikost 11 klinično pomembnih genotipov HPV (tabela 1) (10–20). V vse raziskave smo vključili klinično pomembne vzorce iz različnih anatomskih mest okužbe pri slovenskih bolnikih, z izjemo raziskave svetovne genomske raznolikosti HPV-6, kjer smo vzorce pridobili iz 15 držav po vsem svetu. Raziskave smo objavili v priznanih mednarodnih revijah in v gensko banko GenBank prispevali več kot 1.600 nukleotidnih zaporedij HPV; od tega > 90 % (177/190) vseh dostopnih celotnih genomov (CG) HPV-6, 70 % (34/49) vseh CG HPV-11, > 80 % (117/134) vseh nukleotidnih zaporedij HPV-38, > 70 % (147/205) vseh zaporedij HPV-42 in 40–60 % vseh nukleotidnih zaporedij HPV-40, -43, -44, -44s in HPV-53 (tabela 1). V prispevku bomo na kratko povzeli rezultate omenjenih slovenskih raziskav. Povzetke smo razdelili v štiri sklope: visokorizični genotipi HPV-16, HPV-18 in HPV-33; genotip HPV-53 z nejasnim rakotvornim potencialom; nizkorizični genotipi HPV-6, -11, -40, -42, -43, -44 in genotip HPV-38 iz rodu beta.

VISOKORIZIČNI GENOTIPI HPV-16, HPV-18 IN HPV-33

Leta 2010 smo objavili raziskavo, v kateri smo določili genomsko raznolikost treh najpogostejših genotipov HPV pri slovenskih ženskah z rakom materničnega vratu (RMV): HPV-16, HPV-18 in HPV-33 (13). Posamezne genotipe HPV smo analizirali v genomskih področjih LCR, E6 in E7 (tabela 1). Določili smo 26 različic med 40 vzorci HPV-16, 18 različic med 20 vzorci HPV-18 in 7 različic med 11 vzorci HPV-33. Med HPV-16 in HPV-18-pozitivnimi vzorci so prevladovala evropske različice (95 %), medtem ko je bil delež prototipskih (sorodni referenčnemu izolatu) in

ne-prototipskih (manj sorodni referenčnemu izolatu) različic pri HPV-33 skoraj enak (45,5 % vs. 54,5 %).

GENOTIP HPV-53 Z NEJASNIM RAKOTVORNIM POTENCIALOM

Genomsko raznolikost genotipa HPV-53 smo opredelili na 94 citološko opredeljenih brisih MV, pridobljenih pri rutinskem testiranju na prisotnost HPV DNA pri 70 slovenskih ženskah (10). Genomsko raznolikost HPV-53 smo določili v treh genomskih področjih: LCR, E6 in E7, opredelili 19 različic HPV-53 in v gensko banko prispevali 42 % (210/498) vseh nukleotidnih zaporedij HPV-53 (tabela 1). Potrdili smo dihonomno filogenetsko razporeditev podtipskih različic HPV-53 in pokazali, da je bila genomsko raznolikost HPV-53 v entogeografsko-zaprti kohorti slovenskih žensk višja v primerjavi z genomsko raznolikostjo HPV-53, ki je bila predhodno opredeljena na vzorcih, pridobljenih iz sedmih geografskih, etnološko ločenih kohort (21). Pri 16 ženskah s perzistentno okužbo s HPV-53 smo v prvem odvzetem kliničnem vzorcu in v vzorcu po 6 do 51 mesecih spremljanja našli isto različico HPV-53 (10).

NIZKORIZIČNI GENOTIPI HPV-6 in HPV-11

Na področju raziskovanja genomske raznolikosti dveh medicinsko najpomembnejših nizkorizičnih genotipov (HPV-6 in HPV-11) je naša raziskovalna skupina objavila sedem raziskav, ki so pomembno prispevale k boljšemu razumevanju (filo)genetske raznolikosti HPV-6/-11, njune patogeneze in molekularne evolucije (11, 14–19).

V prvi slovenski raziskavi na področju genomske raznolikosti HPV-6 leta 2009 smo z analizo genomskih področij L1, LCR, E6, E2, E5a in E5b na 77 HPV-6-pozitivnih vzorcih iz anogenitalnega predela in predela glave in vratu opredelili 36 različic HPV-6, med katerimi so ne glede

na anatomsko mesto okužbe prevladovala ne-prototipske različice (tabela 1) (11). Potrdili in odkrili smo nove nukleotidne in aminokislinske spremembe ter napake v referenčnih nukleotidnih zaporedjih HPV-6. V raziskavi, ki je sledila, smo analizirali najbolj raznolike različice HPV-6 iz prejšnje raziskave in jim določili CG (11, 15). S to raziskavo smo do leta 2011 v gensko banko GenBank prispevali največje število CG HPV-6, naredili prvo filogenetsko analizo na podlagi CG HPV-6 in pokazali, da so nukleotidne spremembe najpogostejše v genih E4, E5a, E5b ter nekodirajočem področju LCR.

V sodelovanju z raziskovalci iz 15 držav s šestih celin (Evropa, Azija, Severna in Južna Amerika, Avstralija ter Afrika) smo nedavno opredelili tudi svetovno genomsko raznolikost HPV-6 na do sedaj največjem številu HPV-6 klinično pomembnih vzorcev (tabela 1) (19). V raziskavo smo vključili 530 HPV-6-pozitivnih vzorcev iz anogenitalnega predela in predela glave in vratu ter podtipske različice HPV-6 analizirali v področjih E5a, E5b, L1 in LCR. Najbolj raznolikim različicam smo določili CG in tako v gensko banko GenBank prispevali 130 novih CG HPV-6 (tabela 1). Na podlagi prve globalne analize 190 CG HPV-6 (130 CG iz naše raziskave in 60 iz GenBank) in sistema za poimenovanje genetskih (pod)linij HPV-6/-11, ki ga je skupaj s sodelavci z Univerze Alberta Einsteina v New Yorku predlagala naša raziskovalna skupina, smo določili genetske linije in nove genetske podlinije HPV-6: linija A in B (razlikovanje v 1–10 % CG) ter pet podlinij B1–B5 (razlikovanje v 0,5–1 % CG) (14, 19). Dokazali smo tudi (pod)linijsko-specifične polimorfizme posameznih nukleotidov, opredelili najkrajše nukleotidno zaporedje, s pomočjo katerega lahko podtipske različice HPV-6 umestimo v obstoječe genetske (pod)linije ter prvič dokazali povezave med (pod)linijami

HPV-6, geografskim izvorom, spolom in anatomskim mestom okužbe (19).

Naša raziskovalna skupina je opredelila tudi genomsko raznolikost drugega medicinsko najpomembnejšega nizkorizičnega genotipa – HPV-11. Z analizo 63 HPV-11-pozitivnih vzorcev, ki so bili odvzeti slovenskim bolnikom iz različnih anatomskih mest okužbe (anogenitalni predel in predel glave in vratu), smo leta 2011 v področjih L1, LCR, E6, E5a in E5b opredelili 23 podtipskih različic HPV-11, med katerimi so prevladovala ne-prototipske različice (16). Desetim najbolj raznolikim različicam smo opredelili CG in tako prispevali največje število CG HPV-11 v gensko banko GenBank (tabela 1). S prvo (filo)genetsko analizo CG HPV-11 smo pokazali, da je genomsko raznolikost HPV-11 pomembno manjša v primerjavi z do takrat opredeljenimi genotipi HPV, vključno z njegovim najbližjim sorodnikom HPV-6.

V raziskavi, ki je sledila, so Burk in sodelavci iz našega laboratorija (2011) na podlagi analize CG HPV-6/-11 določili kriterije za opredeljevanje in poimenovanje genetskih (pod)linij HPV-6/-11 (14).

V letu 2013 smo raziskali raznolikost različic HPV-6 v genomskih področjih L1, E5a, E5b in LCR, v 45 tkivnih vzorcih sočasno pojavljajočih multiplih anogenitalnih bradavic (AGB), odvzetih 18 slovenskim bolnikom (17). Pri 17/18 bolnikih smo opisali prisotnost identične različice HPV-6 in pri enem bolniku sočasno okužbo z dvema različicama HPV-6. Izsledki raziskave so potrdili hipotezo, da sočasno pojavljajoče AGB povzroča ena sama identična različica HPV-6. Podobno raziskavo smo objavili tudi na podlagi analize genomskih področij E5a, LCR in/ali CG pri 70 slovenskih bolnikih s ponavljajočimi papilomi grla, v kateri smo spremljali prisotnost različic HPV-6/-11 v obdobju 1 do 22 let (18). V 67/70 (95,7 %) primerov smo potrdili perzistentno prisotnost ene same različice HPV-6/-11 in s tem pokazali, da

je ponoven zagon papilomov grla najverjetneje posledica dolgotrajne prisotnosti ene same identične različice HPV-6/-11.

Do sedaj je naša raziskovalna skupina v gensko banko GenBank prispevala > 90 % (177/190) vseh dostopnih CG HPV-

6 in 70 % (34/49) vseh CG HPV-11. Glede na to, da trenutno raziskujemo tudi svetovno genomsko raznolikost HPV-11, pričakujemo, da bomo v letu 2015 v gensko banko prispevali pomembno število novih CG HPV-11.

Tabela 1. Pregled slovenskih raziskav genomske raznolikosti 11 klinično pomembnih genotipov HPV glede na raziskano genomsko področje, tip kliničnih vzorcev, pristopne številke nukleotidnih zaporedij v genski banki GenBank in celokupen prispevek opredeljenih nukleotidnih zaporedij. AGB – anogenitalne bradavice, bp – bazni par, CG – celotni genom, LCR – nekodirajoče, kontrolno področje, LP – papilomi grla, MV – maternični vrat, RMV – rak materničnega vratu.

Genotip HPV (rod, vrsta)	Raziskana genomska področja	Tip kliničnih vzorcev	Pristopne številke v genski banki GenBank	Št. prispevanih nukleotidnih zaporedij/ št. zaporedij v GenBank glede na obravnavan genotip HPV		Leto objave (vir)
				Delna zaporedja (~300-1.500 bp)	Celotni genomi (~8.000 bp)	
53 (alfa, α 6)	LCR, E6, E7 (~1.400 bp)	brisi MV ^a	AM283253-462	210/498 (42 %)	/	2007 (10)
6 (alfa, α 10)	L1, LCR, E6, E2, E5a, E5b (~3.800 bp)	AGB, LP	FM875941-999 FM876000-210 FM897006-197	462/1.154 (40 %)	/	2009 (11)
38 (beta, β 2)	L1, E6, E7 (~1.500 bp)	dlačni mešički ^b	AM943405-443 AM943898-975	117/134 (87 %)	/	2009 (12)
16 (alfa, α 9) 18 (alfa, α 7) 33 (alfa, α 9)	LCR, E6, E7 (~1.700 bp)	RMV	/	213	/	2010 (13)
6 (alfa, α 10)	CG (~8.000 bp)	AGB, LP	FR751320-338	/	19/190 (10 %)	2011 (15)
11 (alfa, α 10)	L1, LCR, E6, E5a, E5b (~3.200 bp) CG (~8.000 bp)	analni brisi, AGB, brisi MV ^a , LP	FN870021-022 FN907957-964 FN870435-623 FN870625-750	315/663 (48 %)	10/49 (20 %)	2011 (16)
6 (alfa, α 10) 11 (alfa, α 10)	CG (~8.000 bp)	LP	HE599226-246 HE962026-032 HE611258-274 HE962023-025 HE962365-368	/	HPV-6: 28/190 (15 %) HPV-11: 24/49 (49 %)	2013 (18)
6 (alfa, α 10)	CG ^c (~8.000 bp)	brisi MV ^a , AGB, LP	HG793809-938	/	130/190 (68 %)	2014 (19)
40 (alfa, α 1) 42 (alfa, α 8) 43 (alfa, α 8) 44 (alfa, α 1)	L1, LCR, E6 (~2.800 bp)	analni brisi, brisi MV ^a	HE793033-074 HE820129-275 HE962401-430 HE963117-221	HPV-40: 42/75 (56 %) HPV-42: 147/205 (72 %) HPV-43: 30/55 (55 %) HPV-44/-44s: 39/95 (41 %)/66/114 (58 %)	/	2014 (20)

^a Brisi MV z opredeljenim citološkim/histološkim izvidom.

^b Dlačni mešički dlak iz področja pubisa, skrotuma, perianalnega predela in obrvi.

^c HPV-6-pozitivni vzorci iz 15 držav (Slovenija, Hrvaška, Češka, Nemčija, Švica, Litva, Velika Britanija, Japonska, Hong Kong, Malezija, ZDA, Kanada, Argentina, Avstralija, Južna Afrika).

HPV-40, HPV-42, HPV-43 in HPV-44

Nedavno smo opredelili tudi genomsko raznolikost genotipov HPV-40, HPV-42, HPV-43 in HPV-44, in sicer v treh genomskih področjih: L1, LCR in E6. V raziskavo smo vključili 108 kliničnih vzorcev (analne brise, tkivne vzorce AGB in histološko opredeljene brise MV) (tabela 1) (20). Določili smo 9 različic med 14 vzorci HPV-40, 30 različic med 49 vzorci HPV-42, 3 različice med 10 vzorci HPV-43 ter 8 različic HPV-44 in 11 različic podtipa HPV-44s (HPV-55) med 35 vzorci HPV-44. Z navedeno raziskavo smo prvič določili genomsko raznolikost nizkorizičnih genotipov HPV-40, HPV-42 in HPV-43 ter pokazali, da je genomski raznolikosti HPV-44 na našem geografskem področju podobna genomski raznolikosti HPV-44 na svetovnem nivoju (20, 22). V gensko banko GenBank smo prispevali > 70 % (147/205) vseh nukleotidnih zaporedij HPV-42, 58 % (66/114) vseh zaporedij HPV-44s,

56 % (42/75) vseh zaporedij HPV-40, 55 % (30/55) vseh zaporedij HPV-43 ter 41 % (39/95) vseh zaporedij HPV-44.

GENOTIP HPV-38 IZ RODU BETA

Genomsko raznolikost genotipa HPV-38, ki ga povezujemo z nastankom kožnega raka, smo leta 2009 analizirali na 39 HPV-38-pozitivnih vzorcih, pridobljenih od 31 imunokompetentnih, zdravih moških, katerim so odvzeli dlake iz različnih predelov telesa (pubis, skrotum, perianalni predel in obrvi) (tabela 1) (12). Dočetka omenjene raziskave je bilo predhodno opredeljenih le pet različic HPV-38. Opredelili smo 12 novih slovenskih različic HPV-38 in v štirih vzorcih sočasno prisotnost vsaj dveh različic HPV-38, kar nakazuje možnost sočasne okužbe z različnimi različicami HPV-38. S to raziskavo smo v gensko banko GenBank prispevali > 80 % (117/134) vseh nukleotidnih zaporedij HPV-38.

LITERATURA

1. Human papillomavirus reference clones [internet]. Karolinska Institutet, Stockholm: International Human Papillomavirus Reference Center. 2012 [citirano 2014 Sep 9]. Dosegljivo na: <http://www.hpvcenter.se/html/refclones.html>
2. Kocjan BJ, Poljak M. Papilomavirusi. In: Poljak M, Petrovec M, eds. Medicinska virologija. Ljubljana, Medicinski razgledi; 2011. p. 41–60.
3. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, et al. Classification of papillomaviruses. *Virology*. 2004; 324 (1): 17–27.
4. Bernard HU. Taxonomy and phylogeny of papillomaviruses: an overview and recent developments. *Infect Genet Evol*. 2013; 18: 357–61.
5. Bernard HU, Calleja-Macias IE, Dunn ST. Genome variation of human papillomavirus types: phylogenetic and medical implications. *Int J Cancer*. 2006; 118 (5): 1071–6.
6. Burk RD, Harari A, Chen Z. Human papillomavirus genome variants. *Virology*. 2013; 445 (1-2): 232–43.
7. Ho L, Chan SY, Burk RD, et al. The genetic drift of human papillomavirus type 16 is a means of reconstructing prehistoric viral spread and the movement of ancient human populations. *J Virol*. 1993; 67 (11): 6413–23.
8. Chen Z, Schiffman M, Herrero R, et al. Evolution and taxonomic classification of human papillomavirus 16 (HPV16)-related variant genomes: HPV31, HPV33, HPV35, HPV52, HPV58 and HPV67. *PLoS One*. 2011; 6 (5): e20183.
9. Chen Z, Schiffman M, Herrero R, et al. Evolution and taxonomic classification of alphapapillomavirus 7 complete genomes: HPV18, HPV39, HPV45, HPV59, HPV68 and HPV70. *PLoS One*. 2013; 8 (8): e72565.
10. Kocjan BJ, Seme K, Močilnik T, et al. Genomic diversity of human papillomavirus genotype 53 in an ethnogeographically closed cohort of white European women. *J Med Virol*. 2007; 79 (4): 431–8.
11. Kocjan BJ, Poljak M, Cimerman M, et al. Pre-vaccination genomic diversity of human papillomavirus genotype 6 (HPV 6). *Virology*. 2009; 391 (2): 274–83.
12. Kocjan BJ, Seme K, Cimerman M, et al. Genomic diversity of human papillomavirus (HPV) genotype 38. *J Med Virol*. 2009; 81 (2): 288–95.
13. Vrtačnik Bokal E, Kocjan BJ, Poljak M, et al. Genomic variants of human papillomavirus genotypes 16, 18, and 33 in women with cervical cancer in Slovenia. *J Obstet Gynaecol Res*. 2010; 36 (6): 1204–13.
14. Burk RD, Chen Z, Harari A, et al. Classification and nomenclature system for human Alphapapillomavirus variants: general features, nucleotide landmarks and assignment of HPV6 and HPV11 isolates to variant lineages. *Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat*. 2011; 20 (3): 113–23.
15. Kocjan BJ, Jelen MM, Maver PJ, et al. Pre-vaccination genomic diversity of human papillomavirus genotype 6 (HPV 6): a comparative analysis of 21 full-length genome sequences. *Infect Genet Evol*. 2011; 11 (7): 1805–10.
16. Maver PJ, Kocjan BJ, Seme K, et al. Pre-vaccination genomic diversity of human papillomavirus genotype 11: a study on 63 clinical isolates and 10 full-length genome sequences. *J Med Virol*. 2011; 83 (3): 461–70.
17. Fujs Komloš K, Košorok P, Kocjan BJ, et al. Genetic diversity of HPV-6 in concurrent multiple anogenital warts. *Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat*. 2013; 22 (1): 31–3.
18. Kocjan BJ, Gale N, Hočevar Boltežar I, et al. Identical human papillomavirus (HPV) genomic variants persist in recurrent respiratory papillomatosis for up to 22 years. *J Infect Dis*. 2013; 207 (4): 583–87.
19. Jelen MM, Chen Z, Kocjan BJ, et al. Global genomic diversity of human papillomavirus type 6 (HPV6) based on 724 isolates and 190 complete genome sequences. *J Virol*. 2014; 88 (13): 7307–16.
20. Maver PJ, Kocjan BJ, Seme K, et al. Genomic diversity of low-risk human papillomavirus genotypes HPV 40, HPV 42, HPV 43, and HPV 44. *J Med Virol*. 2014; 86 (2): 272–82.
21. Prado JC, Calleja-Macias IE, Bernard HU, et al. Worldwide genomic diversity of the human papillomaviruses-53, 56, and 66, a group of high-risk HPVs unrelated to HPV-16 and HPV-18. *Virology*. 2005; 340 (1): 95–104.
22. Calleja-Macias IE, Kalantari M, Allan B, et al. Papillomavirus subtypes are natural and old taxa: phylogeny of human papillomavirus types 44 and 55 and 68a and -b. *J Virol*. 2005; 79 (10): 6565–9.

Mario Poljak¹, Anja Oštrbenk²

Kdaj in zakaj uporabljamo HPV test?

When and Why Are We Using the HPV Test?

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: človeški papilomavirusi, HPV, rak materničnega vratu, presejalni program, testiranje na HPV

Dolgotrajna okužba s človeškimi papilomavirusi (angl. *human papillomaviruses*, HPV) je nujen, ne pa tudi zadosten vzrok za nastanek raka materničnega vratu, etiološko je povezana tudi s pomembnim deležem raka zadnjika, nožnice, penisa, ženskega zunanje- ga spolovila (vulve) in raka ustnega dela žrela. Za rutinsko dokazovanje okužbe s HPV lahko uporabljamo izključno klinično preverjene teste HPV, ki izpolnjujejo dogovorjene mednarodne standarde za klinično občutljivost, klinično specifičnost ter znotraj- in medlaboratorijsko ponovljivost. V Sloveniji se test HPV uporablja le kot pomoč pri odločitvi, ali ženska potrebuje kolposkopski pregled ali ne (triažni test HPV). Trenutne indikacije za uporabo triažnega testa HPV v Sloveniji so: (i) atipične ploščate celice, neopredeljene; (ii) ploščatocelična intraepitelijska neoplazija nizke stopnje, pri ženskah, starih 35 let ali več; (iii) atipične žlezne celice, neopredeljene; (iv) spremljanje žensk s cervikalno intraepitelijsko neoplazijo prve stopnje; (v) sledenje po zdravljenju s konizacijo, diagnostično ekscizijo z električno zanko, krioterapijo ali lasersko ablacijo zaradi cervikalne intraepitelijske neoplazije. Po skoraj pet-letni uporabi triažnega testa HPV v Sloveniji lahko zaključimo, da ima triažni test HPV ob upoštevanju priporočenih indikacij pomembno vlogo pri zmanjševanju nepotrebnih kolposkopij in pri bolj varnemu vračanju žensk v redni presejalni program ter na drugi strani pri prepoznavi žensk s povečanim tveganjem za predrakave in rakave spremembe, ki potrebujejo zdravljenje. V nasprotju z uveljavljeno in priporočeno uporabo testa HPV pri ženskah, je morebitna korist rutinskega testiranja na HPV pri moških nejasna in jo trenutno odsvetujejo vsa svetovna strokovna združenja.

ABSTRACT

KEY WORDS: human papillomavirus, HPV, cervical cancer, screening program, HPV testing

Persistent infection with human papillomaviruses (HPV) is a necessary but not sufficient factor for the development of cervical cancer as well as for the significant proportion of cancers of anus, vagina, penis, vulva and oropharynx. Only clinically validated HPV tests which meet the criteria of international standards for clinical sensitivity, cli-

¹ Prof. dr. Mario Poljak, dr. med., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana; mario.poljak@mf.uni-lj.si

² Anja Oštrbenk, univ. dipl. mikr., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

nical specificity and intra- and interlaboratory reproducibility should be used in clinical practice. In Slovenia, the HPV test is reimbursed according to national guidelines for the following five indications: (i) triage of women with atypical squamous cells of undetermined significance; (ii) triage of women above 35 years with low grade squamous intraepithelial lesions; (iii) triage of women with atypical glandular cells not otherwise specified; (iv) for triage of women with cervical intraepithelial neoplasia grade 1 and for (v) prediction of the therapeutic outcome after treatment of cervical intraepithelial neoplasia. Based on five-year experience with HPV triage tests in Slovenia, there is already substantial evidence that HPV testing significantly reduces the number of women referred to colposcopy and enables their safe return to the screening program. It also plays an important role for the identification of women with higher risk for premalignant and malignant cervical lesions that require treatment. In contrast to the well established role of HPV testing in cervical cancer screening, the potential benefit of HPV testing in males is still unclear and HPV tests are at present not recommended to be used in males.

UVOD

Človeški papilomavirusi (angl. *human papillomaviruses*, HPV) so DNA-virusi, vzročno povezani z nastankom različnih benignih, predrakavih in rakavih sprememb sluznice in kože pri človeku. Na osnovi podobnosti v genomu je več kot 199 do sedaj znanih genotipov HPV razvrščenih v pet rodov, imenovanih alfa, beta, gama, mu in nu (1, 2). Za človeka so najpomembnejši virusi iz rodu alfa, in sicer približno 40 genotipov, ki jih imenujemo tudi sluznični ali anogenitalni genotipi HPV (1). Visokorizični genotipi HPV iz rodu alfa (12 genotipov; najpomembnejša sta HPV-16 in HPV-18) so odgovorni za nastanek skoraj vseh primerov raka materničnega vratu in raka zadnjika ter njegovih predrakavih predstopenj visoke stopnje, povzročajo pa tudi pomemben delež raka nožnice, penisa, ženskega zunanlega spolovila (vulve) in raka ustnega dela žrela (1, 3, 4).

OSNOVNI KONCEPT DIAGNOSTIKE OKUŽBE Z IZBRANIMI GENOTIPI HPV IZ RODU ALFA

Za klinične namene vse trenutno veljavne smernice priporočajo rutinsko določanje prisotnosti le 12–14 visokorizičnih geno-

tipov HPV iz rodu alfa, dokazovanje ostalih genotipov iz rodu alfa in iz ostalih rodov HPV je priporočeno le v raziskovalne namene (5–7). HPV dokazujemo skorajda izključno z molekularnimi metodami (7). Okužbo s HPV je sicer mogoče dokazati tudi z opazovanjem značilnih citopatskih sprememb epitelnih celic s svetlobnim mikroskopom, z opazovanjem virusnih delcev s pomočjo elektronskega mikroskopa ali z dokazovanjem virusnih strukturnih beljakovin z uporabo poliklonskih protiteles z imunohistokemično metodo, vendar se zaradi nizke občutljivosti in nezmožnosti določanja genotipa HPV te metode ne uporabljajo v rutinski diagnostiki okužb s HPV (7, 8).

Smernice, ki narekujejo uporabo testov HPV, temeljijo izključno na uporabi klinično preverjenih testov (5, 9, 10). Po naših podatkih je bilo na svetovnem tržišču ob koncu leta 2014 vsaj 145 različnih komercialno dostopnih testov za dokazovanje HPV iz rodu alfa in vsaj 90 njihovih različic (7). Kljub tako velikemu številu testov, smo po nedavnem natančnem pregledu objav v medicinskih časopisih ugotovili, da le zelo omejeno število testov HPV na tržišču (manj kot desetina) zadovoljuje mi-

nimalne kriterije za varno uporabo v klinične namene za vsaj eno od dogovorjenih kliničnih indikacij. Poleg tega za več kot tri četrtine testov HPV, ki so trenutno komercialno dostopni, kljub obsežnemu pregledu literature, nismo našli niti ene same objave v recenziranih znanstvenih revijah. Enoten zaključek vseh strokovnjakov je, da tako komercialno dostopnih testov HPV kot tistih, razvitih v laboratoriju (angl. *in-house tests*), ki niso bili ustrezno klinično preverjeni, ne smemo uporabljati v klinični praksi. Zaradi pomanjkanja predpisov in šibke kontrole na tem področju se na žalost po vsem svetu v vsakdanji praksi uporabljajo številni testi HPV, ki niso klinično preverjeni. To se na srečo v Sloveniji zaenkrat ne dogaja in močno upamo, da bo tako ostalo tudi v prihodnje (5, 7).

Podobno kot drugi mikrobiološki testi, ki jih uporabljamo v medicini, mora vsak nov test HPV, ki naj bi ga uporabljali v klinični praksi, izpolnjevati dogovorjene standarde za klinično specifičnost in občutljivost. Da bi olajšali uvedbo novih komercialno dostopnih testov HPV, so nedavno objavili mednarodna strokovna priporočila o tem, kako ustrezno ovrednotiti novo razvite teste HPV predvsem za varno uporabo v primarnem presejalnem testiranju za zgodnje odkrivanje raka materničnega vratu ter za druge klinične indikacije. Mednarodna priporočila temeljijo na tem, da morajo testi HPV izpolnjevati vse dogovorjene standarde za klinično občutljivost, klinično specifičnost in znotraj- in medlaboratorijsko ponovljivost, medtem ko se lahko razlikujejo glede na tehnologijo testiranja, stopnjo avtomatizacije, materialne stroške testiranja in sposobnost analize različno velikega števila vzorcev (7, 11).

Testiranje na HPV za boljše prepoznavanje žensk z večjim tveganjem za raka materničnega vratu se bistveno razlikuje od molekularnega testiranja na druge medicinsko pomembne viruse, ker viso-

ka analitična občutljivost testa ni glavni kriterij za njegovo dobro klinično uporabnost. Kljub temu dejstvu ima več kot tri četrtine komercialno dostopnih testov HPV, ki se trenutno uporabljajo po svetu, previsoko analitično občutljivost, ki vodi v prekomerno odkrivanje prehodnih klinično nemih in produktivnih okužb (s čimer narašča število nepotrebnih kolposkopij in biopsij), slabo korelacijo testa HPV s histologijo, nepotrebno zdravljenje in posledično v zdravnikovo nezaupanje pozitivnim rezultatom testa HPV (5, 7).

Druga posebnost testov HPV v primerjavi z drugimi mikrobiološkimi testi je ta, da je za boljše prepoznavanje žensk z večjim tveganjem za raka materničnega vratu potrebno uravnovesiti in zmanjšati število tarčnih genotipov HPV v testu. Tako je pri načrtovanju novega testa HPV, ki naj bi se uporabljal za dogovorjene klinične indikacije, potrebno zelo dobro pretehtati, kako uskladiti klinično občutljivost s klinično specifičnostjo za odkrivanje predrakavih sprememb. Z vključitvijo genotipov HPV, ki so pogosti pri nemih okužbah ali predrakavih spremembah nizke stopnje in le redko ali izjemoma povezani z rakom materničnega vratu (npr. HPV-53 ali HPV-66), tvegamo zelo velik padec klinične specifičnosti testa HPV ob zanemarljivi izboljšavi občutljivosti. Prav tako je potrebno imeti v mislih, da ne glede na najvišjo možno analitično občutljivost testa HPV, s katerim izvedemo presejalno testiranje na rak materničnega vratu, negativni izvid ni nikoli popolno zagotovilo za odsotnost bolezni, zaradi mnogih drugih, od testa HPV-neodvisnih dejavnikov, kot so npr. nekvalitetno odvzet bris, za bris nedostopna sprememba, zamenjan vzorec, neprimeren transport vzorca, prisotnost bioloških in nebioloških zaviralcev v vzorcu, napaka izvajalca testiranja, zamenjava izvida ali neprimerno razumevanje rezultata testa (7, 12).

Glavni cilji za nadaljnje izboljšave testov HPV so avtomatizacija, boljša klinična občutljivost in višja klinična specifičnost. Raziskave razumevanja mehanizmov patogeneze napredovanja predrakavih sprememb do raka materničnega vratu ostajajo prednostna naloga, saj bi lahko rezultati takšnih raziskav privedli k odkritju novih bioloških označevalcev za cervikalno intraepitelijsko neoplazijo 3. stopnje (CIN3)/rak materničnega vratu, ki bi jih lahko uporabili kot nove tarče v obstoječih triažnih testih ali presejalnih programih (7, 13).

INDIKACIJE ZA UPORABO TESTA HPV V SLOVENIJI

Indikacije za uporabo testa HPV v Sloveniji, problemi povezani z nekritično uporabo ali neuporabo testa HPV ter obravnavo žensk z indikacijo za triažni test HPV v naši državi, so podrobno opisani v prispevkih Urške Ivanuš in Maje Primic Žakelj, objavljenih v Zborniku Obnovitvenega kolposkopskega tečaja 2013 in v Zborniku Obnovitvenega kolposkopskega tečaja s poudarkom na praktičnih veščinah 2014, ki sta prosto dostopna na spletnu (14, 15). V nadaljevanju bomo zato le na kratko predstavili indikacije za uporabo testa HPV v Sloveniji, vse podrobnosti lahko bralec najde v navedenih virih ali originalnih smernicah Državnega programa zgodnjega odkrivanja predrakavih sprememb materničnega vratu (DP ZORA) (14–17).

V Sloveniji se test HPV uporablja le kot pomoč pri odločitvi, ali ženska potrebuje kolposkopski pregled ali ne (triažni test HPV). Trenutne indikacije za uporabo triažnega testa HPV v Sloveniji so (14–17):

- atipične ploščate celice, neopredeljene (APC-N),
- ploščatocelična intraepitelijska neoplazija nizke stopnje (PIL-NS), pri ženskah, starih 35 let ali več,
- atipične žlezne celice, neopredeljene (AŽC-N),

- spremljanje žensk s cervikalno intraepitelijsko neoplazijo prve stopnje (CIN1) in
- sledenje po zdravljenju s konizacijo, diagnostično ekscizijo z električno zanko (angl. *large loop excision of the transformation zone*, LLETZ), krioterapijo ali lasersko ablacijo zaradi cervikalne intraepitelijske neoplazije (CIN).

Triažni test HPV skupaj s kontrolnim brisom materničnega vratu (BMV) (razen pri spremljanju CIN1) opravimo 6 do 12 mesecev po diagnozi, ki priporoča testiranje. Pozitiven triažni test HPV vodi v dodatno obravnavo – kolposkopijo in morebitno biopsijo. Pri ženskah s patološkimi spremembami visoke stopnje (patološke spremembe žleznih celic, atipične ploščate celice visoke stopnje (APC-VS), ploščatocelična intraepitelijska neoplazija visoke stopnje (PIL-VS) ali več) privzamemo, da so HPV pozitivne, in jih le na podlagi izvida kontrolnega BMV napotimo neposredno v kolposkopsko ambulanto brez testa HPV. Glede na dosedanje izkušnje s triažnim testom HPV v Sloveniji se je delež žensk, ki potrebujejo dodatno obravnavo, zaradi patološkega presejalnega brisa, pomembno zmanjšal, tako celokupno kot tudi po posameznih indikacijah.

V letu 2014 sta bili najpogostejši indikaciji za uporabo triažnega testa HPV v Sloveniji APC-N in CIN po zdravljenju, ki sta skupaj predstavljala okoli 80 % triažnega testiranja na HPV v tem letu. Skoraj 60 % žensk z indikacijo APC-N je bilo HPV-negativnih pri triažnem testiranju in so se tako lahko varno vrnile v presejanje brez nadaljnje diagnostične obravnave. V letu 2014 je imelo 83 % žensk, ki so bile zdravljene zaradi cervikalne intraepitelijske neoplazije 2. stopnje ali več (CIN2+), negativen izvid triažnega testa HPV. Tako se je zaradi uvedbe triažnega testa HPV znatno skrajšal tudi čas sledenja žensk, ki so bile zdravljene in so se lahko var-

neje in hitreje vrnilo v redno presejanje. Pri indikaciji PIL-NS pri ženskah, starejših od 35 let, je bil v letu 2014 delež žensk z negativnim rezultatom triažnega testa HPV bistveno manjši kot pri ostalih indikacijah (približno 40 %), vendar je tudi pri tej indikaciji triažni test HPV pomembno zmanjšal potrebo po dodatni diagnostični obravnavi žensk. Prav tako bo le približno 30 % žensk z diagnozo CIN1 potrebovalo nadaljnjo diagnostično obravnavo (HPV-pozitivne), ostale bodo po 12 mesecih vrnjene v redni program presejanja.

Po skoraj pet-letni uporabi triažnega testa HPV v Sloveniji in ob upoštevanju priporočenih petih indikacij lahko zaključimo, da ima triažni test HPV pomembno vlogo pri zmanjševanju nepotrebnih kolposkopij in pri bolj varnem vračanju žensk v redni presejalni program ter na drugi strani pri prepoznavi žensk s povečanim tveganjem za predrakave in rakave spremembe, ki potrebujejo zdravljenje.

TESTIRANJE NA HPV PRI MOŠKIH

Za razliko od uveljavljene uporabe testa HPV pri ženskah, trenutno vsa vodilna svetovna strokovna združenja odločno odsvetujejo uporabo testa HPV pri moških (18–20). Ameriški Center za preprečevanje in obvladovanje bolezni (angl. *Centers for Disease Control and Prevention*, CDC) v svojih zadnjih smernicah iz leta 2010 nedvomno navaja, da test HPV ni priporočljiv za presejalno testiranje za zgodnje odkrivanje raka materničnega vratu pri mlajših ženskah in za presejalno testiranje ostalih s HPV-povezanih rakov ali genitalnih bradavic, tako pri moških kot pri ženskah (18).

Test HPV naj se torej ne uporablja za (18):

- presejalno testiranje moških,
- presejalno testiranje partnerjev HPV-pozitivnih žensk in HPV-pozitivnih moških,
- presejalno testiranje mlajših žensk in

- presejalno testiranje drugih s HPV-povezanih bolezni, ki niso rak materničnega vratu, vključno z genitalnimi bradavicami.

International Union against Sexually Transmitted Infections (IUSTI) je leta 2012 izdala smernice za obvladovanje anogenitalnih bradavic, v katerih navajajo naslednja priporočila (19):

- Genotipizacija HPV (dokazovanje posameznih genotipov HPV) v primeru anogenitalnih bradavic ni klinično pomembna in se zato ne priporoča.
- Kljub temu, da nekateri zdravniki pri postavljanju diagnoze subkliničnih okužb s HPV uporabljajo test z očetno kislino, je njegova uporaba v diagnostiki in pri obvladovanju genitalnih bradavic še vedno sporna.
- Ob prvem pojavu anogenitalnih bradavic bi morali bolnikom v skladu z lokalnimi smernicami obvezno predlagati tudi presejalno testiranje na ostale spolno prenosljive bolezni.

Pri Ameriški agenciji za hrano in zdravila (angl. *Food and Drug Administration*, FDA) trenutno ni registriranega testa za ugotavljanje anogenitalne okužbe s HPV pri moških.

Za razliko od žensk so namreč pri moških koristi testiranja na HPV nejasne. Tudi če pri moškem dokažemo okužbo s HPV, ga ne moremo zdraviti, preden lezija ne postane klinično vidna in ni jasno, ali sploh zahteva zdravljenje. To pomeni, da klinično pomembnih lezij pri moškem v naravnem poteku bolezni s testiranjem na HPV ne odkrijemo nič prej, kot bi jo tudi sicer. Tudi ni jasno, kako naj HPV-pozitivne moške brez klinično vidnih lezij spremljamo, še posebej, ker so okužbe s HPV tudi pri moških izjemno pogoste, a večina klinično nepomembne (20).

LITERATURA

1. Cubie HA. Diseases associated with human papillomavirus infection. *Virology*. 2013; 445 (1-2): 21–34.
2. de Villiers EM. Cross-roads in the classification of papillomaviruses. *Virology*. 2013; 445 (1-2): 2–10.
3. Doorbar J, Quint W, Banks L, et al. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine*. 2012; 30 Suppl 5: F55–F70.
4. Schiffman M, Clifford G, Buonaguro FM. Classification of weakly carcinogenic human papillomavirus types: addressing the limits of epidemiology at the borderline. *Infect Agent Cancer*. 2009; 4: 8.
5. Arbyn M, Ronco G, Anttila A, et al. Evidence regarding human papillomavirus testing in secondary prevention of cervical cancer. *Vaccine*. 2012; 30 Suppl 5: F88–F99.
6. Castle PE. Abuses in human papillomavirus DNA testing. *Obstet Gynecol*. 2011; 118 (1): 1–3.
7. Poljak M, Cuzick J, Kocjan BJ, et al. Nucleic acid tests for the detection of alpha human papillomaviruses. *Vaccine*. 2012; 30 Suppl 5: F100–6.
8. Cubie HA, Cuschieri K. Understanding HPV tests and their appropriate applications. *Cytopathology*. 2013; 24 (5): 289–308.
9. Dillner J. Primary human papillomavirus testing in organized cervical screening. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2013; 25 (1): 11–6.
10. Luhn P, Wentzensen N. HPV-based tests for cervical cancer screening and management of cervical disease. *Curr Obstet Gynecol Rep*. 2013; 2 (2): 76–85.
11. Meijer CJ, Berkhof J, Castle PE, et al. Guidelines for human papillomavirus DNA test requirements for primary cervical cancer screening in women 30 years and older. *Int J Cancer*. 2009; 124 (3): 516–20.
12. Kinney W, Stoler MH, Castle PE. Special commentary: patient safety and the next generation of HPV DNA tests. *Am J Clin Pathol*. 2010; 134 (2): 193–9.
13. Gravitt PE, Coutlée F, Iftner T, et al. New technologies in cervical cancer screening. *Vaccine*. 2008; 26 Suppl 10: K42–52.
14. Ivanuš U, Primič Žakelj M. Pomen izvida testa HPV v kolposkopski ambulanti. In: Smrkolj Š, ed. Obnovitveni kolposkopski tečaj (zbornik); 2013 Mar 29–30; Ljubljana (Slovenia). Ljubljana: Združenje za ginekološko onkologijo, kolposkopijo in cervikalno patologijo SZD in Onkološki inštitut; 2013. p. 78–101.
15. Ivanuš U, Primič Žakelj M. Obravnava žensk z indikacijo za triažni test HPV. In: Smrkolj Š, ed. Obnovitveni kolposkopski tečaj s poudarkom na praktičnih veščinah (zbornik); 2014 Mar 21; Ljubljana (Slovenia). Ljubljana: Združenje za ginekološko onkologijo, kolposkopijo in cervikalno patologijo SZD in Onkološki inštitut; 2014. p. 48–69.
16. Vrščaj Uršič M, ed. Smernice za celostno obravnavo žensk s predrakavimi spremembami materničnega vratu. Ljubljana: Onkološki inštitut Ljubljana 2006; posodobitev 2011.
17. Vrščaj Uršič M, ed. Postopki za odkrivanje in obravnavo žensk s predrakavimi spremembami materničnega vratu. Ljubljana: Onkološki inštitut Ljubljana; 2011.
18. Dunne EF, Friedman A, Datta SD, et al. Updates on human papillomavirus and genital warts and counseling messages from the 2010 Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines. *Clin Infect Dis*. 2011; 53 Suppl 3: S143–52.
19. Lacey CJ, Woodhall SC, Wikstrom A, et al. 2012 European guideline for the management of anogenital warts. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2013; 27 (3): e263–70.
20. Poljak M, Zorn B, Ivanuš U. HPV testiranje pri moških?. In: Smrkolj Š, ed. Obnovitveni kolposkopski tečaj s poudarkom na praktičnih veščinah (zbornik); 2014 Mar 21; Ljubljana (Slovenia). Ljubljana: Združenje za ginekološko onkologijo, kolposkopijo in cervikalno patologijo SZD in Onkološki inštitut; 2014. p. 70–5.

Maja Primic Žakelj¹, Urška Ivanuš²

Državni presejalni program za raka materničnega vratu ZORA: zgodba o uspehu

National Cervical Cancer Screening Program ZORA: A Story of Success

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: presejanje za raka materničnega vratu, organiziran presejalni program, pregledanost, izvidi citoloških brisov

V Sloveniji imamo organizirani populacijski presejalni program za zgodnje odkrivanje predrakavih sprememb materničnega vratu ZORA že od leta 2003. Vanj so vključene ženske, stare 20–64 let, ki se na presejalni pregled enkrat v treh letih lahko naročijo same ali pa jih nanj povabi izbrani ginekolog ali koordinacijski center. Slovenske ženske so presejalni program ZORA dobro sprejele in več kot 70 % se jih redno udeležuje presejalnih pregledov. Slovenija se lahko pohvali, da se je v desetih letih delovanja državnega programa ZORA incidenca raka materničnega vratu skoraj prepopolovila, kar je tudi v evropskem merilu velik uspeh. Prispevek prikazuje nastajanje in delovanje programa ZORA, osnovne kazalnike delovanja programa v letih 2003–2013 in izzive za naslednje desetletje.

ABSTRACT

KEY WORDS: cervical cancer screening, organised screening program, coverage, smear reports

Organised, population-based, nationwide cervical cancer screening programme ZORA was implemented in Slovenia in 2003 with a three-year screening interval and call/recall system that insures complete coverage of the target population (women aged 20–64). The program is well accepted by Slovenian women and more that 70% regularly attend for screening. In the 10-year period, the incidence of cervical cancer decreased nearly by half, which is a great success even for the European criteria. In this article, we present the development of the program in the period 2003–2013 together with basic performance indicators and future challenges.

¹ Dr. Maja Primic Žakelj, dr. med., Epidemiologija in register raka, Onkološki inštitut Ljubljana, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana; mzakelj@onko-i.si

² Urška Ivanuš, dr. med., Epidemiologija in register raka, Onkološki inštitut Ljubljana, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana; uivanus@onko-i.si

UVOD

Presejanje za raka je javnozdravstveni ukrep, pri katerem s preprostimi preiskavami med ljudmi, ki še nimajo nobenih kliničnih težav, iščemo tiste, pri katerih je možno, da že imajo raka ali njegove predstopnje. Vsakemu pozitivnemu testu morajo slediti diagnostične preiskave. Vsi presejalni programi za raka so namenjeni temu, da se zmanjša umrljivost za tistim rakom, ki mu je namenjeno presejanje. Pri programih, pri katerih se odkrivajo in zdravijo predrakave spremembe, kot je rak materničnega vratu, pa je cilj zmanjšati tudi zboleznost za rakom (1). Seveda je mogoče te kazalce spremljati le, če so na voljo ustrezni podatki, ki jih zbirajo registri umrlih in registri raka. V Sloveniji je register umrlih del standardne zdravstvene statistične službe na Nacionalnem inštitutu za javno zdravje, podatke o novih primerih raka pa zbira Register raka Republike Slovenije, ki na Onkološkem inštitutu Ljubljana deluje že od leta 1950 (2, 3). Pohvalimo se lahko tudi s tem, da imamo enega najstarejših državnih registrov raka v Evropi.

Prav redno spremljanje podatkov o incidenci, tj. številu novih primerov raka materničnega vratu pri nas, je omogočilo spoznanje, da se je število novih primerov konec devetdesetih v Sloveniji vztrajno večalo in da smo bili po incidenci v zgornji tretjini lestvice evropskih držav (3). To pa je bila spodbuda, da smo v sodelovanju z Ministrstvom za zdravje in Zavodom za zdravstveno zavarovanje pred skoraj 20 leti začrtali organizirani presejalni program in ga začeli preverjati s pilotsko študijo (4). Izkušnje drugih in številne raziskave so dokazovale, da le tak pristop lahko zveča učinkovitost dotlej spontanega, priložnostnega presejanja, uveljavljenega pri nas več desetletij (5).

Napori za obvladovanje raka materničnega vratu imajo dolgo zgodovino. Prve raziskave, ki so pokazale vpliv dobro or-

ganiziranih, kakovostnih presejalnih programov z uporabo citološkega brisa materničnega vratu (BMV) na incidenco raka materničnega vratu, so bile objavljene v šestdesetih in sedemdesetih letih prejšnjega stoletja. Kazale so bodisi manjšo incidenco ploščatoceličnega raka materničnega vratu med redno presejanimi ženskami v primerjavi s tistimi, ki na presejanje niso hodile, ali pa manjšo incidenco raka materničnega vratu po uvedbi presejalnega programa v primerjavi s tisto pred tem. Ocenili so, da se v presejani populaciji ob primerni udeležbi in kakovosti programa incidenca raka materničnega vratu lahko zmanjša za 80 % ali več (6). Bistveno za uspeh programov pa sta visoka udeležba ciljne skupine žensk in kakovost vseh postopkov, kar je mogoče doseči le z organiziranimi populacijskimi programi. Povsod tam, kjer nista bila izpolnjena oba pogoja, do bistvenega zmanjšanja incidence raka materničnega vratu ni prišlo, kljub razširjenemu priložnostnemu presejanju (7, 8). Čeprav priložnostno (spontano, oportunistično) presejanje lahko prinese dobrobit posameznim ženskam, so uspehi na populacijski ravni bistveno manjši. Poleg tega lahko tako ostanejo nekatere populacijske skupine popolnoma nepresejane, pri drugih pa je poraba brisov bistveno večja, kot je potrebno.

Prve presejalne programe so v šestdesetih letih prejšnjega stoletja začeli na Finskem, v delu Norveške in na Nizozemskem (5). V začetku devetdesetih let je v okviru programa Evropa proti raku začelo delovati Evropsko presejalno mrežje za raka materničnega vratu, ki je povežalo petnajsterico držav tedanje Evropske zveze (9). V okviru tega mrežja so leta 1993 nastale prve Evropske smernice za zagotavljanje kakovosti v presejanju za raka materničnega vratu (10). Postavile so temelje organiziranim presejalnim programom, ki veljajo še danes, in vzpostavile koncept zagotavljanja kakovosti (10). Leta

2008 so izšle prenovljene Evropske smer-nice za zagotavljanje kakovosti v preseja-nju za raka materničnega vratu (11).

PRESEJANJE ZA ODKRIVANJE RAKA MATERNIČNEGA VRATU V SLOVENIJI

Državni program zgodnjega odkriva-nja predrakavih sprememb maternične-ga vratu (ZORA) je organizirani presejalni program, ki smo ga v Sloveniji vzpostavili leta 2003 (4). Od leta 1960 je pri nas sicer teklo priložnostno presejanje v okviru gi-nekološke dejavnosti, vendar se učinkovi-tost tako organizirane preventive od leta 1986 ni več odražala v incidenci raka ma-terničnega vratu (3). Z uvedbo presejalne-ga programa je na Onkološkem inštitutu Ljubljana začel delovati tudi koordinacijski center s centralnim informacijskim sistemom, Register ZORA. V Registru ZORA se iz citoloških in histoloških labo-ratorijev mesečno zbirajo podatki o izvi-dih brisov materničnega vratu (BMV) in o izvidih histoloških preiskav zaradi cer-vikalne patologije, od leta 2010 pa tudi iz-vidi triažnega testa za humani papiloma virus (HPV). Citološki izvidi in izvidi triažnega testa HPV so poenoteni in prihaja-jo v elektronski obliki, medtem ko za po-ročanje histoloških izvidov enotna shema še ni določena; večino izvidov prispe v Re-gister ZORA v papirni obliki. Še vedno ča-kamo na nadaljnjo informatizacijo progra-ma, ki bi morala v zaključen krog zbiranja podatkov nujno povezati kolposkopski in histološki izvid, izvid testa HPV ter podat-ke o zdravljenju (12).

Povezava izvidov BMV s Centralnim registrom prebivalstva (CRP) in Regi-strom prostorskih enot omogoča spremlja-nje stopnje pregledanosti ciljne skupine (ženske, stare 20–64 let) ter identifikaci-jo tistih, ki v zadnjih štirih letih nimajo zabeleženega izvida BMV. Tem pošljemo na naslov stalnega prebivališča vabilo na preventivni ginekološki pregled z odvze-

mom BMV. Letno tako iz Registra ZORA pošljemo okrog 60.000 vabil, manj kot en odstotek vabil se zaradi neustreznega po-datka o stalnem prebivališču ali vitalnem stanju iz CRP vrne. Zaradi posebnosti pri-marnega zdravstvenega varstva ženk pri nas (izbrani ginekolog), se ženske namreč na presejalne preglede v določenih inter-valih lahko naročijo tudi same ali pa jih je po treh letih od zadnjega pregleda dolžan povabiti ginekolog (13).

Pomembna naloga koordinacijskega centra od vsega začetka je tudi priprava in izdajanje strokovnih smernic v sodelova-nju s strokovnjaki za posamezna področja. V začetku je bilo največ pozornosti posve-čene ureditvi citopatološke dejavnosti. Po-dročje citologije je tisto področje v progra-mu ZORA, ki ima najbolj dodelan sistem za zagotavljanje in nadzor kakovosti. Elemen-ti tega sistema so enotna citološka napo-tnica in izvid s poenoteno terminologijo, centralna registracija podatkov v Registru ZORA, standardi in navodila za delo v cito-patoloških laboratorijih, vsakoletna revizi-ja brisov materničnega vratu tistih žensk, ki so na novo zbolele za rakom maternič-nega vratu (RMV), in redna, sistematična izobraževanja. Uvedba teh elementov je nujna tudi na drugih področjih delovanja programa ZORA, kot sta npr. kolposkopija in histopatologija, katerih kakovost je sku-paj z uvedbo triažnega testa HPV v obrav-navo žensk s predrakavimi spremembami pomembna za to, da bo prekomerna inva-zivna diagnostika čim manjša.

Na področju ginekološke citopatologi-je je bila z letom 2006 opuščena stara kla-sifikacija izvida po Papanicolaou in uve-dena nova, ki se je približala klasifikaciji Bethesda. Glavna sprememba je bila raz-delitev izvida v dve kategoriji: negativen bris in patološki bris. Negativen bris vse-buje samo normalne celične elemente, brez neoplastičnih sprememb, ali pa reak-tivne spremembe, ki so benigne narave in lahko nastanejo iz različnih vzrokov (pri

vnetjih, vstavljenem materničnem vložku, po obsevanjih in kot posledica drugih nespecifičnih povzročiteljev). V letu 2011 je bila v citologiji dokončno sprejeta izvorna klasifikacija po Bethesda 2001 (14). Tako je po novem uporabnost brisa razdeljena le v dve skupini, in sicer na uporabni in neuporabni bris. Med patološkimi spremembami ploščatih celic je nova skupina APC-VS (atipične ploščate celice, pri katerih ni mogoče zanesljivo izključiti ploščatocelične intraepitelijske lezije visoke stopnje – PIL-VS). Pri žleznihih spremembah je nova delitev atipičnih žleznihih sprememb na AŽC-N (atipične žlezne celice, neopredeljene) in na AŽC-VN (atipične žlezne celice, verjetno neoplastične) (15).

Glede na to, da mora posameznim spremembam slediti tudi pravilno ukrepanje ginekologa, so bile v času delovanja programa večkrat posodobljene smernice za obravnavo žensk s predrakavimi spremembami in navodila ginekologom za delo v programu ZORA, zadnjič leta 2011 (16, 17). Prenovljene smernice priporočajo triažni test HPV, ki je z dodatnimi indikacijami v letu 2011 postal del diagnostičnega postopka pri ženskah z neopredeljenimi atipičnimi ploščatimi in žleznihih celicami, s CIN I in po zdravljenju CIN ter pri ploščatih intraepitelijskih lezijah nizke stopnje pri ženskah, starih 35 let in več. Poleg tega pa nove smernice že vključujejo dodatne celične spremembe v brisu, kot jih vsebuje klasifikacija po Bethesda.

Slovenski podatki kažejo, da program ZORA po desetih letih delovanja na državni ravni že daje javnozdravstvene učinke, ki se kažejo v veliki udeležbi žensk v presejanju in v zmanjševanju bremena raka materničnega vratu v našem prebivalstvu.

PREGLEDANOST ŽENSK IN IZVIDI PRESEJALNIH BRISOV MATERNIČNEGA VRATU

Pregledanost ciljne populacije je odstotni delež žensk v starosti 20–64 let, ki so

v treh letih, kolikor je priporočeni interval med presejalnimi pregledi, opravile vsaj en pregled brisa materničnega vratu. V zadnjem obdobju (2011–2014) pregledanost v Sloveniji presega 70 %. Če preračunamo pregledanost na pet let, kot je presejalni interval na Finskem in v Veliki Britaniji, v državah torej, ki so drugim v Evropi vzgled, pri nas ta stopnja presega 80 % in je višja kot v teh državah. Tako visoke stopnje zagotovo ne bi bilo mogoče doseči brez prizadevanja številnih ginekologov v primarnem zdravstvenem varstvu žensk. Pregledanost v zadnjem triletju dosega 70 % v vseh slovenskih regijah, razen v zdravstvenih regijah Murska Sobotna, Koper, Maribor in Novo mesto. Pregledanost presega ciljnih 70 % v starostni skupini 20–49 let, to je v obdobju, ko je število novih bolnic največje, medtem ko je v starosti 50–64 let še vedno nižja od želene.

V starostni skupini 20–64 let, ki je ciljna skupina programa, je bilo v obdobju 2003–2013 odvzetih in pregledanih blizu 2 milijona presejalnih BMV. Na vrsto izvada sta po eni strani vplivali obe spremembi klasifikacij, pa tudi boljša usposobljenost presejalcev in citopatologov, saj je bila prav kakovosti dela na tem področju od začetka programa posvečena največja pozornost. Večji kakovosti odvzema brisa in njegovi fiksaciji pa lahko pripišemo vztrajno večanje deleža uporabnih, kakovostnih BMV. Med patološkimi spremembami, ki jih je od leta 2011 že manj kot 5 %, so vsa leta prevladovali spremembe ploščatih celic, predvsem atipije in lezije nizke stopnje. Ker je teh sprememb več v primerjavi z ostalimi in ker so prav zaradi teh potrebni pogostejši kontrolni pregledi, manjšanje njihovega deleža pomeni tudi manjšo obremenitev ginekologov zaradi kontrolnih pregledov. Predvidevamo, da bo k temu še dodatno prispevala širša raba triažnega testa HPV v skladu z indikacijami.

RAK MATERNIČNEGA VRATU V SLOVENIJI DO LETA 2013 IN PREGLED ZGODOVINE BRISA MATERNIČNEGA VRATU BOLNIC, ZBOLELIH V LETIH 2006–2011

Rak materničnega vratu je bil še v začetku šestdesetih let 20. stoletja v Sloveniji drugi najpogostejši rak pri ženskah, v zadnjih letih pa je na desetem mestu ali še redkejši (3). To je posledica dolge tradicije zgodnjega odkrivanja in zdravljenja predrakavih sprememb in organiziranega presejalnega programa v zadnjem desetletju. V zadnjih letih v Sloveniji odkrijemo in zdravimo okoli 1.500–2.000 predrakavih sprememb visoke stopnje in okoli 120–130 novih primerov RMV. Od uvedbe organiziranega državnega presejalnega programa se je incidenca skoraj prepolovila; z 211 novih primerov leta 2003 se je zmanjšala na 122 novih primerov leta 2013 (18). To je tudi za evropska merila odličen dosežek.

Pregled zgodovine BMV pri bolnicah, zbolelih v letih 2006–2008 in 2009–2011 kaže, da je od zbolelih v zadnjem obdobju več kot polovica takih, ki se presejalnih pregledov niso udeleževale. Te bolnice so v povprečju starejše, bolezen pa jim je odkrita v bolj napredovali obliki, zato se ob manjšanju incidence RMV večja delež bolnic, diagnosticiranih s stadijem FIGO 2 ali več. Bolnice, ki so v obdobju 6 do 42 mesecev pred diagnozo imele pregledan vsaj en BMV in jih je iz drugega obdobja le dobra tretjina, so izziv stroki; brez natančnega pregleda citoloških izvidov in njihove klinične obravnave je težko ugotoviti, kje in ali je pri njih presejanje zatajilo. Spodbudno pa je, da je pri več kot 80 % bolezni odkrita v stadiju FIGO 1, pri 50 % pa FIGO 1a (12).

Umrljivost za rakom materničnega vratu, ki je dodaten kazalec uspešnosti presejanja, pri nas nikoli ni bila tako velika kot v državah s podobno incidenco; zagotovo tudi na račun večjega deleža rakov, odkritih v zgodnejših stadijih. Predvsem

pa je tako pri nas kot tudi drugod opredeljevanje te bolezni kot vzroka smrti problematično (19). Zaradi te bolezni je v začetku tega tisočletja po uradnih podatkih pri nas letno umrlo med 40 in 50 žensk, v zadnjih letih pa med 30 in 40 (2).

ZAKLJUČEK

Program ZORA uspešno deluje predvsem zaradi dobrega dela številnih ginekologov v primarnem zdravstvenem varstvu žensk, presejalcev, citopatologov in patologov v laboratorijih in vseh drugih strokovnjakov, ki sodelujejo v multidisciplinarnem postopku presejanja in zdravljenja predrakavih in rakavih sprememb materničnega vratu. Razvoj novih tehnologij pa prinaša tudi v presejalne programe številne novosti, ki jih bomo morali upoštevati tudi pri nas.

Dognanja o vlogi okužbe s HPV pri nastanku RMV nakazujejo, da se bo način obvladovanja raka materničnega vratu v prihodnosti spremenil. V primarni preventivi je uvedba cepljenja pred okužbo z onkogenimi HPV odprla novo poglavje. Kljub cepljenju pa bo še vedno potrebno tudi presejanje, saj cepljenje trenutno ne prepreči okužb z vsemi genotipi HPV (20).

V sekundarni preventivi za primarno presejanje raziskujejo uporabo testa HPV pri ženskah, starejših od 30 let. Pri mlajših je okužba s HPV preveč razširjena in samo prehodna, tako bi z dodatnimi pregledi po nepotrebnem obremenjevali preveč žensk s prehodno okužbo. V številnih evropskih državah že potekajo raziskave primarnega presejanja s testom HPV. Prednost testa HPV v primerjavi s citološkim presejanjem je namreč v tem, da je ta test bolj občutljiv za odkrivanje predrakavih sprememb visoke stopnje (cervikalne intraepitelijske neoplazije visoke stopnje, CIN 2+). Čeprav je test HPV bolj občutljiv, je manj specifičen, zato je nujno potrebna nadaljnja triaža HPV-pozitivnih žensk, da se izdvoji tiste, ki potrebujejo zdravljenje,

in s pregledi po nepotrebnem ne obremenjuje žensk s prehodno okužbo (21).

Raziskave so trenutno usmerjene predvsem v iskanje bolj specifičnih triažnih testov. Med njimi proučujejo citološki pregled BMV, genotipizacijo HPV ter številne proteinske (na primer imunohistokemično barvanje p16^{INK4a} ali p16/Ki67) in molekularne (metilacijski status različnih virusnih in humanih genov) označevalce (22).

V vseh programih se srečujemo tudi z ženskami, ki se presejalnih pregledov iz različnih razlogov ne udeležujejo. Vzorec za test HPV si z različnimi testerji, ki jih razvijajo številni proizvajalci, lahko vzamejo ženske tudi same doma, kar odpira

dodatne možnosti za povečanje udeležbe v presejanju (23).

V več evropskih državah (npr. v Italiji, na Švedskem, v Veliki Britaniji in na Nizozemskem) že tečejo raziskave primarnega presejanja s testom HPV. Predvidevajo, da bodo v teh državah že v naslednjih petih letih privzeli ta način presejanja, ker je bolj občutljiv za spremembe visoke stopnje. Samoodvzem bo v začetku verjetno metoda izbora za neodzivnice, morda pa ga bodo kasneje lahko izbrale vse ženske. Do takrat pa bodo potrebne raziskave, ki bodo pokazale najprimernejše metode za neposredno molekularno triažo. Na vse te spremembe se bo treba pripraviti tudi v slovenskem presejalnem programu.

LITERATURA

1. Hakama M, Coleman MP, Alexe DM, Auvinen A. Cancer screening. In: Coleman MP, Alexe DM, Albrecht T, McKee M. Responding to the challenge of cancer in Europe. Ljubljana: Institute of Public Health of RS, 2008.
2. Nacionalni inštitut za javno zdravje. Področje dela. Podatki. Prijava smrti [citirano 2014 Sept 20]. Dosegljivo na: <http://www.ivz.si/>.
3. Zadnik V, Primic Žakelj M. SLORA: Slovenija in rak. Epidemiologija in register raka. Onkološki inštitut Ljubljana [citirano 2014 Sept 20]. Dosegljivo na: <http://www.slora.si>.
4. Primic Žakelj M, Zadnik V, Pogačnik A, Uršič-Vrščaj M. Presejanje za raka materničnega vratu v Sloveniji in državni program ZORA. *Radiology and Oncology* 2006; 40, S143–8.
5. Sankila R, Démaret E, Hakama M, Lynge E, Schouten LJ, Parkin DM. Evaluation and monitoring of screening programmes. European Commission. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities, 2001.
6. IARC working group on evaluation of cervical cancer screening programmes. Screening for squamous cervical cancer: duration of low risk after negative results of cervical cytology and its implication for screening policies. *Br Med J* 1986; 293: 659–64.
7. International Agency for Research on Cancer. Cervix cancer screening. IARC handbooks of cancer prevention. Vol. 10. Lyon, France: IARC Press; 2005: 1–302.
8. Anttila A, Bielska-Lasota M, Primic Žakelj M et al. Determinants for a successful implementation of population-based cancer screening programmes [citirano 2014 Sept 20]. Dosegljivo na: http://www.eusanh.eu/wp/wp-content/uploads/2011/11/EuSANH_Brochure_Cancerscreening.pdf
9. European Cervical Cancer Screening Network [citirano 2014 Sept 20]. Dosegljivo na: <http://www.cancer-network.de/>.
10. Coleman D, Day N, Douglas D in sod. European guidelines for quality assurance in cervical cancer screening. *Eur J Cancer*. 1993; 29A (Suppl 4): S1–S38. (Europe Against Cancer Programme).
11. Arbyn M, Anttila A, Jordan J et al. eds. European guidelines for quality assurance in cervical cancer screening. 2nd ed. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities, 2008.
12. Primic Žakelj M, Ivanuš U. Deset let delovanja programa ZORA. V: Ivanuš U, Primic Žakelj M, Repše-Fokter A eds. Zbornik predavanj. Ljubljana: Onkološki inštitut; 2013: 7–11.
13. Navodilo o spremembah in dopolnitvah navodila za izvajanje preventivnega zdravstvenega varstva na primarni ravni. *Ur l RS* 2002; 33: 3122–9.
14. Solomon D, Nayar R eds. The Bethesda system for reporting cervical cytology. New York: Springer; 2003.
15. Pogačnik A, Stojan Fležar M, Repše-Fokter A, Snoj V, Kirbiš Srebotnik I, Primic-Žakelj M. Navodila za citološke izvide brisov materničnega vratu – klasifikacija po Bethesda. (Instructions for cytological records of cervical smears – the Bethesda classification). Ljubljana: Onkološki inštitut Ljubljana; 2011 [citirano 2014 Sept 20]. Dosegljivo na: <http://zora.onko-i.si/>.
16. Uršič-Vrščaj M., Rakar S, Možina A et al. Smernice za celostno obravnavo žensk s predrakavimi spremembami materničnega vratu. Ljubljana: 2011 [citirano 2014 Sept 20]. Dosegljivo na: <http://zora.onko-i.si/>.
17. Primic Žakelj M, Uršič-Vrščaj M, Pogačnik A, Ivanuš U. Navodila ginekologom za delo v programu ZORA. Posodobitev 2011. Ljubljana: 2011 [citirano 2014 Sept 20]. Dosegljivo na: <http://zora.onko-i.si/>.
18. Onkološki inštitut Ljubljana, Epidemiologija in register raka: ZORA. Državni program zgodnjega odkrivanja predrakavih sprememb materničnega vratu [citirano 2014 Sept 20]. Dosegljivo na: <http://zora.onko-i.si/>.
19. Primic Žakelj M, Pompe-Kirn V, Škrlec F, Šelb-Šemerl J. Can we rely on cancer mortality data? Checking the validity of cervical cancer mortality data for Slovenia. *Radiology and oncology* 2001; 35: 243–7.
20. Bosch FX, Broker TR, Forman D et al. Comprehensive control of human papillomavirus infections and related diseases. *Vaccine* 2012; 30, Suppl 5: G1–G31.
21. Wentzensen N. Triage of HPV-positive women in cervical cancer screening. *Lancet Oncol*. 2013; 14: 107–9.
22. Cuzick J, Bergeron C, von Knebel Doeberitz M et al. New technologies and procedures for cervical cancer screening. *Vaccine*. 2012; Suppl. 30: F107–16.
23. Bosgraaf RP, Siebers AG, De Hullu JA et al. The current position and the future perspectives of cervical cancer screening. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2014; 14: 75–92.

Veronika Učakar¹, Marta Grgič Vitek²

Cepljenje proti okužbam s človeškim papilomavirusom

Vaccination Against HPV Infections

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: rak materničnega vratu, anogenitalne bradavice, HPV, cepivo

Okužba s človeškim papilomavirusom (HPV) je najpogostejša spolno prenosljiva okužba. Visokorizična genotipa HPV-16 in HPV-18 povzročata več kot 70 % rakov materničnega vratu, nizkorizična genotipa HPV-6 in HPV-11 pa sta odgovorna za več kot 90 % anogenitalnih bradavic. Proti okužbam s HPV sta trenutno za splošno uporabo odobreni dve učinkoviti in varni cepivi, štirivalentno in dvovalentno. Programi cepljenja proti okužbam s HPV že potekajo v številnih državah in ponekod že kažejo rezultate na ravni populacije. V Sloveniji se program cepljenja proti okužbam s HPV za 11–12 let stare deklice s štirivalentnim cepivom izvaja od šolskega leta 2009/2010 dalje. Precepljenost znaša okrog 50 %.

ABSTRACT

KEY WORDS: cervical cancer, anogenital warts, HPV, vaccine

Human papillomavirus (HPV) is the most common sexually transmitted infection. High-risk HPV types 16 and 18 cause more than 70 % of cervical cancers, and low-risk types 6 and 11 are responsible for more than 90 % of anogenital warts. Two effective and safe HPV vaccines are currently available for general use, quadrivalent and bivalent. Vaccination programs against HPV infections are underway in many countries and are in some cases already showing results on population level. In Slovenia, HPV vaccination program for 11–12 year old girls with the quadrivalent vaccine was introduced in the school year 2009/2010. Vaccination coverage is around 50%.

¹ Veronika Učakar, dr. med., Center za nalezljive bolezni, Nacionalni inštitut za javno zdravje, Trubarjeva ulica 2, 1000 Ljubljana; veronika.ucakar@nijz.si

² Dr. Marta Grgič Vitek, dr. med., Center za nalezljive bolezni, Nacionalni inštitut za javno zdravje, Trubarjeva ulica 2, 1000 Ljubljana

UVOD

Okužbe s človeškimi papilomavirusi (HPV) so najpogostejše spolno prenosljive okužbe in večina spolno aktivnih oseb se tekom svojega življenja okuži s HPV (1). Perzistentna okužba z vsaj enim izmed visokorizičnih genotipov HPV je potreben, vendar ne zadosten vzrok za nastanek raka materničnega vratu, znaten delež vaginalnih in analnih rakov ter rakov penisa, vulve in ustnega dela žrela (2, 3). Raka materničnega vratu najpogosteje povzroča HPV-16, sledi mu HPV-18. Skupaj povzročata več kot 70 % svetovnega bremena te bolezni (4).

Nizkorizična genotipa HPV-6 in HPV-11 povzročata več kot 90 % anogenitalnih bradavic, ki niso smrtna bolezen, so pa pogoste in povezane s psihosocialnimi težavami obolelih ter z velikimi stroški zdravljenja, ki je dolgotrajno (5, 6).

CEPIVA PROTI OKUŽBAM S HPV

Razvoj cepiv, ki preprečujejo okužbe z najpogostejšimi genotipi HPV, se je začel pred več kot 20 leti (7). Antigene za cepivi proti HPV, ki sta trenutno v uporabi, proizvajajo s pomočjo rekombinantne tehnologije. Gre za L1 glavne proteine ovojnice HPV, ki se združujejo v virusu podobne delce – ti ne vsebujejo virusne DNA, zato ne morejo povzročiti okužbe in niso onkogeni (8). Štirivalentno cepivo vsebuje virusom podobne delce genotipov HPV-6, HPV-11, HPV-16 in HPV-18 (9). Dvovalentno cepivo vsebuje virusom podobne delce genotipov HPV-16 in HPV-18 (10). Cepivi se razlikujeta tudi v adjuvansu, štirivalentno cepivo vsebuje klasičen adjuvans amorfní aluminijev hidrosifosfat sulfat, dvovalentno cepivo pa unikaten adjuvans ASO4 (9, 10). Učinkovitost obeh cepiv je bila potrjena v dobro načrtovanih randomiziranih, dvojno slepih in s placebom kontroliranih raziskavah (11, 12). V teh raziskavah se je pokazalo, da sta cepivi visoko učinkoviti pri ženskah, ki še

niso bile okužene z genotipi, vsebovanimi v cepivu, in neučinkoviti pri preprečevanju bolezni, povzročenih z genotipi, vsebovanimi v cepivu, s katerimi so bile ženske že okužene v času cepljenja.

Evropska agencija za zdravila (angl. *European Medicines Agency*, EMA) je potrdila indikacije za cepljenje s štirivalentnim cepivom, ki je namenjeno za uporabo od 9. leta starosti dalje za preprečevanje predrakavih sprememb (na materničnem vratu, zunanjem spolovilu, nožnici in zadnjiku), raka materničnega vratu in zadnjika, ki so vzročno povezani z določenimi onkogenimi genotipi HPV, ter bradavic na spolovilih, ki so vzročno povezane s specifičnimi genotipi HPV. Indikacije temeljijo na dokazu učinkovitosti štirivalentnega cepiva pri ženskah, starih od 16 do 45 let, in moških, starih od 16 do 26 let, ter dokazu imunogenosti štirivalentnega cepiva pri 9 do 15 let starih otrocih in mladostnikih (9). Prav tako je EMA potrdila indikacije za cepljenje z dvovalentnim cepivom od starosti 9 let dalje, ki je namenjeno preprečevanju predrakavih genitalnih sprememb (na materničnem vratu, zunanjem spolovilu in nožnici) in raka materničnega vratu, ki so posledica okužbe z določenimi onkogenimi genotipi HPV. Indikacija temelji na dokazu klinične učinkovitosti v populaciji žensk v starosti od 15 do 25 let in na dokazu imunogenosti cepiva v skupini žensk, starih od 9 do 55 let. Klinična učinkovitost cepiva pri moških ni bila ovrednotena (10).

Za obe cepivi je EMA potrdila shemo cepljenja z dvema ali s tremi odmerki cepiva glede na starost ob začetku cepljenja (9, 10). S štirivalentnim cepivom so lahko posamezniki od 9. do vključno 13. leta starosti cepljeni z dvema odmerkoma (0 in 6 mesecev) ali s tremi odmerki (0, 2 in 6 mesecev). Posamezniki, stari 14 let ali več, se cepijo s tremi odmerki cepiva (0, 2 in 6 mesecev) (9). Z dvovalentnim cepivom se posamezniki od 9. do vključno 14.

leta starosti cepijo z dvema odmerkoma (0 in 6 mesecev). Posamezniki, stari 15 let ali več, se cepijo s tremi odmerki cepiva (0, 1 in 6 mesecev) (10). Cepljenje proti okužbi s HPV s štirivalentnim ali dvovalentnim cepivom se lahko opravi istočasno z drugimi cepljenji (9, 10).

Kontraindikacija za cepljenje je preobčutljivost na zdravilne učinkovine ali katerokoli pomožno snov v cepivu in če se ta pojavi po predhodnem odmerku istega cepiva. Previdnost pri cepljenju je potrebna pri osebah, ki imajo težjo akutno bolezen z zvišano telesno temperaturo, pri teh je potrebno cepljenje odložiti do izboljšanja. V primeru blage okužbe zgornjih dihal cepljenja ni potrebno odložiti. Pri mladostnikih se lahko kot psihogeni odziv na injiciranje pojavi sinkopa (omedlevica) z nevrološkimi znaki (prehodne motnje vida, parestezija, tonično-klonični gibi udov), zato je treba cepljene osebe po cepljenju opazovati približno 15–20 minut (9, 10, 12).

PROGRAM CEPLJENJA PROTI OKUŽBAM S HPV V SLOVENIJI

V Sloveniji je samoplačniško cepljenje proti HPV s štirivalentnim cepivom na voljo od konca leta 2006 in z dvovalentnim cepivom od leta 2007. V šolskem letu 2009/2010 je bil nacionalni Program cepljenja in zaščite z zdravili razširjen z rutinskim neobveznim brezplačnim cepljenjem proti HPV s štirivalentnim cepivom za deklice, stare od 11 do 12 let, ob sistematskem pregledu v 6. razredu osnovne šole (13). V šolskem letu 2011/2012 so se lahko ob sistematskem pregledu v 8. razredu prvič brezplačno cepile tudi zamudnice, stare 13 do 14 let. Za cepljenje teh deklic se uporablja štirivalentno cepivo. Do sedaj so bile deklice cepljene s tremi odmerki cepiva. Izsledki nedavno objavljenih raziskav kažejo, da sta za zaščito pred izbranimi genotipi HPV pri tej starosti dovolj dva odmerka, takšno she-

mo pa je odobrila tudi EMA in priporočila Svetovna zdravstvena organizacija (SZO), zato bodo deklice (mlajše od 14 let) v šolskem letu 2014/2015 cepljene z dvema odmerkoma cepiva namesto s tremi (14).

V šolskem letu 2009/2010 je precepljenost slovenskih deklic v 6. razredu s tremi odmerki cepiva znašala 48,7 %, v šolskem letu 2010/2011 se je precepljenost povešala na 55,2 %, v šolskem letu 2011/2012 je znašala 54,9 %, v šolskem letu 2012/2013 pa se je znižala na 48,9 %. Precepljenost se med posameznimi zdravstvenimi regijami v Sloveniji precej razlikuje, tako je bila v šolskem letu 2012/2013 najvišja precepljenost v koronjski regiji s 79,3 %, najnižja pa v ljubljanski regiji s 32,9 % (15).

Ob koncu prvega leta (2010) izvajanja Programa cepljenja proti HPV smo na Nacionalnem inštitutu za javno zdravje (NIJZ) izvedli evalvacijo, pri kateri je sodelovalo 96 šolskih zdravnikov, ki so pokrivali skupaj 351 osnovnih šol in 584 šestih razredov. Glavni razlogi, ki so jih starši najpogosteje navajali zdravnikom, da se niso odločili za cepljenje proti HPV, so bili: deklice so cepljene prezgodaj glede na starost, za cepljenje se bodo odločili kasneje, cepljenje se jim ne zdi potrebno, ne zaupajo cepivom na sploh, cepivo ni dovolj raziskano, cepivo ni varno, informacije o škodljivostih cepiva (zlasti internet), strah pred stranskimi učinki, ni še dovolj podatkov o varnosti in zanesljivosti cepiva in da gre le za zaslužek farmacevtskih firm, cepljenje je škodljivo in so jim ga odsvetovali zdravstveni delavci (16).

PROGRAMI CEPLJENJA PROTI OKUŽBAM S ČLOVEŠKIMI PAPILOMAVIRUSI V SVETU

S programom cepljenja deklic proti okužbam s HPV so prvi začeli v letu 2006 v ZDA (7). Po podatkih SZO je bilo do konca leta 2013 cepljenje proti okužbam s HPV uvedeno v državne programe cepljenja v 55

državah po svetu (17). Podatki Evropskega centra za preprečevanje in obvladovanje bolezni (angl. *European Centre for Disease Prevention and Control*, ECDC), ki spremlja 31 držav v Evropi, pa kažejo, da trenutno v 25 državah potekajo programi cepljenja deklcic proti okužbam s HPV z zagotovljenim (ali delnim) financiranjem ali pa imajo vsaj nacionalna priporočila za cepljenje (18). V letu 2013 so v ZDA in v Avstraliji začeli tudi z rutinskim cepljenjem dečkov, v Evropi pa imajo nacionalna priporočila za cepljenje dečkov samo v Avstriji (12, 18).

Precepljenost deklcic proti okužbam s HPV s tremi odmerki cepiva v državnih programih cepljenja se po posameznih evropskih državah, za katere so za zadnja leta objavljeni podatki, zelo razlikuje. Tako je v Franciji v letu 2013 za posamezne rojstne kohorte znašala le 20–28 % (19). Nekoliko višjo precepljenost beležijo na Nizozemskem, ta je v letu 2013 znašala 58 % (20). O zelo uspešnih programih cepljenja z visoko precepljenostjo pa poročajo iz Švedske (80 % z vsaj enim odmerkom v letu 2013), Danske (posamezne rojstne kohorte 81–82 % v letu 2012) in Anglije (86 % v šolskem letu 2012/2013) (21–23).

Zelo uspešen program z visoko precepljenostjo imajo v Veliki Britaniji, kjer so v program cepljenja proti okužbam s HPV primarno vključene 12–13 let stare deklcice, cepljenje po šolah pa izvajajo medicinske sestre. Pred cepljenjem starši prejmejo obvestilo z informacijami o cepivu in privolitveni obrazec za cepljenje (24). Za promocijo programa so pripravili spletno stran (ki omogoča uporabo socialnih medijev) z informacijami o cepivu in boleznih, ki jih povzroča okužba s HPV (25). Spletna stran je bila le del obsežne komunikacijske kampanje z usklajeno vsebino in enotnimi sporočili, kamor so vključili še televizijo, radio, oglase v časopisih, letake in plakate. K uspehu promocije programa je prispeval tudi večinoma pozitiven odnos medijev, ki se je tekom izvajanja programa

še krepil in je vplival na sprejemljivost cepljenja proti HPV v javnosti (24).

Programi cepljenja proti okužbam s HPV po svetu se že kažejo kot uspešni tudi na ravni populacije. Iz različnih držav po svetu, ki so uvedle cepljenje, tako poročajo o zniževanju prevalece okužb materničnega vratu z genotipi, vsebovanimi v cepivu, in zniževanju pojavnosti predrakavih sprememb materničnega vratu pri mladih ženskah ter zniževanju anogenitalnih bradavic tako pri mladih ženskah kot mladih moških (26–35).

V Avstraliji, kjer beležijo več kot 80 % precepljenost, so 6 let po začetku programa cepljenja proti HPV (štirivalentno cepivo) zaznali znatno znižanje prevalece okužb materničnega vratu z genotipi HPV (vsebovanimi v cepivu) med mladimi ženskami, ki so bile cepljene, v primerjavi z mladimi ženskami pred uvedbo cepljenja. Poleg tega so zaznali tudi nižjo prevalenco okužb med necepljenimi ženskami, kar nakazuje kolektivno imunost (26). Tudi v ZDA so kljub nizki precepljenosti (okrog 30 %) po 4 letih izvajanja programa cepljenja (štirivalentno cepivo) zaznali, da se je prevalenca okužb materničnega vratu z genotipi HPV (vsebovanimi v cepivu) med mladimi ženskami prepolovila (27). Pomembno znižanje v prevalenci okužb materničnega vratu z genotipi HPV (vsebovanimi v cepivu) med mladimi ženskami so po začetku programa zaznali tudi na Škotskem (dvovalentno cepivo, 90 % precepljenost), kjer pa rezultati podobno kot v Avstraliji nakazujejo tudi možnost navzkrižne zaščite pred okužbo materničnega vratu z genotipi HPV-31, -33 in -45 (26, 28).

Poleg tega iz Avstralije po štirih oziroma petih letih izvajanja programa cepljenja poročajo še o uspešnosti štirivalentnega cepiva pri zniževanju pojavnosti predrakavih sprememb materničnega vratu med mladimi ženskami, ki so bile cepljene. Pojavnost predrakavih sprememb materničnega vratu visoke stopnje je bila

med cepljenimi tako skoraj za polovico nižja v primerjavi z necepljenimi (29, 30). Tudi na Danskem šest let po začetku izvajanja programa cepljenja s štirivalentnim cepivom v populaciji opažajo, da imajo cepljene mlade ženske statistično značilno manjše tveganje za pojav atipičnih (ali hujših) sprememb materničnega vratu in cervikalne intraepitelijske neoplazije 2 ali 3 (CIN 2/3) (31). Druga raziskava je pokazala znatno znižanje incidence atipičnih (ali hujših) sprememb materničnega vratu in CIN 2 (ali hujših sprememb) v starostnih kohortah, ki so bile vključene v program cepljenja, kar kaže na zgodnji učinek cepljenja proti HPV (32).

Na Švedskem so štiri leta po uvedbi cepljenja s štirivalentnim cepivom spremljali populacijo mladih žensk in ugotovili, da se je tveganje za pojav anogenitalnih bradavic najbolj znižalo med ženskami, ki so bile cepljene s tremi odmerki cepiva v primerjavi z necepljenimi. Nižje tveganje so opazili tudi med ženskami, ki so prejele dva odmerka cepiva (33). V Avstraliji so pet let po začetku izvajanja programa cepljenja primerjali pojavnost anogenitalnih bradavic med pacienti ustanov za spolno zdravje v obdobju pred in po začetku cepljenja. Ugotovili so, da se je pojavnost anogenitalnih bradavic med mladimi ženskami znižala za več kot 90 %, med mladimi heteroseksualnimi moškimi pa za več kot 80 %, kar kaže na učinek kolektivne imunosti (34). Podobno so na Danskem pet let po začetku izvajanja programa v populaciji primerjali incidenco genitalnih bradavic v obdobju pred in po uvedbi cepljenja. Incidenca anogenitalnih bradavic se je med mladimi ženskami za vsako leto programa skoraj prepolovila. Kolektivne imunosti in znižanja incidence anogenitalnih bradavic med mladimi moškimi pa niso zaznali, kar je morda odraz obsega dopolnilnega (angl. *catch-up*) cepljenja, ki je na Danskem vključevalo deklice do 15. leta starosti, v Avstraliji pa ženske do 26. leta (35).

VARNOST CEPIV PROTI OKUŽBAM S HPV

Podatki o varnosti obeh cepiv izhajajo iz številnih kliničnih raziskav, opravljenih preden sta bili cepivi na voljo za široko uporabo in v katere je bilo vključenih več 10.000 žensk. Na podlagi njihovih rezultatov je EMA zaključila, da so koristi obeh cepiv večje od z njimi povezanih tveganj, in jim na podlagi tega izdala dovoljenje za promet v Evropski uniji. V teh raziskavah so bili najpogostejši neželeni učinki (opaženi pri več kot eni osebi od desetih) glavobol, reakcije na mestu cepljenja (rdečina, bolečina in otekline), mialgija in utrujenost (9-11).

V ZDA poteka od leta 2006 obsežno pasivno spremljanje varnosti štirivalentnega cepiva. Do marca 2014 je bilo razdeljenih okrog 67 milijonov odmerkov. Spremljanje ni pokazalo kakšnih novih varnostnih zadržkov v zvezi s cepivi proti HPV. Prijavljenih je bilo okrog 25.000 neželenih dogodkov po cepljenju, od tega jih je bilo 7 % razvrščenih kot resnih – med temi so najpogosteje poročali o glavobolu, slabosti, bruhanju in povišani telesni temperaturi (12).

Globalni svetovalni odbor za varnost cepiv (angl. *Global Advisory Committee on Vaccine Safety*, GACVS) pri SZO je pregledal posodobljene varnostne podatke o cepivih proti HPV po tem, ko je bilo po svetu razdeljenih več kot 175 milijonov odmerkov obeh cepiv. Zaključuje, da je na voljo vedno več podatkov o varnosti obeh cepiv, saj vse več držav cepljenje vključuje v svoje cepilne programe. Poleg tega so bili v časovni povezavi s cepljenjem v tem obdobju prijavljeni nekateri resni neželeni dogodki, kot so Guillian-Barre-jev sindrom, krči, možganska kap, venska tromboza, anafilaksija in druge alergične reakcije. Ti dogodki so bili podrobno raziskani, vendar povezava s cepljenjem ni bila potrjena. Prav tako spremljanje izidov nosečnosti pri žen-

skah, ki so bile med nosečnostjo nehote cepljene, ni pokazalo povečanja neželenih izidov (36).

V ZDA so izvedli veliko raziskavo o varnosti štirivalentnega cepiva, v katero je bilo vključenih skoraj 190.000 žensk vseh starosti, ki so prejele vsaj en odmerek štirivalentnega cepiva (skupaj skoraj 350.000 odmerkov). Preučevali so morebitno povezavo med 16 različnimi vnaprej opredeljenimi avtoimuskimi boleznimi, kot so različna revmatološka, endokrina, nevrološka ali oftalmološka avtoimuna obolenja, vključno z multiplo sklerozo. Rezultati niso pokazali nobenih opozorilnih signalov glede varnosti za nobeno od proučevanih bolezni (37).

V Evropi je bila izvedena velika raziskava varnosti štirivalentnega cepiva na Švedskem in Danskem. Ta je vključevala skoraj 1 milijon deklic (10–17 let), med katerimi jih je bilo skoraj 300.000 cepljenih proti HPV. Raziskovali so, ali je cepljenje povezano s povečanim tveganjem za avtoimunske, nevrološke ali tromboembolične dogodke. Rezultati raziskave niso pokazali nikakršne povezave med cepljenjem in omenjenimi dogodki (38). Podobno tudi kasnejša raziskava varnosti štirivalentnega cepiva, izvedena na Danskem, v katero je bilo vključenih več kot 4.000 bolnic z veno trombozo (iz populacije 1,6 milijona žensk, 30 % cepljenih), ni pokazala povezave med veno trombozo in cepljenjem (39).

V Sloveniji se podatki o neželenih učinkih po cepljenju zbirajo na NIJZ v Registru neželenih učinkov po cepljenju, v katerega so dolžni poročati vsi zdravniki, ki ugotovijo neželene učinke. Pri nas je bilo v obdobju 2008–2013 razdeljenih skoraj 90.000 odmerkov cepiva proti HPV. V tem obdobju smo v Register neželenih učinkov po cepljenju prejeli 119 prijav neželenih učinkov po cepljenju proti HPV. Zdravniki so najpogosteje poročali o bolečini, oteklini, rdečini na mestu ceplje-

nja, povišani telesni temperaturi, slabosti, glavobolu, utrujenosti in omedlevici. Vsako leto je prijavljenih tudi nekaj resnih neželenih učinkov – vse hospitalizacije namreč štejejo za resne neželene učinke. Dve osebi sta bili hospitalizirani zaradi omedlevice, ena zaradi hujše lokalne reakcije, slabosti, utrujenosti in tonzilitisa, ena zaradi slabosti, utrujenosti in vrtoglavice, ena oseba zaradi glavobola, ki je bil opredeljen kot migrenska epizoda ter ena zaradi slabega počutja in povišane telesne temperature. Vsi neželeni učinki so izzvenili v nekaj dneh brez posledic (40).

ZAKLJUČEK

Trenutno sta v svetu za splošno uporabo odobreni dve učinkoviti in varni cepivi proti okužbam s HPV. Programi cepljenja proti okužbam s HPV že potekajo v številnih državah in ponekod že kažejo rezultate na ravni populacije. V Sloveniji se od šolskega leta 2009/2010 izvaja program cepljenja za 11–12 let stare deklice. Precepljenost je še vedno nezadovoljiva in znaša le okrog 50 %. Eden izmed prepoznanih razlogov, da se starši ne odločajo za cepljenje svojih deklic, je strah pred neželenimi učinki, čeprav vsi podatki do sedaj kažejo, da sta cepivi varni.

Za izboljšanje precepljenosti bi morali v Sloveniji bistveno ojačati promocijo cepljenja, ki bi poudarjala koristi za deklice kasneje v življenju, varnost cepljenja in učinkovitost, ki se je že pokazala na ravni populacije v nekaterih državah z dobro precepljenostjo. Promocijo bi (poleg staršev) lahko razširili tudi na deklice (predvsem zamudnice), vključene v program cepljenja. Cepljenje bi bilo smiselno omogočiti tudi starejšim zamudnicam (starih 15 let ali več), ki za cepljenje ne potrebujejo privolitve staršev. Vsi zdravstveni delavci bi morali biti osveščeni o pomenu cepljenja proti okužbam s HPV in cepljenja na splošno ter ostati/postati njegovi pomembni zagovorniki.

LITERATURA

1. Trottier H, Franco EL. The epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Vaccine*. 2006; 24 (Suppl 1): S1–15.
2. Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, et al. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol*. 2002; 55 (4): 244–265.
3. Muñoz N, Castellsagué X, de González AB, et al. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*. 2006; 24 (Suppl 3): 1–10.
4. de Sanjose S, Quint WG, Alemany L, et al; Retrospective International Survey and HPV Time Trends Study Group. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *Lancet Oncol*. 2010; 11 (11): 1048–56.
5. Komloš KF, Kocjan BJ, Košorok P, et al. Tumor-specific and gender-specific pre-vaccination distribution of human papillomavirus types 6 and 11 in anogenital warts and laryngeal papillomas: a study on 574 tissue specimens. *J Med Virol*. 2012; 84 (8): 1233–41.
6. Marra F, Ogilvie G, Colley L, et al. Epidemiology and costs associated with genital warts in Canada. *Sex Transm Infect*. 2009; 85 (2): 111–5.
7. Uršič Vrščaj M, Poljak M, Matičič M et al. Novosti in pregled precepljenosti proti okužbam s humanimi papilomskimi virusi v Sloveniji in v svetu. In: Beović B., Strle F, Tomažič J, eds. Infektološki simpozij 2012. Novosti v infektologiji. Preprečevanje okužb: imunoprofilaksa in kemoprofilaksa. Ljubljana: Sekcija za protimikrobno zdravljenje SZD; 2012. p 100–6.
8. Dochez C, Bogers JJ, Verhelst R et al. HPV vaccines to prevent cervical cancer and genital warts: an update. *Vaccine*. 2014; 32 (14): 1595–1601.
9. Silgard – Summary product characteristics [internet]. London: European Medicines Agency [citirano 2014 Sep 22]. Dosegljivo na: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000732/WC500051549.pdf
10. Cervarix – Summary product characteristics [internet]. London: European Medicines Agency [citirano 2014 Sep 22]. Dosegljivo na: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000721/WC500024632.pdf
11. Schiller JT, Castellsagué X, Garland SM. A review of clinical trials of human papillomavirus prophylactic vaccines. *Vaccine*. 2012; 30 (Suppl 5): F123–38.
12. Markowitz LE, Dunne EF, Saraiya M. Human papillomavirus vaccination. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR*. 2014; RR63 (5): 1–36.
13. Pravilnik o določitvi Programa cepljenja in zaščite z zdravili za leto 2009. Uradni list RS št. 24/2009.
14. Uvedba spremenjene sheme rutinskega cepljenja proti HPV [internet]. Ljubljana: Nacionalni inštitut za javno zdravje [citirano 2014 Sep 24]. Dosegljivo na: http://www.ivz.si/cepljenje/strokovna_javnost/cepljenje_proti_hpv?pi=186_18_view=item&_18_newsId=2603&pl=257-18.0.
15. Precepljenost deklic, ki obiskujejo 6. razred osnovne šole [internet]. Ljubljana: Nacionalni inštitut za javno zdravje [citirano 2014 Sep 24]. Dosegljivo na: http://www.ivz.si/cepljenje/strokovna_javnost/cepljenje_proti_hpv?pi=186_18_view=item&_18_newsId=2091&pl=257-18.0.
16. Učakar V. Ocena izvajanja rutinskega cepljenja proti humanim virusom papiloma (HPV) v prvem letu v Sloveniji. *Enboz*. 2011; 1 (3): 4–6.
17. Immunization Coverage [internet]. Geneva: World Health Organization [citirano 2014 Oct 10]. Dosegljivo na: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs378/en/>
18. Vaccine Schedule. Recommended immunisations for human papillomavirus infections [internet]. Stockholm: European Centre for Disease Control and Prevention (ECDC) [citirano 2014 Oct 10]. Dosegljivo na: <http://vaccine-schedule.ecdc.europa.eu/Pages/Scheduler.aspx>
19. Papillomavirus humains (HPV). Couverture vaccinale (%) par le vaccin HPV chez les jeunes filles pour une et trois doses [internet]. Paris: Institut de veille sanitaire (InVS) [citirano 2014 Oct 10]. Dosegljivo na: <http://www.invs.sante.fr/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/Maladies-a-prevention-vaccinale/Couverture-vaccinale/Donnees/Papillomavirus-humains>
20. Immunisation coverage National Immunisation Programme in the Netherlands: Year of report 2013 [internet]. Bilthoven: The National Institute for Public Health and the Environment (RIVM) [citirano 2014 Oct 10]. Dosegljivo na: http://www.rivm.nl/en/Documents_and_publications/Scientific/Reports/2013/juni/Immunisation_coverage_National_Immunisation_Programme_in_the_Netherlands_Year_of_report_2013
21. Register-based monitoring of the Swedish HPV vaccination programme [internet]. Stockholm: Public Health Agency of Sweden [citirano 2014 Oct 10]. Dosegljivo na: <http://www.fhi.no/dokumenter/a24311916c.pdf>

22. Epi-news. HPV Vaccination – Coverage 2012 [internet]. Copenhagen: Statens Serum Institut [citirano 2014 Oct 10]. Dosegljivo na: <http://www.ssi.dk/English/News/EPI-NEWS/2013/No%2020%20-%202013.aspx>
23. Annual HPV vaccine coverage in England : 2012-13 [internet]. London: Public Health England (PHE) [citirano 2014 Oct 10]. Dosegljivo na: https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/266190/HPV_AnnualDataTable2012_13_SHA_acc2.pdf
24. Communication on immunisation – building trust. ECDC technical document [internet]. Stockholm: European Centre for Disease Control and Prevention (ECDC) [citirano 2014 Oct 11]. Dosegljivo na: <http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/TER-Immunisation-and-trust.pdf>
25. Cervical cancer vaccine [internet]. London: National Health Service (NHS) [citirano 2014 Oct 11]. Dosegljivo na: <http://www.nhs.uk/conditions/vaccinations/pages/hpv-human-papillomavirus-vaccine.aspx>
26. Tabrizi SN, Brotherton JM, Kaldor JM, et al. Assessment of herd immunity and cross-protection after a human papillomavirus vaccination programme in Australia: a repeat cross-sectional study. *Lancet Infect Dis.* 2014; 14 (10): 958–66.
27. Markowitz LE, Hariri S, Lin C, et al. Reduction in human papillomavirus (HPV) prevalence among young women following HPV vaccine introduction in the United States, National Health and Nutrition Examination Surveys, 2003-2010. *J Infect Dis.* 2013; 208 (3): 385–93.
28. Kavanagh K, Pollock KG, Potts A, et al. Introduction and sustained high coverage of the HPV bivalent vaccine leads to a reduction in prevalence of HPV 16/18 and closely related HPV types. *Br J Cancer.* 2014; 110 (11): 2804–11.
29. Crowe E, Pandeya N, Brotherton JM, et al. Effectiveness of quadrivalent human papillomavirus vaccine for the prevention of cervical abnormalities: case-control study nested within a population based screening programme in Australia. *BMJ.* 2014; 348: g1458.
30. Gertig DM, Brotherton JM, Budd AC, et al. Impact of a population-based HPV vaccination program on cervical abnormalities: a data linkage study. *BMC Med.* 2013; 11: 227.
31. Baldur-Felskov B, Dehlendorff C, Munk C, et al. Early impact of human papillomavirus vaccination on cervical neoplasia--nationwide follow-up of young Danish women. *J Natl Cancer Inst.* 2014; 106 (3): djt460.
32. Baldur-Felskov B, Dehlendorff C, Junge J, et al. Incidence of cervical lesions in Danish women before and after implementation of a national HPV vaccination program. *Cancer Causes Control.* 2014; 25 (7): 915–22.
33. Herweijer E, Leval A, Ploner A, et al. Association of varying number of doses of quadrivalent human papillomavirus vaccine with incidence of condyloma. *JAMA.* 2014; 311 (6): 597–603.
34. Ali H, Donovan B, Wand H, et al. Genital warts in young Australians five years into national human papillomavirus vaccination programme: national surveillance data. *BMJ.* 2013; 346: f2032.
35. Baandrup L, Blomberg M, Dehlendorff C, et al. Significant decrease in the incidence of genital warts in young Danish women after implementation of a national human papillomavirus vaccination program. *Sex Transm Dis.* 2013; 40 (2): 130–5.
36. Global Advisory Committee on Vaccine Safety. Human papillomavirus vaccines safety (HPV). *WER.* 2014; 89 (7): 58–61.
37. Chao C, Klein NP, Velicer CM, et al. Surveillance of autoimmune conditions following routine use of quadrivalent human papillomavirus vaccine. *J Intern Med.* 2012; 271 (2): 193–203.
38. Arnheim-Dahlstrom L, Pasternak B, Svanstrom H, et al. Autoimmune, neurological, and venous thromboembolic adverse events after immunisation of adolescent girls with quadrivalent human papillomavirus vaccine in Denmark and Sweden: cohort study. *BMJ.* 2013; 347: f5906.
39. Scheller NM, Pasternak B, Svanström H, et al. Quadrivalent human papillomavirus vaccine and the risk of venous thromboembolism. *JAMA.* 2014; 312 (2): 187–8.
40. Neželeni učinki pridruženi cepljenju v Sloveniji v letu 2012 [internet]. Ljubljana: Nacionalni inštitut za javno zdravje [citirano 2014 Sep 26]. Dosegljivo na: http://www.ivz.si/cepljenje/strokovna_javnost/porocila_o_nezelenih_ucinkih?pi=18&_18_view=item&_18_newsid=378&pl=259-18.0



AstraZeneca

Zdravje nas povezuje



AstraZeneca UK Limited
Podružnica v Sloveniji
Verovškova 55, 1000 Ljubljana
Tel.: 01/51 35 600



Your
Partner in
Molecular Testing
of Sexually Transmitted
Diseases

Biomedis M.B. d.o.o.

Slokanova 12 · 2000 Maribor · Slovenia · T +386 2 471 63 01 · F +386 2 471 63 04 · office@bmgrp.si
www.bmgrp.si

A black and white photograph of a Siemens VERSANT kPCR Molecular System in a laboratory. The machine is a large, boxy piece of equipment with a control panel on the right and a sample tray on the left. The tray is filled with several white PCR plates. A computer monitor and keyboard are visible on a desk to the left of the machine. The Siemens logo is visible on the top right of the machine. The background is a plain wall.

SIEMENS

Leading the way in molecular diagnostics.

www.siemens.com/molecular

The VERSANT kPCR Molecular System, now featuring the new VERSANT MiPLX Software Solution, is a comprehensive and flexible solution for molecular diagnostics.

The VERSANT® kPCR Molecular System is an automated solution that provides standardized sample extraction, flexible open-channel capabilities for laboratory-developed and third-party assays, and quality assays for infectious-disease testing.

The VERSANT kPCR Molecular System with the MiPLX Software Solution is from Siemens.

Siemens has a history of partnering with healthcare professionals to advance diagnostic testing through the screening and early detection of infectious diseases. The VERSANT kPCR Molecular System and the MiPLX Software Solution demonstrate our commitment to helping physicians better predict and monitor patient outcomes while offering streamlined workflow solutions for the lab.

The VERSANT kPCR Molecular System with the MiPLX Software Solution advances lab workflow through automation.

The VERSANT kPCR Molecular System provides flexibility, efficiency, and productivity with its ease of use, minimum hands-on time, maximum walkaway time, and fast turnaround time.

The VERSANT kPCR Molecular System: One Solution - More Choice

Answers for life.



Transfuzijska diagnostika

- Biorad-DiaMed - Imunohematologija, reagenti za določevanje krvnih skupin in tipizacija podskupin

Laboratorijska diagnostika

- Euro Diagnostica - avtoimunske bolezni - ANCA
- Diastat - avtoimunske bolezni - ANA, ENA, dsDNA
- Oxoid - mikrobiologija - dehidrirana in razlita gojišča ter dodatki, krvne kulture, diagnostični reagenti, hitri testi, testi O.B.I.S.
- Meridian - mikrobiološka virologija, bakteriologija, parazitologija, mikologija
- Copan - brisi
- Care Diagnostics - hitri testi - okultna krvavitev, ovulacijski testi, Strep-A, Strep-B
- American Diagnostica - onkologija, proteazni inhibitorji, proteini, Ab in serumi
- Bühlmann Laboratories - nevroimunologija, diagnostika celularnih alergij, vnetni parametri

Klinična diagnostika

- Abbott - imunologija, virologija, onkologija, biokemija
- Abbot Molecular - molekularna diagnostika



Medis, d.o.o. | Brnčičeva 1, 1231 Ljubljana-Črnuče | www.medis.si

KEMOMED

*Prinašamo
rešitve*



*Iščete rešitve na področju znanosti o življenju?
Potrebujete ustrezna orodja za analitiko?*

Mi vam jih ponujamo!

- Reagenti za diagnostiko in biomedicino
- Instrumenti in tehnična podpora
- Potrošni material
- Aplikativna pomoč
- Pipetni program in akreditirane kalibracije
- Plastika

4titude,

Bimos – Interstuhl
Büromöbel,

Bio-Rad Medical
Diagnostics,

Biolin Scientific,

Bioquell,

Biotage,

Biotest,

Delta T,

Ditabis,

EKF Diagnostic,

Eppendorf,

Eurofins GeneScan,

Eurofins Genomics,

Focus Diagnostics,

Hain Lifescience,

Heipha,

Hoefer,

IDEXX Laboratories,

Liofilchem,

Mart Microbiology,

Medical Wire
(MWE),

Molecular Devices
(Genetix),

Qiagen,

R-Biopharm,

Rosco Diagnostica,

SalvisLab,

Sarstedt,

Sifin,

Tecan,

Thermo Fisher
Scientific (Revco),

Ultra Violet
Products (UVP)



mediline



- ***laboratorijska oprema***
- ***potrošni materiali***
- ***reagenti***

Mediline mešana trgovska družba, d.o.o.

Perovo 30 | p.p. 5 | SI-1241 Kamnik | Slovenija

T +386 (0)1 830 80 40 | F +386 (0)1 830 80 70 / 63

E info@mediline.si | I www.mediline.si



BD BIOTEHNOLOGIJA

- Pretočni citometri
- Monoklonska protitelesa
- Celične kulture
- Falcon laboratorijska plastika
- Molekularna diagnostika

BD MIKROBIOLOŠKI SISTEMI

- Bactec sistemi za hemokulture
- Sensi disk
- Gojišča (Difco, BBL) in reagenti
- Identifikacijski sistemi Crystal, Phoenix ID/AST
- MGIT za TBC sistem

BD VACUTAINER

- Sistemi za odvzem krvi
- Urinski sistemi

BD MEDICAL

- Diabetes - insulinke in igle za peresnike
- IV terapija
- Injekcijski sistemi
- Anestezija



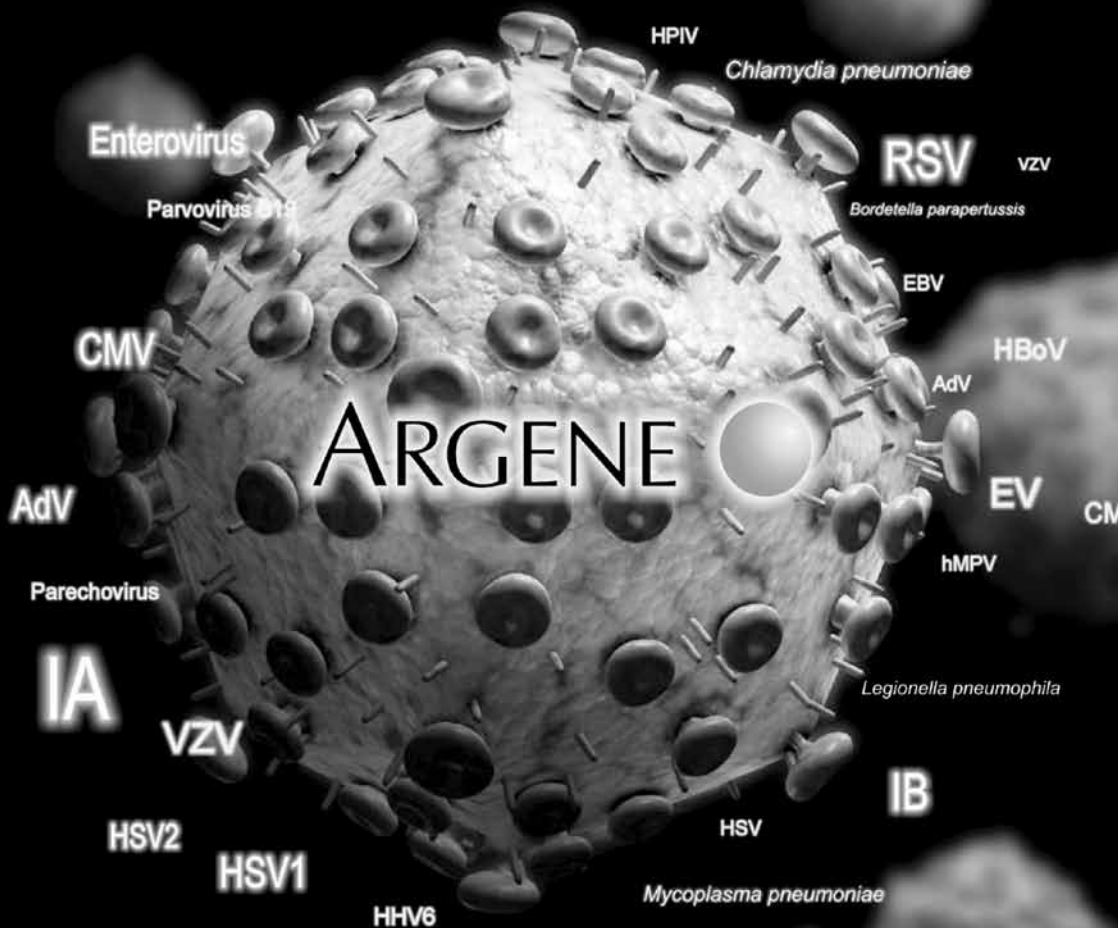
Z vami že od leta 1992.

Medias International d.o.o.
Leskoškova cesta 9D
SI-1000 Ljubljana
Telefon: 01 52 02 300
Fax: 01 52 02 495
info@medias-int.si
www.medias-int.si

Rešitev za optimizacijo diagnostike

VIRUSNIH in BAKTERIJSKIH

infekcij



+386 2 614 33 00

info@mikro-polo.si

+386 2 614 33 20

www.mikro-polo.si

mikro+polo
vaš partner za laboratorij



Dolinškova 8, 1000 Ljubljana
tel. 01 4273213, 4283650, fax 01 4273191
el. pošta: omega@omega.si

Nudimo strokovno, aplikativno in servisno podporo na področju kemijske analitike, molekularne biologije, biokemije in diagnostike v humani in veterinarski medicini.

Zastopstvo za:

Life Technologies



A Thermo Fisher Scientific Brand

Life Technologies, del Thermo Fisher Scientific je vodilno podjetje na področju molekularne biologije in biokemije. Nastalo je z združitvijo več družb kot so: Applied Biosystems, Invitrogen, Gibco, Molecular Probes, Novex, Ion Torrent



AB Sciex je vodilno podjetje na področju masne spektroskopije.

PerkinElmer



Perkin Elmer je korporacija z več kot 80-letno tradicijo in je eno vodilnih podjetij na svojem področju.

REMAS

Z znanjem do cilja. ✓



DEDICATED TO MICROBIOLOGY



virion\serion



BIOREBA

Your Partner in Agro-Diagnostics

MicroBiLogics®

human

EUROIMMUN

Medizinische
Labor Diagnostika
AG



ReMaS d.o.o. | Koseška cesta 8 | 1000 Ljubljana | Slovenia

www.remas.si

T 00386 1 58 19 205

F 00386 1 58 19 232

remas@siol.net

