
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Evidențierea prin PCR a etiologiei unor boli sexual-transmisibile în România

Doctorand **Alecsandra-Iulia Demian (Grad)**

Conducător de doctorat **Prof.dr. Dumitru Alexandru Tătaru**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	13
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	
1. Bolile cu transmitere sexuală	17
1.1. Epidemiologie	17
1.2. Etiologie	18
1.2.1. Factori favorizanți	18
1.2.2. Agenți patogeni	18
1.3. Aspecte clinice	19
1.4. Metode de diagnostic în bolile cu transmitere sexuală	20
1.5. Tratament	22
2. Agenți patogeni evidențiați prin PCR	23
2.1. Chlamydia trachomatis	23
2.2. Neisseria gonorrhoeae	27
2.3. Ureaplasma urealiticum	29
2.4. Mycoplasma hominis	30
2.5. Mycoplasma genitalium	31
2.6. Trichomonas vaginalis	33
3. PCR ca metodă de diagnostic	35
3.2. Caracteristici generale	35
3.3. Specimene utilizate	35
3.4. Rezultate fals pozitive	36
3.5. Rezultate fals negative	36
4. Rezistența NG la antibiotice	37
5. Cunostințele și percepția tinerilor în materie de sex și BTS	39
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	
1. Ipoteza de lucru / Obiective	43
2. Studiul 1 - Utilizarea PCR pentru diagnosticarea celor mai frecvente șase BTS	45
2.1. Introducere	45
2.2. Obiective	46
2.3. Material și metodă	46
2.4. Rezultate	50
2.5. Discuții	64
2.6. Concluzii	68
3. Studiul 2 - Evidențierea rezistenței antibiotice în cazul NG	71
3.1. Introducere	71

3.2. Obiective	72
3.3. Material și metodă	72
3.4. Rezultate	75
3.5. Discuții	80
3.6. Concluzii	82
4. Studiul 3 - Evaluarea cunoștințelor despre BTS și a obiceiurilor sexuale în rândul tinerilor din România	85
4.1. Introducere	85
4.2. Obiective	86
4.3. Material și metodă	86
4.4. Rezultate	88
4.5. Discuții	99
4.6. Concluzii	104
5. Concluzii generale	107
6. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	109
REFERINȚE	111

Cuvinte cheie: boli cu transmitere sexuală, PCR, rezistență bacteriană, ciprofloxacina, comportament sexual, cunoștințe sexuale.

INTRODUCERE

Bolile cu transmitere sexuală (BTS) reprezintă unul dintre cele mai frecvente motive de prezentare la medicul dermatovenerolog și urolog, beneficiind de o mare varietate de metode de depistare. În practica clinică este utilizată frecvent abordarea sindromică a BTS-urilor și instituirea tratamentului antibiotic în absența unui diagnostic de certitudine. Aceasta se datorează timpului îndelungat necesar eliberării unui rezultat în urma utilizării metodelor clasice de diagnostic al BTS-urilor.

Progresul tehnologic a dus la elaborarea metodelor moleculare de diagnostic al BTS-urilor, acestea caracterizându-se prin rapiditate, sensibilitate și specificitate ridicate, posibilitatea de a analiza sute de probe simultan și de a evidenția agenți patogeni multipli dintr-un singur specimen utilizat.

Secundar instituirii exhaustive a tratamentului antibiotic fără a beneficia de un diagnostic de certitudine și de testare a sensibilității agentului etiologic la diferite antibiotice, sunt raportate multiple cazuri de rezistență bacteriană. *Neisseria gonorrhoeae* (NG) este una dintre bacteriile care a devenit rezistentă la multiple antibiotice, reprezentând o amenințare pe termen lung.

Cele mai multe BTS-uri sunt diagnosticate în rândul tinerilor, motiv pentru care studierea și înțelegerea comportamentului sexual al acestora reprezintă o primă metodă pentru prevenirea acestor boli.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Proporția crescută a formelor asimptomatice de BTS-uri determină subdiagnosticarea și diseminarea acestora. Majoritatea acestor boli sunt tratabile, dar în absența unui tratament corect și prompt, pot să apară complicații pe termen scurt, mediu și lung: cervicită, uretrită, naștere prematură, boala inflamatorie pelvină, endometrioză și infertilitate.

Cele mai frecvente BTS-uri curabile sunt sifilisul, gonoreea, infecția cu *Chlamydia trachomatis* (CT), tricomonioza, iar hepatita B, herpesul genital, infecția cu HIV și cea cu HPV reprezintă BTS-uri incurabile, dar simptomele acestora pot să fie diminuate sau modificate prin tratament.

Una dintre regulile de bază în evaluarea unui pacient cu suspiciune diagnostică de BTS este căutarea asocierilor dintre diferiți agenți patogeni. Acest lucru este dificil de pus în practică deoarece sunt necesare analize multiple, costisitoare și, de cele mai multe ori, specimene colectate prin metode invazive. Utilizarea kitului Seeplex STD 6 ACE Detection pentru diagnosticarea prin PCR din urină a celor mai frecvente 6 BTS-uri, respectiv: infecția cu CT, gonoreea, infecția cu *Mycoplasma hominis* (MH), infecția cu *Mycoplasma genitalium* (MG), tricomoniază și infecția cu *Ureaplasma urealyticum* (UU) s-a dovedit superioară celorlalte metode diagnostice, deoarece poate identifica simultan agenți patogeni multipli, într-un timp scurt de lucru, utilizând specimene colectate non-invaziv.

Secundar utilizării intempestive a antibioticelor, s-a dezvoltat un fenomen biologic natural, intitulat rezistență la antibiotice, aceasta reprezentând capacitatea bacteriilor de a fi rezistente la tratamentul antibiotic, fapt care se datorează dezvoltării și multiplicării acestora într-un mediu cu o concentrație crescută de antibiotic. NG a dezvoltat o serie de mecanisme prin care a devenit rezistentă la antibiotice, astfel putând supraviețui atacului acestora.

Testele moleculare de depistare a rezistenței NG la antibiotice sunt fezabile mai ales în cazul fluoroquinolonelor, deoarece în acest caz mutațiile apar în baze definite din genele gonococice *gyrA* și *parC*.

Conform statisticilor World Health Organisation (WHO), tinerii cu vârsta cuprinsă între 15 și 24 de ani sunt responsabili pentru aproximativ jumătate din cazurile de BTS nou diagnosticate. Asociat acestui număr mare de BTS-uri diagnosticate în cazul tinerilor, se observă și o creștere a numărului de sarcini nedorite, care, secundar, determină creșterea numărului de avorturi la această grupă populațională.

Unul din fiecare 2 cazuri noi de infecție cu HIV diagnosticate în lume survine la un tânăr cu vârsta cuprinsă între 15 și 24 de ani, iar în SUA, aproximativ jumătate dintre tinerii activi sexual contactează o BTS până la vârsta de 25 de ani, conform statisticilor WHO. Din aceste motive, este de mare interes studierea comportamentului sexual, dar și a cunoștințelor tinerilor cu privire la BTS, deoarece acestea reprezintă atitudini modificabile, fapt care ar putea determina reducerea numărului de cazuri nou diagnosticate de BTS.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

Studiul I abordează utilizarea metodei PCR pentru diagnosticarea a 6 dintre cei mai frecvenți agenți patogeni ai BTS-urilor, respectiv: CT, NG, UU, MG, MH și TV.

Specimenul utilizat este urina deoarece aceasta prezintă avantajul colectării printr-o metodă non-invazivă.

În prezentul studiu au fost incluși 249 de pacienți recrutați multidisciplinar în perioada ianuarie 2014 – martie 2017. Aceștia au fost împărțiți, în funcție de simptomatologie, în două loturi: asimptomatici și simptomatici. Analiza prin PCR a probelor de urină colectate s-a efectuat în cadrul Catedrei de Biologie Celulară și Moleculară a Universității de Medicină și Farmacie Iuliu Hațieganu din Cluj Napoca.

Cunoscut fiind faptul că BTS-urile sunt mult mai frecvente în rândul tinerilor, majoritatea pacienților incluși în studiul acesta se încadrează în intervalul de vârstă 21 – 30 de ani. Interesul crescut al populației cu privire la propria stare de sănătate reiese din numărul mare de pacienți asimptomatici care au solicitat efectuarea testării PCR. Simptomatologia BTS-urilor se manifestă cu precădere la bărbați, motiv pentru care aceștia predomină în acest studiu.

Infecția cu CT este cea mai frecventă BTS identificată, existând o asociere între aceasta și sexul masculin. Pe locul al doilea ca frecvență se situează infecția cu UU, iar asocierea dintre UU și CT predomină în prezentul studiu. Gonoreea se situează pe locul al treilea ca frecvență, deși, conform literaturii de specialitate, aceasta este pe locul al doilea după infecția cu CT. Infecția cu MG a fost identificată numai în cazul bărbaților, iar MH este mai frecventă la pacienții simptomatici. Tricomoniaza este rară, fiind identificat un singur caz. Au fost identificate asocieri triple, cvadruple și cvintuple de agenți patogeni, ceea ce reprezintă o particularitate a acestui studiu.

Studiul II este intitulat Evidențierea rezistenței antibiotice în cazul NG și include cei 18 pacienți diagnosticați cu gonoree în studiul I. Rezistența bacteriană este cel mai des observată în cazul NG, iar pe locul doi se situează MG, în timp ce CT, UU, MH și TV prezintă rezistență bacteriană la antibiotice în cazuri izolate. ADN-ul obținut de la cei 18 pacienți diagnosticați cu gonoree a fost amplificat prin PCR utilizând primeri pentru genele *gyrA*, *parC* și *dcmH*.

Tulpinile de NG rezistente la ciprofloxacina sunt rare în populația studiată, dar cele intermediar rezistente sunt frecvente, motiv pentru care recomandăm precauție în prescrierea acestui antibiotic ca tratament al gonoreei. Majoritatea tulpinilor de NG sunt sensibile la ciprofloxacina, ceea ce semnifică faptul că, în cazuri speciale (alergie la cefalosporine), ciprofloxacina reprezintă o alternativă sigură. Antecedentele personale de BTS nu reprezintă un factor de risc pentru dezvoltarea unor tulpini de NG rezistente la ciprofloxacina, deși acestea reprezintă unul dintre principalii factori de risc ai BTS-urilor. Gonoreea se asociază frecvent cu alte BTS-uri, fiind observată o asociere semnificativă statistic între acestea și rezistența NG la ciprofloxacina.

Studiul III evaluează cunoștințele despre BTS, dar și obiceiurile sexuale în rândul tinerilor din România, fiind distribuite 4194 de chestionare prin intermediul Facebook, în rândul studenților cu vârsta cuprinsă între 18 și 25 de ani.

Majoritatea studenților români sunt heterosexuali, iar homosexualitatea este mai frecventă în rândul bărbaților. Debutul precoce al vieții sexuale (sub 14 ani) se asociază cu o proporție crescută de tineri care nu utilizează prezervativul, cu un număr crescut de parteneri sexuali și cu absența testării HIV și a altor BTS-uri, concluzie ce coincide cu datele din literatura de specialitate conform cărora comportamentele sexuale riscate se asociază în rândul tinerilor. Una dintre concluziile îngrijorătoare ale acestui studiu este că o treime din studenți nu utilizează contracepție. Peste 90% dintre studenții chestionați consideră necesară implementarea orelor de educație sexuală în școli, ceea ce reflectă dorința de cunoaștere a acestora.

Concluziile generale

Identificarea BTS-urilor prin PCR s-a dovedit o metodă eficientă de cuantificare a frecvenței acestora în România.

Deși rezistența NG la ciprofloxacina este rară în România, se recomandă precauție la instituirea acestui tratament antibiotic în cazul gonoreei deoarece tulpinile de NG intermediar rezistente la ciprofloxacina sunt frecvente.

Debutul precoce (sub 14 ani) al vieții sexuale este mai frecvent în rândul bărbaților și se asociază cu un risc crescut de a nu utiliza contracepție, dar și cu un număr mai mare de parteneri sexuali, cu absența testării HIV și a altor BTS-uri. Necesitatea includerii orelor de educație sexuală în curricula școlară este recunoscută de peste 90% dintre studenții incluși în studiu.

Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

Originalitatea studiului I constă în faptul că aduce primele rezultate din România cu privire la depistarea BTS-urilor prin PCR, metodă neabordată încă de cercetările românești.

Cel de-al doilea studiu se remarcă prin faptul că evaluarea rezistenței NG la ciprofloxacina prin metoda PCR nu a mai fost studiată în țara noastră, iar la nivel internațional sunt un număr redus de studii care să abordeze această problemă.

Până la ora actuală, cel de-al treilea studiu din teza de doctorat este prima cercetare națională care evaluează cunoștințele și comportamentul sexual în rândul tinerilor români, fiind caracterizat de un eșantion de dimensiuni mari, dar și de o abordare inovativă a tinerilor prin intermediul platformei de socializare Facebook.

ABSTRACT OF THE DOCTORAL THESIS

Identifying by PCR the etiology of sexually transmitted diseases in Romania

PhD Student **Alecsandra-Iulia Demian (Grad)**

PhD Supervisor **Prof.dr. Dumitru Alexandru Tătaru**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CONTENTS

INTRODUCTION	13
CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	
1. Sexually transmitted diseases	17
1.1. Epidemiology	17
1.2. Etiology	18
1.2.1. Favorable factors	18
1.2.2. Pathogens	18
1.3. Clinical aspects	19
1.4. Diagnostic methods in sexually transmitted diseases	20
1.5. Treatment	22
2. Pathogens identified by PCR	23
2.1. Chlamydia trachomatis	23
2.2. Neisseria gonorrhoeae	27
2.3. Ureaplasma urealiticum	29
2.4. Mycoplasma hominis	30
2.5. Mycoplasma genitalium	31
2.6. Trichomonas vaginalis	33
3. PCR as a diagnostic method	35
3.2. General characteristics	35
3.3. Specimens used	35
3.4. False positive results	36
3.5. False negative results	36
4. Resistance of NG to antibiotics	37
5. Young people's knowledge and perception of gender and STD	39
PERSONAL CONTRIBUTION	
1. Working hypothesis / Objectives	43
2. Study 1 - Use of PCR to diagnose the most common six STDs	45
2.1. Introduction	45
2.2. Objectives	46
2.3. Material and method	46
2.4. Results	50
2.5. Discussions	64
2.6. Conclusions	68
3. Study 2 - Emphasizing antibiotic resistance in NG	71
3.1. Introduction	71
3.2. Objectives	72
3.3. Material and method	72

3.4. Results	75
3.5. Discussions	80
3.6. Conclusions	82
4. Study 3 - Evaluating knowledge about STD and sexual habits among young people in Romania	85
4.1. Introduction	85
4.2. Objectives	86
4.3. Material and method	86
4.4. Results	88
4.5. Discussions	99
4.6. Conclusions	104
5. General conclusions	107
6. Originality and innovative contributions of the thesis	109
REFERENCES	111

Key words: sexually transmitted diseases, PCR, bacterial resistance, ciprofloxacin, sexual behavior, sexual knowledge.

INTRODUCTION

Sexually Transmitted Diseases (STDs) are one of the most common reasons for presenting to a dermatovenerologist and urologist with a wide variety of screening methods. In clinical practice, the syndromic approach of STDs and antibiotic treatment are frequently used in the absence of a certainty diagnosis. This is due to the long time required to deliver results following the classic diagnostics methods for STDs.

Technological progress has led to the development of molecular diagnostic methods for STDs, characterized by rapidity, high sensitivity and specificity, the ability to analyze hundreds of samples simultaneously and to identify multiple pathogens in a single specimen used.

Secondary to the exhaustive establishment of antibiotic therapy without a certainty of diagnosis and without testing of the agent's sensitivity to different antibiotics, multiple cases of bacterial resistance are reported. *Neisseria gonorrhoeae* (NG) is one of the bacterias that has become resistant to multiple antibiotics, representing a long-term threat.

Most STDs are diagnosed among young people, so studying and understanding their sexual behavior is a first modality to prevent these diseases.

CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

The increased proportion of asymptomatic forms of STDs determines their subdiagnosis rate and dissemination. Most of these diseases are treatable, but in the absence of correct and prompt treatment, short, medium and long term complications may occur: cervicitis, urethritis, premature birth, pelvic inflammatory disease, endometriosis and infertility.

The most common curable BTS are syphilis, gonorrhea, *Chlamydia trachomatis* (CT) infection, trichomoniasis, while hepatitis B, genital herpes, HIV infection and HPV are incurable STDs, but their symptoms may be diminished or modified with treatment.

One of the basic rules in assessing a patient with a suspicion of STD is the search for associations between different pathogens. This is difficult to put into practice because multiple and expensive analyzes are needed and, most of the time, specimens collected by invasive methods are required. The use of the Seeplex STD 6 ACE Detection kit for urine PCR diagnosis for the most common 6 STDs, respectively:

CT infection, gonorrhoea, *Mycoplasma hominis* (MH) infection, *Mycoplasma genitalium* (MG) infection, Trichomoniasis and infection *Ureaplasma urealyticum* (UU) has proved to be superior to other diagnostic methods because it can simultaneously identify multiple pathogens in a short working time, using non-invasive collected specimens.

Secondary to the inappropriate use of antibiotics, a natural biological phenomenon called antibiotic resistance has developed, this being the ability of bacteria to be resistant to antibiotic treatment, which is due to their development and multiplication in a medium with an increased antibiotic concentration. NG has developed a number of mechanisms by which it has become resistant to antibiotics, thus surviving their attack.

Molecular tests for detecting NG resistance to antibiotics are feasible especially for fluoroquinolones, as mutations occur in bases defined by the *gyrA* and *parC* gonococcal genes.

According to the World Health Organization (WHO) statistics, young people aged between 15 and 24 are responsible for about half of newly diagnosed STD cases. Associated with this large number of STDs diagnosed in case of young people, there is also an increase in the number of unwanted pregnancies, which, in turn, lead to an increase in the number of abortions in this population group.

One out of every 2 new cases of HIV infection in the world occurs in a young man between the ages of 15 and 24, and in the USA about half of the sexually active young people contract a STD until the age of 25, according to WHO statistics. For these reasons, it is of great interest to study the sexual behavior and the youngsters' knowledge regarding STDs as these are modifiable attitudes, which could lead to a reduction in the number of cases newly diagnosed.

PERSONAL CONTRIBUTION

Study I addresses the use of the PCR method to diagnose 6 of the most common pathogens of STDs: CT, NG, UU, MG, MH and TV. The specimen used is urine because it has the advantage of collecting by a non-invasive method.

This study included 249 patients recruited multidisciplinary between January 2014 and March 2017. They were divided according to symptomatology into two groups: asymptomatic and symptomatic. PCR analysis of collected urine samples was performed at the Department of Cellular and Molecular Biology of the University of Medicine and Pharmacy "Iuliu Hațieganu" from Cluj Napoca.

Knowing that STDs are more common among young people, most of the patients included in this study fall within the age range of 21 to 30 years. The increased interest of the population regarding their own health status results from the large number of asymptomatic patients who have requested PCR testing. Symptoms of STDs are manifested primarily in men, which is why they predominate.

CT infection is the most common STD identified, with a strong association with the male sex. Second as frequency is UU infection, and the association between UU and CT prevails in this study. Gonorrhoea is ranked the third as the frequency, although according to the literature, it is second after CT infection. MG infection was only identified in males and MH is more common in symptomatic patients. Trichomoniasis is rare, with only one case identified. Combinations of triple, quadruple and quintuple pathogens have been identified, which is a peculiarity of this study.

Study II is titled Evidence of Antibiotic Resistance in NG and includes the 18 patients diagnosed with gonorrhoea in Study I. Bacterial resistance is most often observed in NG and second place is MG, while CT, UU, MH and TV shows bacterial resistance to antibiotics only in isolated cases.

The DNA obtained from the 18 patients diagnosed with gonorrhoea was amplified by PCR using primers for the *gyrA*, *parC* and *dcmH* genes.

Ciprofloxacin-resistant NG strains are rare in the studied population, but intermediate-resistant strains are common, which is why we recommend caution in recommending this antibiotic as a treatment for gonorrhoea. Most NG strains are sensitive to ciprofloxacin, which means that ciprofloxacin is a safe alternative in special cases (allergy to cephalosporins). The personal history of STDs is not a risk factor for the development of ciprofloxacin-resistant NG strains, although these are one of the main risk factors for STDs. Gonorrhoea is commonly associated with other STDs, with a statistically significant association between them and NG resistance to ciprofloxacin.

Study III evaluates the knowledge about STDs and sexual habits among young people in Romania, with 4194 questionnaires distributed via Facebook among students aged 18-25.

Most Romanian students are heterosexual and homosexuality is more common among men. Early onset of sexual life (under 14 years of age) is associated with an increased proportion of non-condom using youngsters with an increased number of sexual partners and lack of HIV and other STDs testing, a conclusion coinciding with data from the literature according to which risky sexual behaviors are associated among young people. One of the worrying findings of this study is that one-third of students do not use contraception. More than 90% of surveyed students consider it is

necessary to implement sexual education classes in schools, reflecting the desire for this knowledge.

General conclusions

Identifying STDs through PCR has been an effective method of quantifying their frequency in Romania.

Although NG resistance to ciprofloxacin is rare in Romania, it is recommended to prevent this antibiotic treatment for gonorrhoea because the ciprofloxacin-resistant intermediate strains are common.

Early onset (under 14 years) of sexual activity is more common among men and it is associated with an increased risk of not using contraception, but also with a greater number of sexual partners, with the absence of HIV and other STDs testings.

The need to include sexual education classes in schools curricula is recognized by over 90% of the students enrolled in this study.