

PCR – METODA INOVATIVĂ, SIGURĂ ȘI RAPIDĂ PENTRU DEPISTAREA INFECȚIILOR CU TRANSMITERE SEXUALĂ

PCR – METHOD INNOVATIVE, SAFE AND QUICK TO DETECT SEXUALLY TRANSMITTED INFECTIONS

ALECSANDRA-IULIA GRAD*, MIHAELA LAURA VICĂ**, H. V. MATEI**, D. A. TĂTARU*

Rezumat

Introducere: Majoritatea infecțiilor cu transmitere sexuală (ITS) sunt asimptomatice, ceea ce duce la întârzierea diagnosticului și tratamentului. Deși există o gamă variată de metode de depistare a ITS-urilor, reacția de polimerizare în lanț (PCR) este o metodă rapidă, sigură, noninvasivă și prezintă sensibilitate și specificitate înaltă. Ca specimen pentru efectuarea PCR se utilizează prima urină de dimineață, specimen care prezintă avantajul autocolectării și noninvasivității. Prin această metodă se pot depista 6 agenți patogeni: *Chlamydia trachomatis* (CT), *Neisseria gonorrhoeae* (NG), *Mycoplasma genitalium* (MG), *Mycoplasma hominis* (MH), *Ureaplasma urealyticum* (UU) și *Trichomonas vaginalis* (TV).

Metodă: Se autocolectează, într-un recipient steril, prima urină de dimineață. În cadrul laboratorului, urina este supusă extragerii ADN, apoi acesta este amplificat, într-o etapă ulterioară se face electroforeză în gel de agaroză, iar, în final, produșii sunt examinați în lumina UV.

Caz clinic: Pacient în vârstă de 33 de ani este trimis de medicul urolog pentru efectuarea PCR, menționând faptul că pacientul este asimptomatic, urocultura și spermocultura sunt negative, iar acesta prezintă

Summary

Introduction: Most sexually transmitted infections (STIs) are asymptomatic, which leads to delayed diagnosis and treatment. Although there is a variety of methods to detect STIs, the polymerase chain reaction (PCR) is a quick, safe, non-invasive method and shows high sensitivity and specificity. First morning urine is used as a specimen, having the advantage of non-invasiveness and self-collection. This method can detect six pathogens: *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* UU and *Trichomonas vaginalis*.

Method: The first morning urine is self-collected in a sterile container. In the laboratory, urine is subject to DNA extraction, then this is amplified, in a subsequent step, agarose gel electrophoresis is performed, and finally, the products are examined under UV light.

Clinical case report: Patient aged 33 is sent by the urologist to perform PCR, noting that the patient is asymptomatic, the urine culture and semen culture are negative, and he presented with infertility for 2 years. The PCR result is positive for CT, NG and UU.

Discussion: PCR can detect simultaneous STIs, resulting in a targeted and accurate treatment, with a short working time, available to every clinician.

* Clinica Dermatologie Cluj-Napoca și Universitatea de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca.

** Catedra de Biologie Celulară și Moleculară a Universității de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca

infertilitate de 2 ani. Rezultatul analizei PCR este pozitiv pentru CT, NG și UUU.

Discuții: Prin PCR se pot depista ITS concomitente, fapt care duce la un tratament țintit și corect, într-un timp scurt de lucru, fiind la îndemâna oricărui clinician.

Concluzie: PCR utilizată în depistarea ITS-urilor prezintă ca avantaje rapiditatea, noninvasivitatea și detectarea simultană a 6 agenți patogeni: CT, NG, MG, MH, UUU și TV, avantaje necesare unui program de screening.

Cuvinte cheie: PCR, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Trichomonas vaginalis*.

Intrat în redacție: 10.08.2015

Acceptat: 3.09.2015

Conclusion: PCR used in detecting STIs shows the following advantages: rapidity, non-invasiveness and simultaneous detection of six pathogens: CT, NG, MG, MH, UUU and TV, advantages needed by a screening program.

Keywords: PCR, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Trichomonas vaginalis*.

Received: 10.08.2015

Accepted: 3.09.2015

Introducere

Conform unui raport al Centers for Disease Control and Prevention, în anul 2013, în Statele Unite ale Americii au fost raportate 1.401.906 cazuri noi de infecție cu *Chlamydia trachomatis* (CT) și 333.004 cazuri noi de infecție cu *Neisseria gonorrhoeae* (NG) (1). În Europa, conform unui raport al European Center for Disease Control and Prevention, s-a raportat în anul 2010 un procent de 186 de cazuri de infecție cu CT la 100.000 de locuitori și 10,4 cazuri de infecție cu NG la 100.000 de locuitori (2). Se constată diferențe semnificative față de datele raportate în Statele Unite ale Americii, conform cărora rata de infecție cu CT este de 446,6/100.000 locuitori, iar cea de infecție cu NG este de 106,1/100.000 locuitori (1). Absența unui program de screening al infecțiilor cu transmitere sexuală (ITS) în România, duce la lipsa datelor cu privire la frecvența acestora.

Majoritatea bolilor cu transmitere sexuală sunt asimptomatice pentru o perioadă variabilă de timp (3, 4, 5). Numărul mare de forme asimptomatice duce la subevaluarea numărului real de ITS-uri și accentuează necesitatea implementării unui program de screening.

În cazul femeilor, ITS-urile pot determina cervicita, boala inflamatorie pelvină, salpingita, avort spontan și naștere prematură (6, 7, 8). Femeile au risc de 3 ori mai mare de infecție cu CT față de bărbați (9).

În cazul bărbaților, ITS-urile pot determina uretrita, epididimita și prostatita cronică (6, 10). Atât în cazul femeilor cât și în cazul bărbaților,

Introduction

According to a report by the Centers for Disease Control and Prevention, in 2013, the United States reported 1,401,906 new cases of infection with *Chlamydia trachomatis* and 333,004 new cases of infection with *Neisseria gonorrhoeae* (NG) (1). In Europe, according to a report by the European Center for Disease Control and Prevention, in 2010, there were reported 186 cases of CT infection per 100,000 inhabitants and 10.4 cases of NG infection per 100,000 inhabitants (2). There are significant differences compared with data reported in the United States, according to which the CT infection rate is 446.6/100,000 inhabitants, and the NG infection rate is 106.1/100,000 inhabitants. The absence of a screening program for sexually transmitted infections in Romania leads to a lack of data on their frequency.

Most sexually transmitted diseases are asymptomatic for a variable period of time. The large number of asymptomatic forms leads to the undervaluation of the actual number of STIs and emphasizes the need to implement a screening program.

In women, STIs can cause cervicitis, pelvic inflammatory disease, salpingitis, miscarriage and premature birth. Women have a three times higher risk of CT infection compared to men.

In men, STIs can cause urethritis, epididymitis and chronic prostatitis. Both for women and for men, STIs may cause infertility and increase susceptibility to HIV infection.

ITS-urile pot determina infertilitate și cresc susceptibilitatea de a contracta HIV (11, 12, 13, 14).

La ora actuală sunt prezente o mare varietate de metode de laborator care identifică ITS-urile, începând cu cultura bacteriană și mergând până la teste de amplificare a ADN (NAAT) (12). Dezavantajul culturilor bacteriene constă în faptul că numai bacteriile viabile pot fi identificate, pe când cu ajutorul NAAT, de exemplu reacția de polimerizare în lanț (PCR), pot fi identificate atât bacteriile viabile cât și cele non-viabile (3). Sensibilitatea și specificitatea crescută a NAAT reprezintă principalul avantaj față de celelalte teste (7, 15).

PCR se folosește pentru a analiza o largă gamă de specimene incluzând urina, secreție uretrală și secreție vaginală (16). Metoda de recoltare invazivă a secreției vaginale și uretrale a determinat mai mulți pacienți să nu efectueze teste de identificare a ITS (17). Specimenele care pot fi autocolectate, de exemplu urina și secreția vaginală, au avantajul non-invazivității și pot crește numărul pacienților care acceptă testarea pentru ITS cât și aplicabilitatea programelor de screening (10).

În cazul bărbaților, chiar dacă secreția uretrală s-a dovedit a avea sensibilitate și specificitate crescută față de prima urină în cazul analizelor imunologice, când s-au efectuat NAAT, această diferență a fost redusă (3).

În cazul femeilor, există o strânsă concordanță între secreția vaginală sau urină și secreția endocervicală, ca specimen pentru identificarea ITS-urilor (18). Urina, față de secreția endocervicală, are avantajul autocolectării, reprezentând metoda de recoltare preferată comparativ cu secreția vaginală (19). Prima urină de dimineață este specimenul preferat de identificare a ITS-urilor în cazul ambelor sexe.

PCR efectuată pe prima urină de dimineață este capabilă să identifice un număr egal sau chiar mai mare de ITS comparative cu aceeași analiză efectuată din secreție uretrală, endocervicală sau spermă (13). PCR este o metodă convenabilă pentru clinicieni deoarece poate testa simultan, într-un timp scurt, 6 agenți patogeni: CT, NG, *Mycoplasma hominis* (MH), *Mycoplasma genitalium* (MG), *Ureaplasma urealyticum* (UU) și *Trichomonas vaginalis* (TV).

Currently there are a wide variety of laboratory methods for STI detection, ranging from bacterial culture to amplification assay. The disadvantage of bacterial cultures is that only viable bacteria can be identified, while using NAAT, for example the polymerase chain reaction, there can be identified both viable and non-viable bacteria (3). The increased sensitivity and specificity of NAAT is the main advantage over the other tests.

PCR is used to analyze a wide variety of specimens including urine, urethral discharge and vaginal discharge. The invasive method of vaginal and urethral discharge collection caused many patients to avoid STI identification tests. Specimens that can be self-collected, for example urine and vaginal secretions, have the advantage of non-invasiveness and may increase the number of patients who accept STI testing, and the applicability of screening programs.

For men, although urethral discharge has been shown to have higher sensitivity and specificity compared to the first urine in the case of immunoassays, when nucleic acid amplification tests (NAATs) have been performed, this difference has been reduced.

For women, there is a strong concordance between vaginal discharge or urine and endocervical secretion, as a specimen to identify STIs. Urine, compared to endocervical secretion, has the advantage of self-collection, representing the preferred collection method compared to vaginal discharge. The first morning urine is the proffered specimen for identification of STIs in both sexes.

PCR performed using the first morning urine is able to identify an equal or greater number of STIs compared to the same analysis performed using urethral discharge, endocervical secretion or sperm. PCR is a convenient method for clinicians because it can simultaneously test, within a short period of time, six pathogens: CT, NG, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma urealyticum* and *Trichomonas vaginalis*.

Method

In the morning, without having urinated for at least 4 hours, 50 ml of urine is collected in a sterile container for the collection of urine. The

Metodă

Dimineața, fără a fi urinat de cel puțin 4 ore, 50 ml de urină se autocolectează într-un recipient steril pentru colectarea urinei. Recipientele sunt transportate la laborator fără a se adăuga mediu de transport, stocate la 4°C și examinate în următoarele maxim 7 zile.

În cadrul laboratorului, după ce atinge temperatura camerei, 1 ml (se pot folosi cantități de până la 10 ml, în funcție de turbiditatea probei) de urină se centrifughează timp de 15 minute la 14000 g pentru a obține sedimentul, care apoi se resuspendă în PBS prin vortexare.

1. Extragerea ADN-ului

S-a folosit kitul „Epicenter MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit”. 150 μl din probă se transferă în tuburi pentru microcentrifugă și se adaugă soluție de liză care conține proteinaza K, apoi se incubează la 65°C timp de 15 minute.

Într-o etapă ulterioară, proba se răcește la 37°C, se adaugă RN-aza A și se incubează la 37°C timp de 30 minute, apoi se plasează pe gheață timp de 5 minute. Se adaugă reactiv pentru precipitarea proteinelor și se vortexează viguros pentru a precipita proteinele. Proteinele se separă prin centrifugarea la 14000 G timp de 10 minute. Supernatantul care conține ADN-ul este amestecat cu isopropanol, tubul se răstoarnă de 30-40 de ori și apoi se centrifughează, astfel ADN-ul depunându-se în peletă (figura 1). ADN-ul este



Fig. 1. Buffer cu ADN în tub pentru microcentrifugă (Catedra de Biologie Celulară și Moleculară a Universității de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca)

Fig. 1. Buffer DNA in microcentrifuge tube (Department of Molecular and Cell Biology, University of Medicine and Pharmacy „Iuliu Hatieganu” Cluj-Napoca)

containers are transported to the laboratory without the addition of a transport medium, stored at 4°C and examined in the following 7 days at the most.

In the laboratory, after reaching room temperature, 1 ml (amounts of up to 10 ml can be used, depending on the turbidity of the sample) of urine is centrifuged for 15 minutes at 14,000 g to obtain the residue, which is then re-suspended in PBS by vortexing.

1. DNA extraction

The „Epicenter MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit” is used. 150 μl of sample are transferred to the microcentrifuge tubes and lysis solution containing proteinase K is added, then it is incubated at 65°C for 15 minutes.

In a subsequent step the sample is cooled to 37°C, RNase A is added and it is incubated at 37°C for 30 minutes, then it is placed on ice for 5 minutes. Protein precipitation reagent is added and the sample is vigorously vortexed to precipitate proteins. Proteins are separated by centrifugation at 14,000 G for 10 minutes. The supernatant containing DNA is mixed with isopropanol, the tube is inverted 30-40 times and then centrifuged, thereby depositing the DNA in the pellet. DNA is washed twice with 75% ethanol and re-suspended in TE Buffer. Finally, about 35 μl of buffer with DNA result.

DNA concentration and purity is determined using a NanoPhotometer. When DNA concentration was not high enough, the DNA extraction has been recovered from a larger sample. If purity was not enough, the DNA purification sequence is resumed.

2. DNA amplification by PCR

For this step, the kit called „Seeplex® STD6 ACE Detection” is used. The primers, DNA polymerase, dNTPs, internal control and solution for preventing cross contamination are mixed in an Eppendorf. This mixture is placed in PCR tubes, the DNA sample from the patient together with the positive and negative control are added, and placed in the thermocycler.

This mixture is subjected to 40 cycles of amplification in the thermocycler. PCR is initiated by a 15-minute denaturation step at 94°C and is completed by a 10-minute extension

spălat de 2 ori cu etanol 75% și resuspendat în TE Buffer. În final, rezultă aproximativ 35 µl de buffer cu ADN.

Concentrația și puritatea ADN-ului sunt determinate cu ajutorul nanofotometrului. Când concentrația ADN-ului nu a fost suficient de mare, extracția ADN s-a refăcut dintr-o mostră mai mare. Dacă puritatea nu era suficientă, se reia secvența purificării ADN-ului.

2. Amplificarea ADN prin PCR

Pentru această etapă, s-a utilizat kitul „Seeplex® STD6 ACE Detection”. Într-un Eppendorf se amestecă primerii, ADN polimerază, dNTP, control intern și soluție pentru prevenirea contaminării încrucișate. Acest amestec se pune în tuburi pentru PCR, se adaugă proba ADN de la pacient împreună cu controlul pozitiv și negativ și se introduce în termocycler.

Acest amestec este supus la 40 de cicluri de amplificare în termocycler. PCR este inițiată printr-o etapă de denaturare de 15 minute la 94°C și se finalizează printr-o etapă de extindere de 10 minute la 72°C. Fiecare ciclu cuprinde o etapă de denaturare la 94°C timp de 30 de secunde, o etapă de hibridare la 63°C timp de 90 de secunde și o etapă de elongație a lanțului la 72°C timp de 90 de secunde.

3. Electroforeza în gel de agaroză

Amestecul este supus la electroforeză în gel de agaroză cu bromură de etidium 2% timp de 30–45 de minute.

În final, produșii PCR sunt examinați cu ajutorul unui transiluminator UV (figura 2).

Caz clinic

Pacient în vârstă de 33 de ani, asimptomatic, este trimis pentru efectuarea PCR pentru cele 6 ITS de către medicul urolog. Pacientul este căsătorit de 10 ani, neagă relațiile extraconjugale și prezintă infertilitate de aproximativ 2 ani. Soția este, de asemenea, asimptomatică. A efectuat urocultură și spermocultură care sunt negative.

În urma efectuării PCR pentru CT, NG, MG, MH, UU și TV, pacientul este depistat cu 3 ITS concomitente, respective CT, NG și UU și este îndrumat medicului urolog, împreună cu soția, pentru tratament.

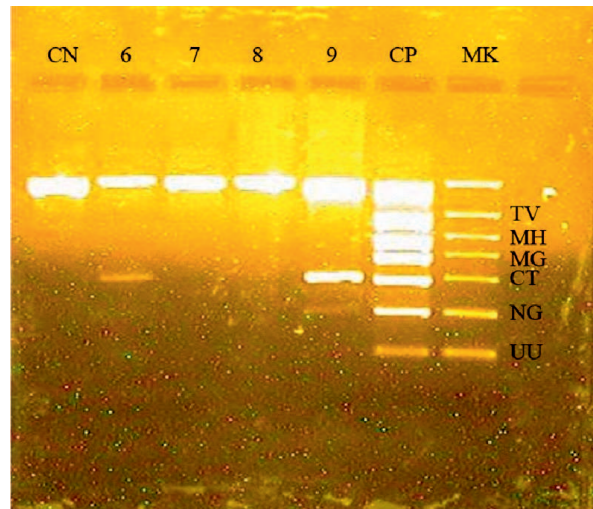


Fig. 2 – Rezultat PCR – CN- control negativ, CP – Control pozitiv, MK – marker pentru greutate moleculară. 6 – proba pozitivă pentru CT, 7,8 – probe negative, 9 - proba pozitivă pentru CT și NG.

Fig. 2. PCR – positive result – CN-negative control, CP – positive control, MK – molecular weight marker, 6 – positive sample for CT, 7,8 – negative samples, 9 – positive sample for CT and NG

step at 72°C. Each cycle includes a denaturation step at 94°C for 30 seconds, a hybridization step at 63°C for 90 seconds and a chain elongation step at 72°C for 90 seconds.

3. Agarose gel electrophoresis

The mixture is subjected to electrophoresis in agarose gel with 2% ethidium bromide for 30-45 minutes.

Finally, the PCR products are examined by using a UV transilluminator.

Case report

Patient aged 33 years, asymptomatic, is sent to perform PCR for the 6 STIs by the urologist. The patient has been married for 10 years, denies extramarital affairs and has shown to be infertile for about 2 years. Wife is also asymptomatic. A urine culture and a semen culture were performed and they were both negative.

After carrying out PCR testing for CT, NG, MG, MH, UU and TV, the patient is found with three concurrent STIs, namely CT, NG and UU, and is sent to the urologist together with his wife for treatment.

Discuții

Chiar dacă sunt disponibile multe alte metode de depistare a ITS, de exemplu cultura bacteriană, testele imunologice și serologice, testele moleculare care identifică ADN-ul bacterian au cele sensibilitate și specificitate crescute (8, 12, 13, 14).

Coinfecția dintre CT și NG este frecventă, 10-30% dintre pacienții infectați cu NG sunt coinfectați cu CT (20, 21). În Statele Unite ale Americii, tratamentul empiric pentru CT se recomandă în cazul pacienților cu gonoree, dacă nu s-a efectuat testare și pentru CT (20). Unul dintre principalele avantaje ale PCR ca metodă de depistare a ITS constă în faptul că ajută clinicienii în a lua decizia de a institui sau nu tratament asociat pentru CT când pacientul e diagnosticat cu gonoree.

Pe lângă binecunoscuta asociere dintre CT și NG, se pot depista și alte asocieri de ITS, ca și în cazul prezentat. Instituirea tratamentului pentru CT și NG nu era suficient în cazul de față, neducând la soluționarea infertilității, deoarece aceasta putea fi întreținută de UU, știut fiind faptul că UU este mai frecventă în cazul cuplurilor infertile (13). Un alt avantaj al PCR este că metoda de depistare a ITS constă în faptul că pot fi depistate simultan, din același specimen, mai multe ITS, într-un timp scurt de lucru.

Printre avantajele metodei PCR se numără și faptul că aceasta se poate realiza din urină, care este un specimen ușor de colectat, printr-o metodă noninvasivă.

Concluzii

Majoritatea ITS-urilor sunt asimptomatice, fapt care duce la diagnosticul întârziat. Avantajul PCR, în contextul acestui pacient, constă în faptul că printr-o analiză simplă, rapidă și neinvazivă s-a depistat o asociere de 3 cauze pentru infertilitate. PCR s-a dovedit superioară uroculturii și spermoculturii în depistarea ITS, în cazul prezentului pacient.

În concluzie, PCR ca metodă de diagnostic a ITS-urilor are toate avantajele necesare unui program de screening: rapiditate, noninvazivitate și detectare simultană a 6 agenți patogeni: CT, NG, MG, MH, UU și TV.

Discussion

Although many other methods to detect STIs are available, e.g. bacterial culture, immunoassays and serological tests, the molecular tests identifying bacterial DNA have increased sensitivity and specificity.

Co-infection between CT and NG is common, 10-30% of patients infected with NG are co-infected with CT as well. In the United States, the empiric treatment for CT is recommended in patients with gonorrhea, if CT testing was not also performed (20). One of the main advantages of PCR as a method for detection of STIs is that it helps clinicians in deciding whether or not to institute CT associated therapy to the patient diagnosed with gonorrhea.

Besides the well-known association between CT and NG, other STI associations can be detected as well, as in the case presented. Instituting the CT and NG treatment was not enough in this case, not leading to the solution of infertility because it could be maintained by UU, knowing that UU is more common in infertile couples. Another advantage of PCR as a STI screening method is that several STIs can be simultaneously detected, from the same specimen, within a short working time.

One of the advantages of PCR is the fact that this can be performed using urine, which is an easily collectible specimen, by a non-invasive method.

Conclusions

Most STIs are asymptomatic, leading to delayed diagnosis. The advantage of PCR, in the context of this patient, is that through a simple, fast and non-invasive test, an association of three infertility causes has been detected. PCR was superior to urine culture and semen culture in detecting STIs, for this patient.

In conclusion, PCR as a diagnosis method for STIs has all the advantages required for a screening program: speed, non-invasiveness and simultaneous detection of six pathogens: CT, NG, MG, MH, UU and TV.

Bibliografie/Bibliography

1. Reported STDs in the United States- National Data for Chlamydia, Gonorrhoea, and Syphilis - <http://www.cdc.gov/nchhstp/newsroom/docs/std-trends-508.pdf>.
2. Annual epidemiological report reporting on 2010 surveillance data and 2011 epidemic intelligence data – <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/Annual-Epidemiological-Report-2012.pdf#page=51>.
3. Choe HS, Lee DS, Lee SJ, Hong SH, Park DC, Lee MK et al. Performance of AnyplexTMI multiplex real-time PCR for the diagnosis of seven sexually transmitted infections: comparison with currently available methods. *Int J Infect Dis* 2013; 17: 1135-40.
4. Noren L, Von Krogh G, Bondesson L, Nohlgard C, Grillner L. Potential public health benefits from testing with Chlamydia trachomatis PCR technique on first void urine in men. *ActaDermVenerol* 1998; 78: 63-6.
5. Rose SB, Bromhead C, Lawton BA, Zhang J, Stanley J, Baker MG. Access to chlamydia testing needed for high-risk groups: patterns of testing and detection in an urban area of New Zealand. *AustNz J Publ Heal* 2012; 36: 343-50.
6. Korte JE, Baseman JB, Cagle MP, Herrera C, Piper JM, Holden AEC et al. Cervicitis and genito-urinary symptoms in women culture positive for Mycoplasma genitalium. *Am J Reprod Immunol* 2006; 55: 265-75.
7. Abusarah EA, Awwad ZM, Charvalos E, Shehabi AA. Molecular detection of potential sexually transmitted pathogens in semen and urine specimens of infertile males. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013; 77: 283-6.
8. Krolov K, Frolovaj, Tudoran O, Suhorutsenko J, Lehto T, Sibul H et al. Sensitive and rapid detection of Chlamydia trachomatis by recombinase polymerase amplification directly from urine samples. *J Mol Diagn* 2014;16:127-35.
9. Madkan VK, Giancola AA, Sra KK, Trying SK. Sex differences in the transmission, prevention, and disease manifestations of sexually transmitted diseases. *Arch Dermatol* 2006;142:365-70.
10. Ostergaard L. Diagnosis of urogenital Chlamydia trachomatis infection by use of DNA amplification. *APMIS* 1999;107:5-36.
11. Shipitsyna E, Zolotoverkhaya E, Chen CY, Grigoryv A, Savicheva A, Balard R et al. Evaluation of polymerase chain reaction assay for the diagnosis of Trichomonas vaginalis infection in Russia. *JEADV* 2013;27:217-23.
12. Eley A. How to detect Chlamydia trachomatis in males?. *J Androl* 2011;32:15-22.
13. Gdoura R, Kchaou W, Ammar-KeskesL, Chakroun N, Sellemi A, Znazen A et al: Assessment of Chlamydia trachomatis, Ureaplasma urealyticum, Ureaplasma parvum, Mycoplasma hominis, Mycoplasma genitalium in semen and first void urine specimens of asymptomatic male partners of infertile couples. *J Androl* 2008;29:198-206.
14. Domeika M, Zhuravskaya L, Savicheva A, Frigo N, Sokolovskiy E, Hallen A et al. Guidelines for the laboratory diagnosis of trichomoniasis in East European countries. *JEADV* 2010;24:1125-34.
15. Aguilera-Arreola MG, Gonzalez-Cardel AM, Tenorio AM, Curiel-Quesada E, Castro-Escarpulli G. Highly specific and efficient primers for in-house multiplex PCR detection of Chlamydia trachomatis, Neisseria gonorrhoeae, Mycoplasma hominis and Ureaplasma urealyticum. *BMC Res Notes* 2014;7:433.
16. Kumamoto Y, Matsumoto T, Fujisawa M, Arakawa S. Detection of Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae in urogenital and oral specimens using the Cobas 4800, Aptima Combo 2 TMA and Probetec ET SDA assays. *Eufmi* 2012;2:121-7.
17. O'Byrne P. Self-directed sexually transmitted infection testing: providing noninvasive sexual health services. *ApplNurs Res* 2011;24:17-21.
18. Fang J, Husman C, DeSilva L, Chang R, Peralta L. Evaluation of self-collected vaginal swab, first void urine, and endocervical swab specimens for the detection of Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae in adolescent females. *J PesiaterGynecol* 2008;21:355-60.
19. Tebb KP, Paukku MH, Pai-Dhungat MR, Gyamfi AA, Shafer MAB. Home STI Testing: The adolescent female's opinion. *J Adolesc Health* 2004;35:462-7.
20. Rosen T. Gonorrhoea, Mycoplasma, and vaginosis. In: Goldsmith LA, Katz SI, Gilchrist BA, Paller AS, Leffell DJ, Wolff K (eds) Fitzpatrick's dermatology in general medicine. 8th edition. Mc Graw Hill Medical ;2012:2514-9.
21. Sary A, Sary G. Sexually transmitted infection. In: Callen JP, Cerroni L, Heymann WR, Hruza G, Mancini AJ, Patterson JW et al (eds) Dermatology. 3rd edition. Elsevier;2012:1379-83.

Conflict de interese
NEDECLARATE

Conflict of interest
NONE DECLARED

Adresa de corespondență: Prof. Dr. Dumitru Alexandru Tataru
Clinica Dermatovenerologie Cluj-Napoca, Str Clinicilor 3-5
Email: dr.tataru@yahoo.com

Correspondance address: Prof. Dr. Dumitru Alexandru Tataru
Dermatovenerology Clinic Cluj Napoca, 3-5 Clinics
Email: dr.tataru@yahoo.com