

Učinkovitost azitromicina, doksiciklina i levofloksacina in vitro na urogenitalne sojeve *Chlamydia trachomatis*

Meštrović, Tomislav

Doctoral thesis / Disertacija

2014

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:250316>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-14**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)





Središnja medicinska knjižnica

Meštrović, Tomislav (2014) *Učinkovitost azitromicina, doksiciklina i levofloksacina in vitro na urogenitalne sojeve Chlamydia trachomatis [In vitro efficacy of azithromycin, doxycycline and levofloxacin against urogenital Chlamydia trachomatis strains].* Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.

<http://medlib.mef.hr/2066>

University of Zagreb Medical School Repository

<http://medlib.mef.hr/>

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Tomislav Meštrović

**Učinkovitost azitromicina, doksiciklina i
levofloksacina *in vitro* na urogenitalne
sojeve *Chlamydia trachomatis***

DISERTACIJA



Zagreb, 2014.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Tomislav Meštrović

**Učinkovitost azitromicina, doksiciklina i
levofloksacina *in vitro* na urogenitalne
sojeve *Chlamydia trachomatis***

DISERTACIJA

Zagreb, 2014.

Rad je izrađen na Odsjeku za klamidije Službe za mikrobiologiju Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo te na Klinici za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“, u sklopu projekta „Istraživanje etiologije, epidemiologije, dijagnostike i liječenja bolesnika sa sindromom prostatitisa“ voditeljice prof. dr. sc. Višnje Škerk (projekt broj 04/30 uz financijsku potporu Hrvatske zaklade za znanost).

Voditelj rada: Doc. dr. sc. Sunčanica Ljubin-Sternak, dr. med.

ZAHVALE

Zahvaljujem se prvenstveno svojoj mentorici doc. dr. sc. Sunčanici Ljubin-Sternak na ukazanom povjerenju, neprocjenjivim savjetima i nesebičnoj pomoći tijekom izrade ovog rada.

Iskrene zahvale djelatnicima Službe za mikrobiologiju Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo na pomoći u izradi ovog rada: dr. sc. Mariju Svibenu, dr. sc. Tatjani Vilibić Čavlek i prof. dr. sc. Gordani Mlinarić-Galinović. Posebno se zahvaljujem Vesni Šeperić, lab. tehn., Mireli Josipović, lab. tehn., Nataši Bauk, dipl. ing. te Višnji Batur, dipl. ing. na tehničkoj pomoći.

Zahvaljujem se i prof. dr. sc. Juliusu Schachteru, voditelju Laboratorija za istraživanje klamidija Sveučilišta u Kaliforniji u San Franciscu (UCSF) što mi je ustupio referentne sojeve.

Od srca se zahvaljujem mr. sc. Zori Profozić i prof. dr. sc. Velimiru Profoziću što su mi omogućili da postanem mikrobiolog.

Veliko hvala mojim prijateljima koji su uvijek uz mene kada je to najpotrebnije.

I na kraju, ovaj rad posvećujem svojim roditeljima, Borisu i Marijani, za njihovu bezuvjetnu ljubav i samoodricanje, kao i za bezrezervnu podršku tijekom mog čitavog obrazovnog puta – od prvoškolskih dana do doktorskog rada.

SADRŽAJ

| | |
|--|----|
| 1. UVOD | 1 |
| 1.1. <i>Chlamydia trachomatis</i> | 2 |
| 1.1.1. Povijest i klasifikacija | 2 |
| 1.1.2. Morfologija i životni ciklus..... | 3 |
| 1.1.3. Podjela prema biovaru i serovaru | 6 |
| 1.2. Epidemiologija i kliničke manifestacije klamidijske infekcije | 7 |
| 1.2.1. Trahom | 7 |
| 1.2.2. Infekcije urogenitalnog sustava..... | 8 |
| 1.2.3. Lymphogranuloma venereum | 11 |
| 1.3. Dijagnostika klamidijskih infekcija | 13 |
| 1.3.1. Kultivacija | 13 |
| 1.3.2. Detekcija antigena | 15 |
| 1.3.2.1. Izravna imunofluorescenca | 15 |
| 1.3.2.2. Imunoenzimni test | 15 |
| 1.3.2.3. Brzi testovi | 16 |
| 1.3.3. Molekularne metode..... | 17 |
| 1.3.3.1. Hibridizacija nukleinskih kiselina | 17 |
| 1.3.3.2. Amplifikacija nukleinskih kiselina..... | 17 |
| 1.3.4. Serološke metode | 18 |
| 1.4. Liječenje klamidijskih infekcija | 20 |
| 1.5. Rezistencija <i>C. trachomatis</i> na antimikrobne lijekove..... | 22 |
| 1.5.1. Literaturni opisi rezistentnih urogenitalnih izolata | 22 |
| 1.5.2. Molekularni mehanizmi rezistencije | 25 |

| | |
|---|----|
| 1.5.2.1. Rezistencija na makrolide | 25 |
| 1.5.2.2. Rezistencija na tetracikline..... | 26 |
| 1.5.2.3. Rezistencija na fluorokinolone | 28 |
| 1.5.2.4. Rezistencija na rifamicine | 29 |
| 1.5.2.5. Rezistencija na druge antimikrobne lijekove | 30 |
| 1.6. Metode testiranja antimikrobne osjetljivosti <i>C. trachomatis</i> | 32 |
| 1.6.1. Kultivacija uz detekciju izravnom imunofluorescencom..... | 32 |
| 1.6.2. Kultivacija uz detekciju RT-PCR-om | 35 |
| 1.6.3. Kultivacija uz detekciju protočnom citometrijom..... | 36 |
| 2. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA | 40 |
| 2.1. Obrazloženje teme..... | 41 |
| 2.2. Hipoteza | 42 |
| 2.3. Ciljevi istraživanja..... | 43 |
| 2.3.1. Opći cilj | 43 |
| 2.3.2. Specifični ciljevi..... | 43 |
| 3. MATERIJALI I METODE | 44 |
| 3.1. Klinički uzorci..... | 45 |
| 3.2. Izolacija u staničnoj kulturi | 48 |
| 3.3. Priprema za testiranje antimikrobne osjetljivosti | 53 |
| 3.4. Izrada antibiograma i određivanje koncentracijskih vrijednosti | 59 |
| 3.5. Statistička analiza i prikaz podataka | 63 |
| 4. REZULTATI..... | 65 |
| 4.1. Deskriptivna analiza rezultata | 66 |
| 4.2. Usporedba učinkovitosti testiranih antimikrobnih lijekova | 75 |
| 4.3. Usporedba dobivenih koncentracija ovisno o vrsti kliničkog uzroka | 84 |

| | |
|---|-----|
| 5. DISKUSIJA..... | 96 |
| 6. ZAKLJUČCI..... | 116 |
| 7. SAŽETAK..... | 119 |
| 7.1. Sažetak na hrvatskom jeziku..... | 120 |
| 7.2. Sažetak na engleskom jeziku (Summary)..... | 122 |
| 8. LITERATURA..... | 124 |
| 9. PRILOZI..... | 152 |
| 9.1. Popis kratica korištenih u tekstu..... | 153 |
| 9.2. Popis slika..... | 157 |
| 9.3. Popis tablica i izračuna..... | 160 |
| 10. ŽIVOTOPIS..... | 163 |

1. UVOD

1.1. *Chlamydia trachomatis*

1.1.1. Povijest i klasifikacija

Obligatna unutarstanična bakterija *Chlamydia trachomatis* (*C. trachomatis*) uzročni je čimbenik brojnih bolesti ljudi poput trahoma, infekcija spolno-mokraćnog sustava, ali i neonatalnih infekcija. Taj gram-negativni mikroorganizam otkriven je 1907. godine kad su Halberstaedter i von Prowazek pod mikroskopom promatrali strugotine rožnice eksperimentalno inficiranog orangutana (1). Inkluzijska tjelešca (Slika 1) prvi su put opisana 1942. godine, a Tangu je sa suradnicima 1957. godine uspješno kultivirao bakteriju u embrioniranim kokošjim jajima (2,3). *C. trachomatis* je nazvana prema grčkoj riječi $\chi\lambda\alpha\mu\upsilon\varsigma$, $\acute{\upsilon}\delta\omicron\varsigma$, η koja znači kratki ogrtač, što simbolizira način na koji je inkluzija ispunjena bakterijama „omotana“ oko jezgre zaražene stanice.

Trenutno je važeća sljedeća klasifikacija ovog uzročnika (4)

Domena: *Eubacteria* (*Bacteria*)

Koljeno: *Chlamydiae*

Razred: *Chlamydiae*

Red: *Chlamydiales*

Porodica: *Chlamydiaceae*

Rod: *Chlamydia*

Vrsta: *Chlamydia trachomatis*

Uz *C. trachomatis*, za čovjeka su iz iste porodice značajne neke vrste roda *Chlamydophila* koje uglavnom inficiraju dišni sustav (5,6). Osim u ljudi, predstavnici ove porodice široko su

rasprostranjeni i u drugih vrsta; primjerice u svinja, miševa, mačaka, majmuna i ptica (7). Igraju ulogu i u okolišu kao endosimbionti slobodnoživućih ameba (8).

1.1.2. Morfologija i životni ciklus

Zbog svoje veličine *C. trachomatis* i druge klamidije nekad su bile smatrane virusima, no značajke poput unutarnje i vanjske membrane nalik gram-negativnim bakterijama, istovremenog postojanja obje nukleinske kiseline (DNA i RNA), prisutnosti ribosoma te osjetljivosti na antibakterijske antimikrobne lijekove definitivno ih svrstavaju u bakterijsku domenu života (9). Cirkularni genom *C. trachomatis* sadrži 1 042 519 parova baza, što po veličini odgovara četvrtini genoma bakterije *Escherichia coli* (*E. coli*) (10). Sadrži kriptički plazmid veličine oko 7500 parova baza koji je vrlo konzerviran, ima ulogu u patogenezi te se može iskoristiti u identifikacijske svrhe (11). *C. trachomatis* se javlja u dva oblika: kao elementarno tjelešce (ET) sa sposobnošću preživljavanja u okolišu, te kao retikularno tjelešce (RT) koje pronalazimo unutar stanice. Ne može sintetizirati ATP već preko ATP/ADP translokaze koristi ATP stvoren u stanici domaćina, što je razlog nemogućnosti rasta na umjetnim hranilištima (12). Zbog tog svojstva klamidiju nazivamo energetske parazite.

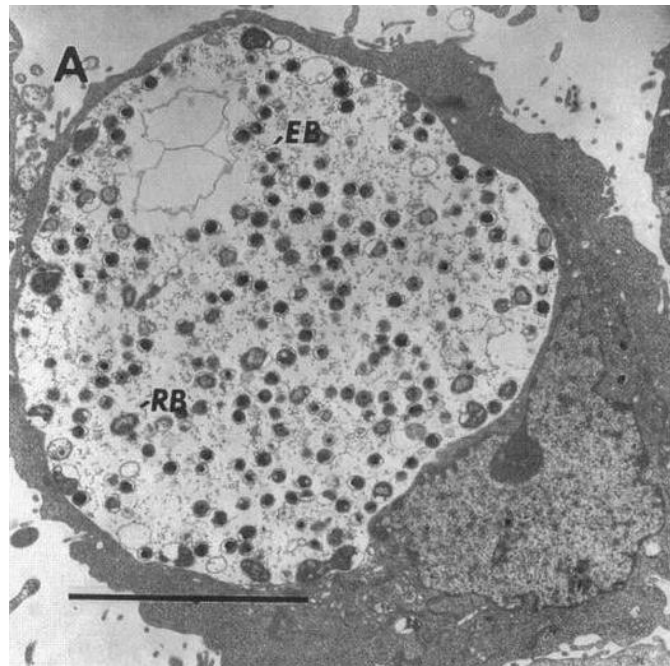
Stanični zid sadrži termostabilni lipopolisaharid (LPS) karakterističan za rod (isti za sve članove porodice) s reduciranom endotoksičnom aktivnošću zbog dominacije dugolančanih masnih kiselina na lipidu A (13). Glavni protein vanjske membrane (engl. MOMP, *major outer membrane protein*) težine 40 kDa kodiran je genom *ompA* te predstavlja tipno-specifični antigen koji određuje vrstu i serovar (14). Također je odgovoran za poticanje protektivnog imuniteta, a ima i funkciju porina za prijenos složenih ugljikohidrata i

aminokiselina. Četiri varijabilne domene (VD1 – VD4) odgovorne su za postojanje 19 serovara s različitim kliničkim manifestacijama infekcije. Cisteinom bogati proteini vanjske membrane OMP2 (OmcB) i OMP3 (OmcA) (engl. *outer membrane protein*) utječu na osmotsku stabilnost ET zbog mreže disulfidnih veza kojima su povezani s MOMP-om i drugim proteinima staničnog zida (14).

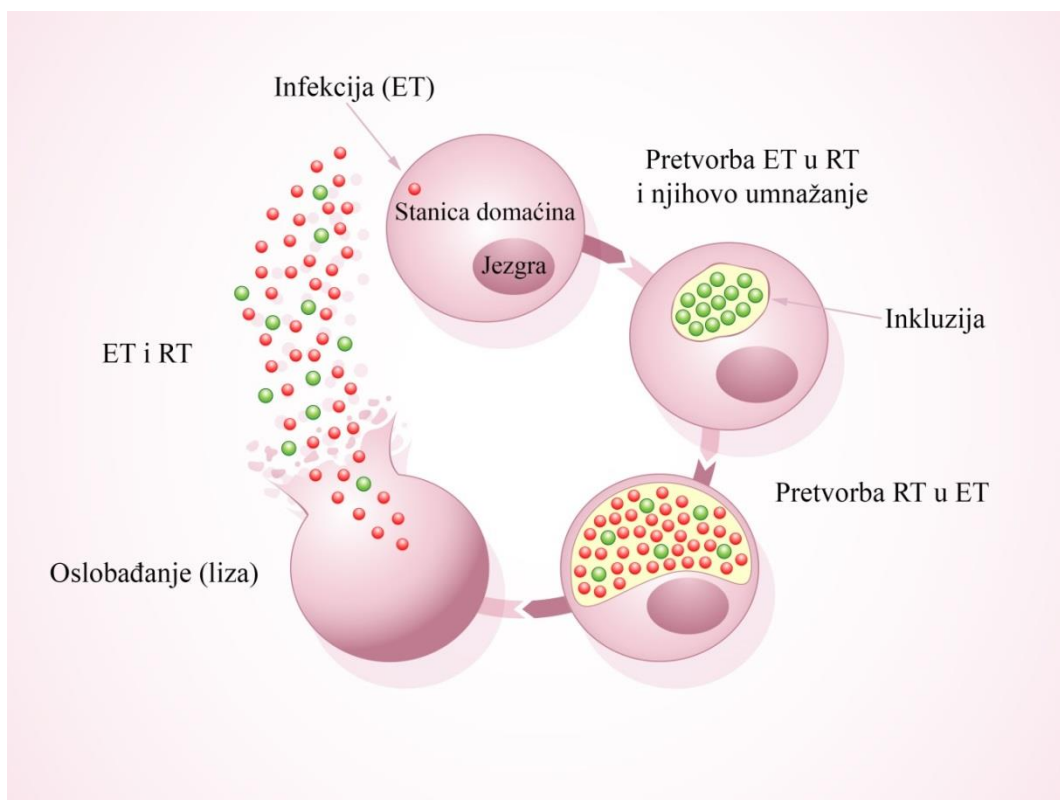
Jedinstveni životni ciklus klamidije razlikuje se od drugih bakterija, a samim time i klinički tijek infekcije, te mogućnosti dijagnostike i liječenja. Već spomenuto ET predstavlja zarazni oblik za eukariotsku stanicu, u koju ulazi pomoću brojnih adhezina i receptora (9). Promjer mu je otprilike 0,3 μm , posjeduje elektronsko jasan gusti nukleoid i rigidne strukture, a otporno je na razgradnju tripsinom (12). U stanicu ulazi specifičnom endocitozom te se nalazi unutar vakuole dobivene od stanične opne domaćina. Kako je spajanje nastalog endosoma s lizosomom inhibirano, mreža disulfidnih veza se kida i ET se reorganizira u metabolički aktivno retikularno tjelešce. RT raste do veličine od 1 μm i uzastopno se dijeli binarnom fisijom unutar rastuće vakuole koje se razvija u veliku intracitoplazmatsku inkluziju (14). Na kraju razvojnog ciklusa RT se reorganiziraju natrag u ET, da bi se nakon 48-72 sata stotine ET otpustile iz stanice domaćina i ponovno započele ciklus (14) (Slika 2).

Raste broj dokaza koji ukazuju da klamidije izložene različitim nepovoljnim utjecajima (primjerice, nedostatku hranjivih tvari poput triptofana te djelovanju gama-interferona i antibiotika) mogu ući u stadij perzistencije (15,16). Perzistentne klamidijske forme nalaze se u unutarstaničnim inkluzijama, a morfološki su nalik aberantnim i povećanim RT. Nazivaju se još i perzistentnim tjelešcima (PT). Pretpostavlja se kako perzistencija predstavlja alternativni životni ciklus koji klamidije koriste kako bi izbjegle imunski odgovor domaćina (16), što bi u konačnici moglo biti odgovorno za kronični oblik infekcije *C. trachomatis*.

Slika 1. Tipične inkluzije *C. trachomatis* (EB - elementarno tjelešće; RB - retikularno tjelešće) prikazane elektronskim mikroskopom 48 sati nakon infekcije (Izvor: Beatty WL, Morrison RP, Byrne GI. Persistent chlamydiae: from cell culture to a paradigm for chlamydial pathogenesis. Microbiol Rev 1994; 58: 686-99.)



Slika 2. Životni ciklus *C. trachomatis* (Izvor: Meštrović Tomislav, izvorni rad)



1.1.3. Podjela prema biovaru i serovaru

C. trachomatis se na temelju bioloških svojstava (invazivnost; domaćin) može podijeliti u tri biovara: biovar trahoma, biovar limfogranuloma venereum (LGV) i mišji biovar (12). Za ljude su značajni biovar trahoma i biovar limfogranuloma venereum, koji se na temelju antigene razlike MOMP-a dalje dijele u 19 serovara. Serovari A, B, Ba i C uglavnom inficiraju konjunktivu, serovari D, Da, E, F, G, Ga, H, I, Ia, J i K su specifični za urogenitalni trakt, dok se serovari L1, L2, L2a, L2b i L3 mogu naći i u limfnim čvorovima (17) (Tablica 1).

Tablica 1. Podjela serovara *C. trachomatis* sukladno kliničkoj prezentaciji (Izvor: Brunham RC, Rey-Ladino J. Immunology of Chlamydia infection: implications for a *Chlamydia trachomatis* vaccine. Nat Rev Immunol 2005; 5: 149-61.)

| Serovar | Bolest | Način prijenosa | Patologija |
|------------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|---|
| A, B, Ba, C | Trahom | Rukama i ručnicima na oko, muhe | Konjunktivitis, ožiljkivanje spojnice i rožnice |
| D, Da, E, F, G, H, I, Ia, J, Ja, K | Urogenitalne i okularne infekcije | Spolnim putem i perinatalno | Cervicitis, uretritis, endometritis, zdjelična upalna bolest, neplodnost, ektopična trudnoća, neonatalni konjunktivitis, novorođenačka pneumonija |
| L1, L2, L2a, L2b, L3 | Lymphogranuloma venereum | Spolnim putem | Invazija submukoze i limfnih čvorova uz fibrozu i nekrotizirajuće granulome |

1.2. Epidemiologija i kliničke manifestacije klamidijske infekcije

1.2.1. Trahom

Trahom je kronična bolest oka uzrokovana serovarima A, B, Ba i C koja može dovesti do sljepoće. Premda i genitalni serovari *C. trachomatis* (D - K) mogu inficirati spojnicu te izazvati stanje poznato kao ophtalmia neonatorum u dojenčadi, ili inkluzijski konjunktivitis u odraslih osoba, radi se o izoliranim epizodama koje ne mogu rezultirati gubitkom vida (18). Kod trahoma razmnožavanje uzročnika u cilindričnim stanicama spojnice gornjeg kapka u početku se manifestira kao keratofolikularni konjunktivitis, dok vremenom infekcija postaje kronična te dovodi do stvaranja ožiljnog tkiva, trihijaze, entropija i posljedičnog gubitka vida (19). Bolest može imati dug period latencije, a superinfekcije oka drugim uzročnicima te imunosni odgovor organizma doprinose napredovanju bolesti (20).

Trahom je jedan od glavnih uzroka sljepoće diljem svijeta, a smatra se da je endemski prisutan u više od 56 zemalja (18). Procjenjuje se da je danas na svijetu otprilike 1,3 milijuna osoba slijepo zbog posljedica ove infekcije, a još 1,8 milijuna ljudi ima teško oštećenje vida. Predstavlja bolest siromaštva karakterističnu za prenaseljena područja s lošim higijenskim uvjetima. Infekcija se prenosi u oko direktno kapljičnim putem, rukama, kontaminiranom odjećom, a čest prijenosnik bolesti su muhe (21). Zemlje s najvećom prevalencijom bolesti nalaze se u Africi, na Bliskom Istoku, Indijskom potkontinentu i jugoistočnoj Aziji (14). Premda je prije stotinjak godina trahom bio raširen i u Europi, nestao je paralelno s poboljšanjem uvjeta života, pa shodno tome nije prisutan ni u Hrvatskoj.

1.2.2. Infekcije urogenitalnog sustava

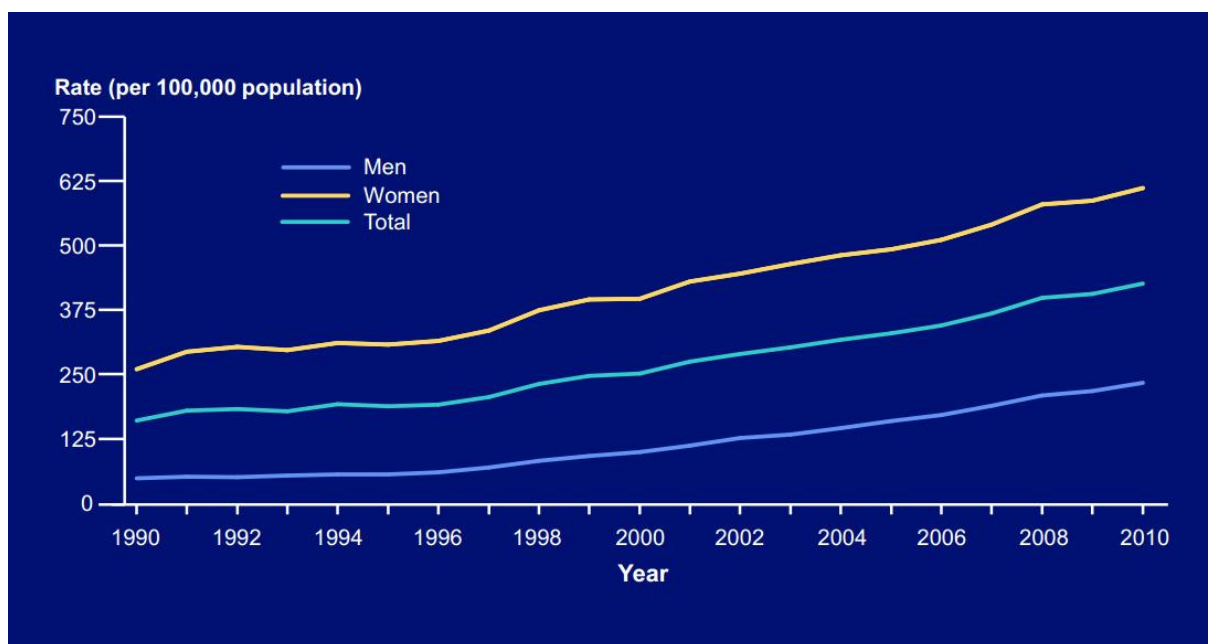
Serovari *C. trachomatis* od D do K (uključujući serovare Da, Ia i genovarijantu Ja) povezani su s vrlo raširenim infekcijama urogenitalnog sustava (14). Većina takvih klamidijskih infekcija je asimptomatska; naime, smatra se da čak 50% zaraženih muškaraca i 80% zaraženih žena nema nikakvih tegoba (22). Simptomatske infekcije uglavnom se ispoljavaju kao cervicitis u žena i uretritis u muškaraca i žena (u oba spola mogu se javiti i rjeđe manifestacije poput konjunktivitisa i proktitisa). Bez obzira radilo se o simptomatskom ili asimptomatskom obliku, neliječena klamidijska infekcija se ascendentnim putem može proširiti u gornji genitalni trakt (23). U muškaraca se to manifestira kao epididimitis, dok u žena može dovesti do zdjelične upalne bolesti (engl. PID, *pelvic inflammatory disease*) – spektra kliničkih poremećaja povezanih s upalom maternice, jajovoda, jajnika i priležecog peritoneuma (12,24). Klinički dijagnosticiran PID, ali i subklinička upala gornjeg genitalnog trakta, može naposljetku rezultirati neplodnošću ili razvojem ektopične trudnoće zbog fibroze i ožiljkastih promjena jajovoda. Jedna od sekvela klamidijske infekcije kod muškarca i žena može biti i reaktivni artritis (25).

Prema podacima CDC-a, u SAD-u je 2010. godine prijavljeno 1 307 893 slučajeva infekcije *C. trachomatis*, uz ukupnu stopu infekcije od 426,00 na 100 000 stanovnika (26). Značajan je trend porasta stope koji se u periodu od 2000. do 2010. godine u skupini žena gotovo udvostručio (Slika 3). Rasprostranjenost infekcije u Europi varira ovisno o populaciji, okruženju, zemlji, nadzoru i postojanju sustavne prevencije (27). Sustavni pregled klamidijske infekcije među asimptomatskim Europljankama pokazao je raspon prevalencije od 1,7% (u Ujedinjenom Kraljevstvu sredinom devedesetih godina) do 17% (u Francuskoj krajem osamdesetih godina), koja je iznosila više od 5% u većini obuhvaćenih zemalja (28,29).

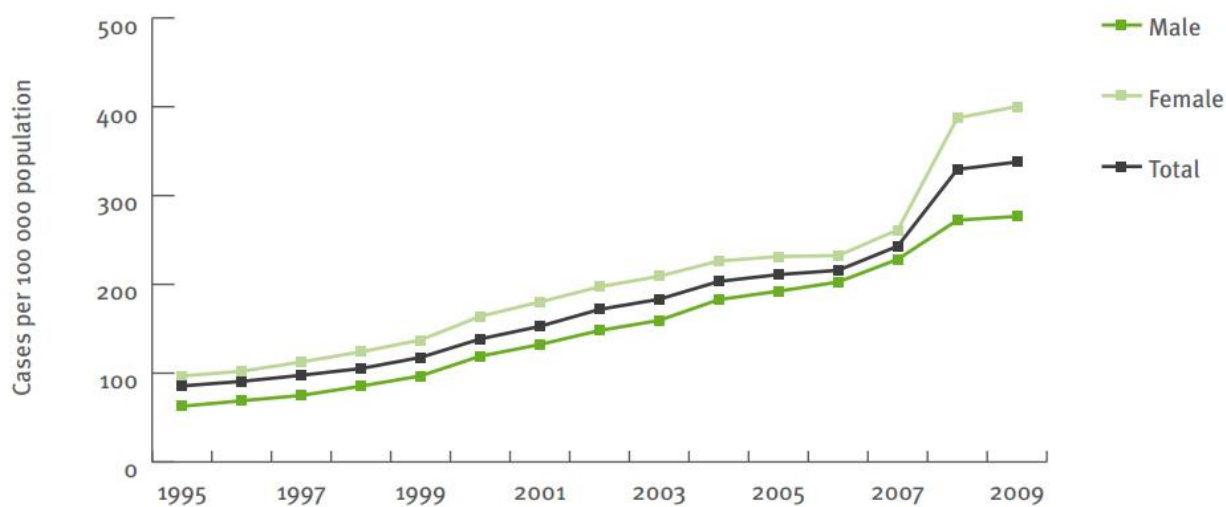
Nedavno je ECDC objavio podatke iz sedam zemalja, došavši do brojke od 1,4-3,0% inficiranih osoba u dobi od 18 do 44 godine (30). Također su izvijestili kako se prevalencija, ali i incidencija u Europi od 1990. godine pa do danas u globalu povećava, premda podaci iz nekih zemalja nisu bili dostupni (31) (Slika 4).

Stopa incidencije urogenitalne klamidijske infekcije u našoj zemlji varira od 7,02 na 100 000 stanovnika 1999. godine, do 21,43 na 100 000 stanovnika 2001. godine (32). Prema podacima Referentnog centra za epidemiologiju Ministarstva zdravstva RH, 2012. je godine ukupno prijavljeno 305 novootkrivenih infekcija (33), premda se smatra da ta brojka ne ocrta pravo stanje zbog velikog broja neprijavljenih slučajeva. Kod muškaraca u Hrvatskoj ova obligatna intracelularna bakterija se kao uzročnik uretritisa pronalazi u 18,5% slučajeva (s najvećom raširenošću u dobnoj skupini između 18 i 25 godina) (34), a kao uzročnik kronične upale prostate u 10% slučajeva (35). Prevalencija infekcije u žena s mukopurulentnim cervicitisom jednaka je onoj u muškaraca, s najvećim brojem zaraženih u adolescentnoj dobnoj grupi (3,6 - 16,4%) (36). Prema studiji na populaciji iz sjeveroistočne Hrvatske (37), serotipovi *C. trachomatis* koji dominiraju u našem kraju pripadaju tipovima E (44%), F (33%) i K (11,5%), što nalikuje distribuciji u Europi (38-40) i SAD-u (41).

Slika 3. Učestalost klamidijske infekcije prema spolu u SAD-u, u periodu od 1990. do 2010. godine (Izvor: <http://www.cdc.gov>)



Slika 4. Trend u broju prijavljenih slučajeva klamidijske infekcije na 100 tisuća stanovnika, EU/EEA, u periodu od 1995. do 2009. godine (Izvor: <http://ecdc.europa.eu>)



1.2.3. Lymphogranuloma venereum

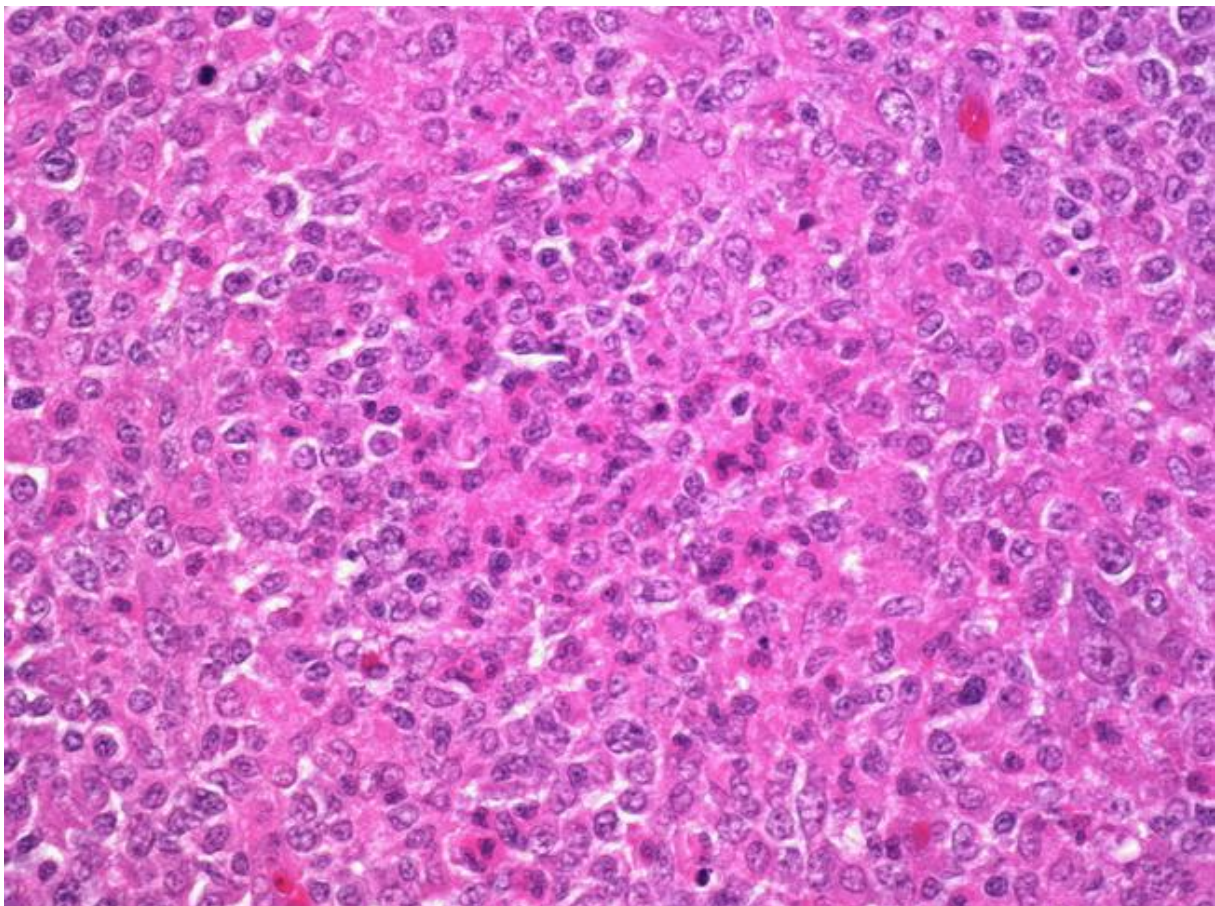
LGV je spolno-prenosiva bolest uzrokovana serovarima L1, L2, L2a, L2b i L3 iz biovara LGV (42). Za razliku od klamidijskih infekcija uzrokovanih biovarom trahoma čiji je razvoj ograničen isključivo na stanice sluznica s cilindričnim i prijelaznim epitelom, infekcija biovarom LGV ima obilježja sustavne infekcije jer uz endotelne stanice zahvaća i monocitno-makrofagni sustav, što omogućuje diseminaciju limfnim putovima (43). Na taj način dolazi do supurativne upale limfnih čvorova koja može dovesti do razvoja granuloma (Slika 5).

Klinički tijek LGV može se podijeliti u tri stadija (9). Prvi stadij se očituje malim, površnim, bezbolnim ulkusom ili vezikulom na mjestu ulaska uzročnika. Nekoliko tjedana nakon pojave takvog primarnog afekta dolazi do oticanja regionalnih limfnih čvorova koji postaju bolni (u muškaraca su najčešće zahvaćeni ingvinalni limfni čvorovi, dok u žena retroperitonealni i perirektalni limfni čvorovi) (43). Limfni čvorovi u trećem stadiju konačno zacjeljuju ožiljcima, ali infekcija može perzistirati i dovesti do brojnih kasnih sekvela. Među njima se ističu pojava granuloma, elefantijaza spolnih organa uslijed začepljenja limfnih putova te razvoj striktura i fistula rektuma (14). U skupini homoseksualnih muškaraca često se javlja proktitis (44). Treba istaknuti i mogućnost razvoja Parinaudovog okuloglandularnog konjunktivitisa uzrokovanog LGV serovarima, koji uz upalu spojnice oka dovodi i do peraurikularne, submandibularne i cervikalne limfadenopatije (45).

LGV je u industrijaliziranim zemljama vrlo rijetka bolest, a endemski se pronalazi u dijelovima Afrike, Azije, Južne Amerike i Karipskog otočja (43,46). Ipak, epidemije LGV proktitisa u homoseksualnih osoba zaraženih HIV-om opisane su u nekoliko europskih zemalja, SAD-u i Kanadi (44,47-49), a brojni podaci ukazuju da bi bolest mogla biti

endemska među homoseksualnom populacijom Ujedinjenog kraljevstva (50). Nadalje, infekcije LGV biovarom (napose serovrom L2) zabilježene su u Sjevernoj Americi, Belgiji, Danskoj, Francuskoj, Nizozemskoj, Portugalu, Španjolskoj i Švedskoj (51), a što se tiče istočne Europe, nedavno je opisana i u Češkoj (51). U Hrvatskoj još nije zabilježen slučaj infekcije nekim od serovara LGV.

Slika 5. Histološki prikaz limfadenitisa u sklopu lymphogranuloma venereum. Vidljivo je nekrotičko žarište s neutrofilima koji su u središtu okruženi epiteloidnim histiocitima (Izvor: <http://www.webpathology.com>)



1.3. Dijagnostika klamidijskih infekcija

1.3.1. Kultivacija

Povijesno su se klamidije kultivirale u žumanjčanoj vreći embrioniranih kokošjih jaja, što se još uvijek koristi u pripremi antigena za mikroimunofluorescentni test (MIF) (14). Današnje metode uzgoja *C. trachomatis* u staničnoj kulturi zahtijevaju izvanredno organiziran transport uzoraka kako bi se maksimalno očuvala vijabilnost mikroorganizama. U tu se svrhu koriste posebni transportni mediji kao što su 2-saharoza fosfat (2SP) ili saharoza fosfat-glutamat uz dodatak fetalnog telećeg seruma (5-10%), gentamicina (10 µg/ml), vankomicina (25 do 100 µg/ml) te amfotericina B (2 µg/ml) ili nistatina (25 U/ml) (14). Uzorak bi se u laboratorij trebao dostaviti u roku od 24 sata na temperaturi od 4 °C, a nakon 48 sati klinički materijal je potrebno zamrznuti na -70 °C (52).

Stanične linije koje se danas standardno koriste u kultivaciji *C. trachomatis* jesu HeLa 229, kultura mišjih fibroblasta L434 i McCoy stanice (53). Uz izuzetak „brzorastućih“ sojeva poput biovara LGV, infekciju stanica klamidijama obično je potrebno potaknuti centrifugiranjem kliničkog materijala na jedan sloj odgovarajuće stanične kulture (54). Rast mikroorganizama također se može olakšati korištenjem anti-metabolita poput cikloheksimida, emetina ili mitomicina C, a u određenim slučajevima i nabijenih anionskih polimera kao što su poli-L-lizin ili dietilaminoetil (DEAE) dekstran (53).

48-72 sata nakon inokulacije u inficiranim stanicama razvijaju se karakteristične inkluzije sastavljene od elementarnih i retikularnih tjelešaca (12) (Slika 1). Vizualizacija takvih inkluzija postiže se bojenjem, a pozitivnim nalazom smatramo prisutnost jedne ili više

tipičnih intracelularnih inkluzija. Inkluzije se mogu bojati jodom, prema Giemsi i po Wrightu, no najbolji rezultati postižu se imunološkim bojenjem pomoću monoklonskih protutijela konjugiranih s fluorescein izotiocijanatom (FITC) na LPS ili MOMP antigen (14). U identifikaciji replicirajućih klamidija u staničnoj kulturi može se rabiti i fluorescentna in-situ hibridizacija (FISH) korištenjem oligonukleotidnih proba koje se komplementarno vežu za epitope karakteristične za porodicu, rod i vrstu na 16S rRNA (55).

Postoje brojni čimbenici koji mogu utjecati na učinkovitost izolacije u staničnoj kulturi, zbog čega je neophodna trajna kontrola kvalitete kako bi se zadržala maksimalna osjetljivost i specifičnost. Rutinski je potrebno testirati pozitivne kontrole s poznatim brojem inkluzija kako bi se provjerila osjetljivost sustava, ali i negativne kontrole s neinficiranim ljudskim stanicama kako bi se isključila kontaminacija pozitivnim uzorcima ili kontrolama (14). Potrebno je provjeravati i moguću kontaminaciju bakterijama iz roda *Mycoplasma*, budući da one mogu oslabjeti rast klamidija, a samim time i smanjiti osjetljivost stanične kulture (56). Uz to bi na mikoplazmu trebalo testirati sve klamidijske uzorke pristigle u laboratorij, budući da je kontaminacija klamidijskih izolata dokazana čak i u ATCC sojevima (57).

Izolacija *C. trachomatis* u staničnoj kulturi tehnički je zahtjevna metoda koja se izvodi samo u specijaliziranim laboratorijima. U Hrvatskoj je tako dostupna isključivo u Odsjeku za klamidiju Službe za mikrobiologiju HZJZ-a. Premda su zbog veće osjetljivosti (specifičnost kulture je 100%, ali osjetljivost 80%) i brzine molekularne tehnike danas zamijenile staničnu kulturu te postale zlatni standard u dijagnostici ove infekcije, stanična kultura je i dalje metoda izbora u svrhu sudsko-medicinskog vještačenja (jedino soj izoliran na staničnoj kulturi može biti dokazni materijal), kontrole nakon provedene terapije (dokaz živog

mikroorganizma), zatim kod tesitranja izolata za koje komercijalni testovi nisu licencirani te u svrhu određivanja antimikrobne osjetljivosti (58,59).

1.3.2. Detekcija antigena

1.3.2.1. Izravna imunofluorescenca

Metoda izravne imunofluorescence (DFA) temelji se na detekciji elementarnih tjelešaca u obrisku konjunktive, uretre ili vrata maternice korištenjem FITC-konjugiranih monoklonalnih protutijela usmjerenih na antigen MOMP (14). Jednu od glavnih prednosti ove metode predstavlja mogućnost kontrole kvalitete uzimanja uzroka jer se može vidjeti prisutnost, tj. odsutnost epitelnih stanica. Također omogućava brzo postavljanje dijagnoze infekcije, budući da je potrebno 30 minuta za izvođenje testa, što je od posebne koristi za laboratorije s ograničenim brojem uzoraka. U usporedbi sa staničnom kulturom, osjetljivost DFA iznosi 75-100%, a specifičnost 94-99% (60-62). Preporuča se za uzorke konjunktive, kao i za testiranje osoba s mogućom rektalnom ili faringealnom infekcijom *C. trachomatis* (58). Nedostatak ove metode predstavlja potreba za dobro obučanim i iskusnim mikroskopičarem koji može razlikovati fluorescirajuće klamidijske čestice od nespecifične fluorescence.

1.3.2.2. Imunoenzimni test

Imunoenzimni test (EIA) za dokaz antigena *C. trachomatis* pomoću monoklonskih ili poliklonskih protutijela označenih enzimom detektira klamidijski LPS, koji je značajno

topljiviji od antigena MOMP (14). Koristeći staničnu kulturu kao referentni standard, osjetljivost kod testiranja briseva vrata maternice varira između 62 i 72% (60). Premda je u pojedinim istraživanjima specifičnost EIA dosegala 99%, postoji rizik od lažno-pozitivnih rezultata uslijed unakrsne reakcije s LPS-om drugih bakterija (*Acinetobacter calcoaceticus*, *Escherichia coli*, *Gardnerella vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae* i beta-hemolitički streptokoki grupe B) (63). Zbog toga je pozitivni nalaz EIA potrebno potvrditi, napose u populaciji s niskom učestalošću ove infekcije (58). U potvrdi se može koristiti DFA, a razvijena su i blokirajuća protutijela pomoću kojih test dosiže specifičnost od gotovo 99,5%. EIA se ne preporuča za testiranje neinvazivno uzetih uzoraka (poput urina ili vulvovaginalnih obrisaka), a mjesto pronalazi u laboratorijima s velikim brojem uzoraka bez mogućnosti molekularne dijagnostike (14).

1.3.2.3. Brzi testovi

Brzi testovi (engl. *point of care*) za dokaz antigena *C. trachomatis* zamišljeni su kao pristupačna metoda u siromašnijim sredinama bez adekvatne zdravstvene zaštite (64). Temelje se na principu imunokromatografije uz pomoć koje se može dokazati ciljni antigen bez potrebe za specijaliziranom i skupom opremom. Ono što razočarava jest njihova loša osjetljivost, a također i mogućnost unakrsne reakcije s drugim gram-negativnim bakterijama (kao antigen se također koristi LPS). U velikom neovisnom istraživanju van Dommelena i suradnika raspon osjetljivosti bio je 12-17% (65), a u nedavnom istraživanju u Surinamu osjetljivost je u usporedbi s molekularnim metodama iznosila 41,2% (66). Zbog toga se njihovo korištenje ne preporuča u svakodnevnoj laboratorijskoj praksi (58).

1.3.3. Molekularne metode

1.3.3.1. Hibridizacija nukleinskih kiselina

Testovi hibridizacije nukleinskih kiselina (engl. NAH, *nucleic acid hybridization*) uz EIA postaju najkorišteniji testovi u laboratorijima s velikim brojem uzoraka (67). Danas su komercijalno dostupna dva takva testa – PACE 2 (Gen-Probe, San Diego) i CT-ID Hybrid Capture II (Digene, Gaithersburg). Test PACE 2 radi na principu hibridizacije jednolančane DNA probe označene esterom akridinija s komplementarnom rRNA *C. trachomatis* (68). U usporedbi s testovima baziranim na amplifikaciji nukleinskih kiselina (engl. NAA, *nucleic acid amplification*), PACE 2 ima osjetljivost slabiju od 17 do 38% (69). Osjetljiviji CT-ID Hybrid Capture II koristi specifične RNA probe homologne čitavoj sekvenci kriptičkog plazmida i otprilike 39 000 parova baza klamidijskog genoma (4%) (70). Nakon hibridizacije slijedi amplifikacija signala koja povećava osjetljivost ovog testa na otprilike 90% osjetljivosti NAA testova. Obje metode smatraju se pouzdanima za testiranje obrisaka endocerviksa i uretre, ali nisu preporučene za testiranje tzv. neinvazivnih uzoraka kao što su urin i vulvovaginalni obrisak (14).

1.3.3.2 Amplifikacija nukleinskih kiselina

S obzirom na visoku osjetljivost i specifičnost, NAA se danas smatra metodom izbora u dijagnostici genitalnih *C. trachomatis* infekcija (67). S obzirom da se mogu koristiti neinvazivni uzorci, ovi testovi se mogu koristiti u programima probira asimptomatskih osoba jer se značajno povećava suradljivost pacijenata. Na tržištu je registrirano nekoliko različitih

NAA testova. PCR Amplicor (Roche Diagnostics, Basel, Švicarska), RealTime CT/NG (Abbott Laboratories, SAD) i amplifikacija uz dislokaciju lanca ProbeTec (BD Diagnostic Systems, SAD) temelje se na umnažaju nukleotidnih sekvenci u kriptičkom plazmidu, koji je višestruko prisutan u svakom ET (14). Amplifikacija posredovana transkripcijom BD ProbeTec (BD Diagnostic Systems, SAD) usmjerena je prema 23S rRNA, također prisutnoj u većem broju kopija (14).

Uzimajući u obzir velik broj ciljnih mjesta za postupke amplifikacije, korištenje NAA bi trebalo omogućiti detekciju manje od jednog ET, što se i postiže u pročišćenim suspenzijama klamidijskih čestica (14). Ipak, kad je riječ o kliničkim uzorcima, prava osjetljivost je nešto manja (90-96%) uslijed neujednačenog uzorkovanja i inhibicije amplifikacijskih reakcija raznim utjecajnim čimbenicima u samom uzorku (71). Svi navedeni testovi su iznimno specifični ako se izbjegnu problemi s kontaminacijom, označavanjem ili lošim uzorkovanjem (14). Kliničke evaluacije ovih metoda pokazale su višu osjetljivost u usporedbi sa staničnom kulturom i drugim opisanim metodama (72,73), no pozitivan rezultat ponekad je potrebno potvrditi kultivacijom u već opisanim specifičnim slučajevima (58).

1.3.4. Serološke metode

Serološka dijagnostika nekompliciranih genitalnih infekcija uretre i donjeg genitalnog trakta uzrokovanih *C. trachomatis* se ne preporuča zbog otežanog dokazivanja aktivne infekcije, a nije pogodna ni za probir u asimptomatskih osoba (58). Svoje mjesto pronalazi u dijagnostici LGV i neonatalne pneumonije uzrokovane ovim uzročnikom. Najčešće korištene metode su reakcija vezanja komplementa (RVK) kojom se dokazuju ukupni imunoglobulini i testovi za

dokaz pojedinih klasa protutijela kao što su MIF test i EIA. RVK koristi grupno-specifični antigen te shodno tome ne može razlikovati vrstu klamidija, kao ni klasu protutijela. MIF i EIA su testovi specifični za vrstu pomoću kojih je moguće pojedinačno odrediti IgM, IgA i IgG protutijela (14). Određene makromolekule na površini *C. trachomatis* kao što su MOMP, OmcB i LPS mogu inducirati jak odgovor humoralne imunosti u zaraženog domaćina, no zbog zajedničkih epitopa s drugim vrstama u porodici može doći do ukrižene reaktivnosti.

MIF koju su razvili Wang i Grayston (74) trenutno je metoda izbora za serodijagnostiku infekcije *C. trachomatis* u novorođenčadi. Visoka razina IgM protutijela povezuje se s bolešću, dok su IgG protutijela od manjeg značaja zbog toga što se klinička slika može razviti dok su još uvijek prisutna majčina IgG protutijela. Tek dojenčad stariju od devet mjeseci ima smisla testirati na IgG protutijela, budući da majčina nestaju iz djetetovog krvotoka za šest do devet mjeseci. Djeca s inkluzijskim konjunktivitisom ili kliconoštvom u respiratornom traktu bez pneumonije obično imaju vrlo nisku razinu IgM protutijela, zbog čega titar IgM protutijela veći od 32 podupire dijagnozu klamidijske pneumonije.

1.4. Liječenje klamidijskih infekcija

Liječenje pacijenata zaraženih s *C. trachomatis* dovodi do povlačenja tegoba (u slučajevima simptomatske infekcije) te sprječavanja daljnjeg prijenosa uzročnika, a liječenje njihovih partnera sprječava reinfekciju ili infekciju drugih osoba. U terapiji klamidijske infekcije koriste se makrolidi, tetraciklini i fluorokinoloni. U Tablici 2 su prikazane trenutno važeće američke smjernice preporučenog i alternativnog režima antimikrobnog liječenja akutnog uretritisa/cervicitisa uzrokovanog *C. trachomatis* (75).

U trudnoći je kontraindicirana primjena doksiciklina, ofloksacina i levofloksacina, no brojna istraživanja ukazuju na sigurnost i učinkovitost azitromicina (1 g oralno u jednokratnoj dozi), koji se zbog toga u takvoj situaciji preporuča kao lijek izbora (76-78). Drugi preporučeni režim je davanje amoksicilina 500 mg tri puta dnevno kroz 7 dana, a alternativno se može dati i eritromicin (75). Liječenje klamidijskih infekcija dojenčadi (ophthalmia neonatorum, pneumonija) bazira se na eritromicinu ili etilsukcinatu, 50 mg/kg na dan podijeljeno u 4 dnevne doze u oralnom obliku kroz 14 dana (75). S obzirom na povezanost oralne terapije eritromicinom i infantilne hipertrofične stenoze pilorusa kod djece mlađe od 6 tjedana, nužno je nadzirati svu dojenčad na terapiji eritromicinom (79,80).

Hrvatske smjernice za liječenje klamidijskih infekcija u skladu su s američkim smjericama (81). Prihvaćene su od strane osam stručnih društava Hrvatskog liječničkog zbora: Hrvatskog društva za medicinsku mikrobiologiju i parazitologiju, Hrvatskog društva za urogenitalne infekcije, Hrvatskog urološkog društva, Hrvatskog društva za kemoterapiju, Hrvatskog društva za kliničku farmakologiju, Hrvatskog društva za nefrologiju, dijalizu i transplantaciju, Hrvatskog društva za ginekologiju i opstetrijicu te Hrvatskog društva infektologa.

U bolesnika s akutnim prostatitisom uzrokovanim *C. trachomatis* naše smjernice preporučaju periodičnu primjenu azitromicina u dozi od 1,0 do 1,5 grama, 3 ili više puta s razmakom 7 do 10 dana, tako da se postigne ukupna doza od 3 do 6 grama (81). Doksiciklin se primjenjuje u dozi 2 x 100 mg dnevno, a ofloksacin 2 x 300 mg ili 2 x 400 mg dnevno tijekom 2 do 4 tjedna. Nadalje, u smjernicama se preporuča liječenje kroničnog klamidijskog prostatitisa u trajanju od 4 tjedna, pulsnom primjenom azitromicina (1,0-1,5 g, 4 ili više puta s razmakom od 7 do 10 dana u ukupnoj dozi od 4 do 6 grama). Navodi se i mogućnost liječenja klaritromicinom, a liječenje egzacerbacija identično je liječenju akutnog klamidijskog prostatitisa (81-84).

Tablica 2. Preporučeni i alternativni režim antimikrobnog liječenja uretritisa/cervicitisa uzrokovano *C. trachomatis* (Izvor: <http://www.cdc.gov>)

| Preporučeni režim | Alternativni režim |
|--|--|
| <p style="text-align: center;">Azitromicin (1 g oralno jednokratno)</p> <p style="text-align: center;">ILI</p> <p style="text-align: center;">Doksiciklin (2 x 100 mg dnevno tijekom 7 dana)</p> | <p style="text-align: center;">Eritromicin (4 x 500 mg dnevno tijekom 7 dana)</p> <p style="text-align: center;">ILI</p> <p style="text-align: center;">Eritromicin etilsukcinat (4 x 800 mg dnevno tijekom 7 dana)</p> <p style="text-align: center;">ILI</p> <p style="text-align: center;">Levofloksacin (500 mg dnevno tijekom 7 dana)</p> <p style="text-align: center;">ILI</p> <p style="text-align: center;">Ofloksacin (2 x 300 mg dnevno tijekom 7 dana)</p> |

1.5. Rezistencija *C. trachomatis* na antimikrobne lijekove

1.5.1. Literaturni opisi rezistentnih urogenitalnih izolata

Premda se u novim studijama *in vitro* potvrđuje dobra osjetljivost klamidijskih sojeva na antibiotike iz standardno propisivanih skupina, čini se da je rezistencija urogenitalnih klamidijskih sojeva na makrolide, tetracikline i fluorokinolone rijetka, ali sigurna pojava. Jones je sa suradnicima 1990. godine opisao pet bolesnika inficiranih klamidijskih sojevima rezistentnim na doksiciklin, tetraciklin, eritromicin i sulfametoksazol, a osjetljivim na ofloksacin i ciprofloksacin (85). Četiri od pet obuhvaćenih pacijenata prethodno je neuspješno liječeno antibioticima. Rezistencija se mogla uočiti isključivo primjenom velikog inokuluma (što kasnije postaje standard pri izradi klamidijskih antibiograma), a manje od 1% populacije mikroorganizama pokazalo je rezistenciju visokog stupnja.

1997. godine Lefèvre i suradnici su u francuskom Toulouseu izolirali soj *C. trachomatis* rezistantan na tetraciklin (86). Radilo se o uzorku endocerviksa bolesnice prethodno liječene istim antibiotikom. Nakon što je u terapiju uveden pristinamicin, infekt je uspješno izliječen. Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) i minimalna klamicidna koncentracija (MCC) tetraciklina za navedeni izolat bile su više od 64 µg/ml, premda je (kao u studiji Jonesa i suradnika) rezistenciju ispoljilo tek 1% populacije mikroorganizama. Usporedbe radi, Lefèvre i Lépargneur navode osjetljivost 34 klamidijskih izolata u Toulouseu prije provedenog antibiotskog liječenja čiji je MIC mahom bio manji ili jednak 0,25 µg/ml (87).

Somani i suradnici proveli su 2000. godine genotipizaciju i testiranje osjetljivosti urogenitalnih izolata *C. trachomatis* tri bolesnika – dva su prethodno neuspješno liječena

azitromicinom, a jedna je bila supruga pacijenta (88). Sva tri izolata bila su rezistentna na doksiciklin, azitromicin i ofloksacin te pokazivala koncentraciju veću od 4,0 µg/ml. Identični *omp1* genotip potvrdio je da se radi o relapsu infekcije istim rezistentnim izolatom. Ono na što istraživanje također ukazuje jest da klamidijska infekcija može biti u latentnom stadiju uz negativni nalaz PCR-a, a zatim mjesecima kasnije izazvati relaps i simptomatsku bolest, što potvrđuje i slučaj njihovog pacijenta.

Detaljniju genetsku analizu rezistentnih klamidijskih izolata proveli su Misiurina i suradnici 2004. godine (89). U njihovom radu detektirana su tri izolata s visokom rezistencijom na tri fluorokinolonska antimikrobna lijeka (ciprofloksacin, pefloksacin i ofloksacin) uz MIC veći od 64 µg/ml. Zatim su odredili slijed nukleotida gena u determinirajućoj regiji za rezistenciju na kinolone (engl. QRDR, *quinolone resistance-determining region*) koji kodiraju A podjedinicu DNA-giraze (*gyrA*), C podjedinicu DNA-topoizomeraze IV (*parC*), kao i efluksni protein (3' regija gena *ygeD*). Iako se *gyrA* i *parC* nisu razlikovali od referentnog genoma *C. trachomatis*, dva visoko rezistentna izolata su pokazivala nekoliko „tihih“ mutacija te mutacija koje rezultiraju zamjenom aminokiselina u 3' regiji gena *ygeD*.

Recentnije istraživanje Bhengraja i suradnika iz 2010. godine provedeno u Indiji obuhvatilo je simptomatske bolesnice s rekurentnim klamidijskim infekcijama (90). Osjetljivost na azitromicin i doksliciklin je određena za 21 klinički izolat, od kojih je osam (38%) pokazalo smanjenu osjetljivost na navedene antibiotike. Dva rezistentna izolata imala su MIC 8 µg/ml za oba lijeka, koja su u drugom istraživanju podvrgnuta ispitivanju eventualne prisutnosti mutacijskih promjena na ključnim genskim pozicijama za rezistenciju na makrolide (L4, L22, 23S rRNA) (91). Takvom genotipskom karakterizacijom nisu pronađene mutacije na ciljnim mjestima djelovanja azitromicina.

Svi opisani rezistentni klamidijski izolati pokazuju obrazac „heterotipne rezistencije“, tj. fenomen gdje vrlo mali broj mikroorganizama (otprilike 1% bakterijske populacije) preživljava veoma visoke koncentracije antimikrobnog lijeka (92). Taj termin u principu opisuje pojavu heterogene populacije rezistentnih i osjetljivih bakterija dobivene subkultivacijom jednog rezistentnog organizma izoliranog u hranilištu s antibiotikom. Za razliku od toga, obrazac „homotipne rezistencije“ označava pojavu homogene klonalne populacije rezistentnih bakterija dobivenih subkultivacijom jednog rezistentnog mikroorganizma (59,93).

Do danas još nije opisana „homotipna rezistencija“ kod sojeva *C. trachomatis* izoliranih u ljudi, ali je opisana kod filogenetski srodne vrste *C. suis* u svinja (94). Andersen i Rogers su opisali stabilni oblik „homotipne rezistencije“ na tetraciklin ($MIC \geq 5 \mu\text{g/ml}$) u osam svinjskih izolata *C. suis* koji su prije testiranja podvrgnuti kultivaciji u trajanju od 10 do 15 pasaža u mediju bez tetraciklina. Kako su analozi tetraciklina široko korišteni kao aditivi u hrani za svinje, selektivni pritisak uslijed kontinuirane izloženosti ovom antimikrobnom lijeku vjerojatni je mehanizam razvoja visoke rezistencije sojeva *C. suis* (92).

Somani i suradnici pretpostavljaju da je mehanizam „heterotipne rezistencije“ *C. trachomatis* na veći broj antimikrobnih lijekova u naravi više fenotipski nego genotipski (95). Njihova je premisa da takva multipla rezistencija nastaje kao nusprodukt neke još nedefinirane promjene u rastu ili životnom ciklusu klamidijskih sojeva koja rezultira intermedijarnim stadijem otpornim na djelovanje antibiotika. Zajedno s još nekim autorima predlaže i mogućnost „heterotipne rezistencije“ posredovane nekim oblikom potentnih efluksih pumpi koja onemogućava nakupljanje lijeka u klamidijom inficiranoj stanici ili inkluziji (95,96).

1.5.2. Molekularni mehanizmi rezistencije

1.5.2.1. Rezistencija na makrolide

Azitromicin je antibiotik iz skupine makrolida i jedan od lijekova prvog izbora za liječenje infekcije *C. trachomatis* (75). Reverzibilno se veže na veliku ribosomsku podjedinicu u blizini peptidil-transferaznog centra i zaustavlja rast stanice uslijed inhibicije sinteze proteina. Binet i Maurelli su u *in vitro* modelu opisali populaciju *C. trachomatis* serovara L2 s osmerostruko slabijom osjetljivošću na azitromicin i četverostruko slabijom osjetljivošću na eritromicin zbog mutacije gena *rplD* koji kodira ribosomalni protein L4 (97). Zamjena neutralnog glutamina na 66. poziciji s pozitivno nabijenim lizinom utječe na vezanje klamidijskog ribosomalnog proteina L4 na odgovarajuće molekule 23S rRNA. Već je otprije poznato kako mutacije u tom konzerviranom dijelu proteina L4 utječu na promjenu konformacije 23S rRNA u domenama II, III i V (98,99), što dovodi do poremećaja translacijske aktivnosti ribosoma te posljedično slabijeg djelovanja antibiotika na peptidil-transferazni centar.

Misyurina je sa suradnicima opisao mutacije A2058C i T2611C u peptidil-transferaznoj regiji 23S rRNA gena u kliničkim izolatima rezistentnim na eritromicin, azitromicin i josamicin (100). Istodobno je pronašao trostruku mutaciju u proteinu L22 (zamjena glutamina sa serinom na 52. poziciji, arginina s cisteinom na 65. poziciji te valina s alaninom na 77. poziciji). Točna uloga navedenih zamjena aminokiselina u rezistenciji *C. trachomatis* još nije poznata, no pretpostavlja se da se radi o kompenzatornim mutacijama u svrhu održavanja virulencije klamidijskih sojeva.

Naime, premda su mutacije gena *rplD* povezane s rezistencijom na makrolide pronađene *in vitro* u velikog broja klinički relevantnih mikroorganizama (101-103), one su često praćene dodatnim mutacijama gena 23S rRNA ili *rplV* (koji kodira ribosomski protein L22) (104,105). Wolter je sa suradnicima pokazao kako je održavanje izolata *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) rezistentnih na makrolide uslijed mutacije ribosomskog proteina L4 moguće upravo zbog sekundarnih mutacija koje kompenziraju defekt u rastu bakterija (106). Kako su u Binetovom i Maurellijevom *in vitro* modelu sojevi *C. trachomatis* otporni na antibiotik rasli slabije, formirali manje inkluzije i stvarali manje infektivnih čestica u odsustvu antibiotika, izgleda da su kompenzatorne mutacije važne u razvoju rezistencije *in vivo*.

1.5.2.2. Rezistencija na tetracikline

Tetraciklini blokiraju sintezu proteina sprječavajući interakciju aminoacil tRNA s ribosomima, a doksiciklin je polusintetski predstavnik skupine koji je također jedan od lijekova prvog izbora u liječenju klamidijske infekcije (75). Osim za liječenje ljudi, koriste se i u veterinarskoj medicini zbog relativno niske cijene, širokog spektra aktivnosti i odlične distribucije u tkivima. Mehanizmi rezistencije na tetraciklinske antibiotike podrobno su opisani u vrlo srodnoj vrsti *Chlamydia suis* (*C. suis*) (107-109) nakon čega je dokazana mogućnost prijenosa rezistencije na kliničke izolate *C. trachomatis* u uvjetima *in vitro* (110). Genetička karakterizacija rezistentnih izolata otkriva prisutnost stranih genomskih otoka (veličine između 6 i 13,5 kb) integriranih u klamidijski kromosom. Na svakom otoku nalaze se geni koji kodiraju efluksnu pumpu za antibiotik (*tet[C]*) i regulatorni represor (*tetR*), jedinstvena insercijska sekvenca (IS_{CS605}) te do desetak dodatnih gena uključenih u replikaciju i mobilizaciju plazmida (107).

Genski otoci rezistentne *C. suis* koji sadrže gen *tet[C]* pokazuju 99%-tnu podudarnost s plazmidom pRAS3.2 izoliranim iz gram-negativne bakterije *Aeromonas salmonicida*, koja se pronalazi u ribama (107). Ipak, u tom plazmidu nije pronađena insercijska sekvenca IScs605, već je ista u potpuno identičnom obliku detektirana u jednoj drugoj vodenoj gram-negativnoj bakteriji, *Laribacter hongkongensis*, koja se sve češće dovodi u vezi s gastroenteritisom i putničkim proljevima u ljudi (111). Otkriće gena *tet[C]* predstavlja prvi opis horizontalnog prijenosa gena antibiotske rezistencije u nekoj obligatnoj unutarstaničnoj bakteriji (112).

Uzgojne metode svinja u industriji značajno se oslanjaju na profilaktičku primjenu tetraciklina, a kao jedan od izvora hrane često se koriste ribe. Veliki broj svinja u SAD-u zaražen je rezistentnim sojevima *C. suis* (94,113), a ista je situacija opisana i u Italiji (114). Smatra se kako plazmid u probavni sustav svinja ulazi unutar bakterije *A. salmonicida* preko hrane. Uzevši u obzir da su insercijske sekvence srodne s IScs605 pronađene u čitavom nizu životinjskih vrsta roda *Helicobacter* (115), ali i već spomenutoj *L. hongkongensis*, plazmid tu sekvencu može akvirirati tijekom prolaska kroz sam gastrointestinalni trakt. Čitav genomski otok tada se fizički prenosi na *C. suis* putem još nedovoljno istraženog procesa, no poznato je da se usidruje pored TTCAA sekvence unutar *inv-like* gena (107).

Unatoč tome što je put razvoja rezistencije u ovakvom prirodnom ekosustavu vrlo zahtjevan, u laboratorijskim uvjetima se prijenos rezistencije putem homologne rekombinacije među sojevima postiže lakše i brže. Suchland i suradnici pokazali su kako se prenošenje markera rezistencije s *C. suis* na *C. trachomatis* događa gotovo rutinski uslijed zajedničke kultivacije ove dvije vrste (110). Stoga kontakt između klamidijjskih sojeva rezistentnih i osjetljivih na tetracikline može omogućiti prijenos gena rezistencije i razvoj rezistentnog fenotipa, što u

pacijenata liječenih tetraciklinskim antibioticima za posljedicu može imati propagaciju i selekciju takvih sojeva.

1.5.2.3. Rezistencija na fluorokinolone

Fluorokinoloni su sintetski baktericidni antibiotici koji inhibiraju DNA-girazu i DNA-topoizomerazu IV, a spadaju među lijekove drugog izbora u liječenju klamidijskih infekcija (75). Izolati *C. trachomatis* mogu razviti rezistenciju na kinolone nakon što se u uvjetima *in vitro* izlože subinhibitornim koncentracijama antibiotika. Primjerice, nakon samo četiri pasaže u prisutnosti 0,5 µg/ml ofloksacina, MIC *C. trachomatis* povećao se s 1 na 64 µg/ml (116). Sličan rezultat dobiven je i nakon četiri pasaže u prisutnosti 0,015 µg/ml sparfloksacina. Druga istraživanja identificirala su slične mutacije povezane s kultivacijom *C. trachomatis* u prisutnosti kinolona, ali je broj pasaža potrebnih za selekciju rezistentnih mutanata varirao između četiri i 24 (112,117). Slična istraživanja na levofloksacinu nisu pokazala razvoj rezistencije, iako je došlo do određenih promjena vidljivih tijekom DNA profiliranja (118).

Rezistencija na fluorokinolone povezuje se s točkastom mutacijom u regiji QRDR, smještenom u području gdje se nalaze geni za enzime DNA-girazu i topoizomerazu IV (116). Oba se enzima sastoje se od dvije podjedinice, koje su kod giraze kodirane genima *gyrA* i *gyrB*, a kod topoizomeraze *parC* i *parE* (117). Kod rezistentnih klamidijskih sojeva radi se o jednoj točkastoj mutaciji u genu *gyrA* u području QRDR koja dovodi do zamjene serina s izoleucinom na 83. poziciji, dok varijacije u genima *gyrB*, *parC* i *parE* ne pridonose razvoju rezistencije (116). To ukazuje na činjenicu da je DNA-giraza u slučaju *C. trachomatis* glavni

cilj djelovanja fluorokinolona, što je u suglasju s prethodnim istraživanjima na gram-negativnim bakterijama.

Mogućnost utjecaja drugih mehanizama poput sprječavanja ulaska lijeka ili njegova efluksa na razvoj rezistencije visokog stupnja u klamidijских sojeva još se uvijek ne može isključiti (119). Ipak, ti mehanizmi su uglavnom vezani za niski stupanj rezistencije, a karakterizira ih i ukrižena rezistencija na različite skupine antibiotika. Nadzor je u svakom slučaju potreban, budući da laboratorijska selekcija rezistentnih sojeva uslijed ponavljanoг izlaganja osjetljivih sojeva na ofloksacin i sparfloksacin sugerira da se takvo što može dogoditi i u uvjetima *in vivo* tijekom produljene terapije fluorokinolonima (116).

1.5.2.4. Rezistencija na rifamicine

Rifamicini, od kojih je glavni predstavnik rifampicin, predstavljaju skupinu baktericidnih antibiotika koji inhibiraju bakterijsku transkripciju uslijed interakcije s β -podjedinicom RNA-polimeraze. Radi se o lijekovima koji danas nisu lijek izbora u liječenju klamidijских infekcija, premda su učinkoviti u uvjetima *in vitro* i dolaze u obzir kao jedna od terapijskih mogućnosti (112). Pri izlaganju subinhibitornim koncentracijama rifampicina opisan je brz razvoj rezistencije *in vitro* u sojeva *C. trachomatis*, ali i drugih klamidijских vrsta (120-122). Supstitucija aminokiselina u β -podjedinici RNA-polimeraze smanjuje njenu mogućnost vezanja za rifampicin, što omogućuje preživljavanje bakterija čak i kad su suočene s visokom koncentracijom antimikrobnog lijeka (123).

Poput mnogih bakterijskih vrsta koje rezistenciju na ovaj antibiotik stječu izmjenom nukleotida u genu *rpoB* odgovornom za kodiranje navedene β -podjedinice, rezistentni klamidijski sojevi pokazuju široki spektar promjena u središnjem dijelu tog gena. Tako zamjena samo jedne aminokiseline povećava MIC od 0,008 $\mu\text{g/ml}$ do između 0,5 i 64 $\mu\text{g/ml}$ u sojeva *C. trachomatis* koji pripadaju serovaru D, te između 4 i 64 $\mu\text{g/ml}$ u sojeva serovara K (124). Najčešće mjesto zahvaćeno mutacijom u tih rezistentnih klonova bio je nukleotid na poziciji 471 u genu *rpoB*. Kad je ta zamjena praćena još jednom mutacijom, MIC se višestruko povećao sa 64 na 512 $\mu\text{g/ml}$ kod izolata serovara D, i sa 64 na 256 $\mu\text{g/ml}$ kod izolata serovara K (124).

1.5.2.5. Rezistencija na druge antimikrobne lijekove

Sulfonamidi i trimetoprim interferiraju sa sintezom folata u bakterija koji je nužan za sintezu, popravak i metilaciju DNA. Stabilna rezistencija na trimetoprim javlja se u vrlo niskoj frekvenciji kod sojeva *C. trachomatis* kultiviranih u subinhibitornim koncentracijama antibiotika u uvjetima *in vitro* (125). Povezuje se s mutacijama u genu *folA* (dihidrofolat redukataza), dok specifični insercijski elementi i točkaste mutacije u genu *folP* (dihidrofolat sintaza) dovode do rezistencije na sulfonamide (112).

Aminoglikozidi onemogućavaju početak translacije uslijed interakcije s 30S podjedinicom ribosoma. Zbog slabog prodiranja u stanice ne koriste se u liječenju klamidijskih infekcija, no kasugamicin i spektinomicin u eksperimentalnim uvjetima dovode do razvoja rezistentnih klamidijskih sojeva na ovu skupinu antibiotika (112). Sojeve *C. trachomatis* rezistentne na kasugamicin karakterizira insercija dva nukleotida u gen *ksgA* koji kodira protein KsgA

zaslužan za posttranskripcijsku metilaciju adenzinskih ostataka na ribosomima (126). Premda kod većine drugih bakterija (pa i kod sojeva *Clamidophila psittaci*) rezistencija na aminoglikozide često nastaje mutacijom gena koji kodiraju 16S rRNA, *C. trachomatis* kodira dvije gotovo identične kopije operona, što objašnjava zbog čega se takvi rezistentni sojevi mogu očekivati izuzetno rijetko.

Linkomicin je bakteriostatski inhibitor sinteze proteina koji dovodi do preuranjenog otpuštanja peptidil-tRNA s ribosomskog kompleksa. U literaturi postoji samo jedan opis rezistencije sojeva *C. trachomatis* na ovaj antibiotik u uvjetima *in vitro*. Radi se o vrlo niskoj frekvenciji izolacije takvih mutanata (manje od 5×10^{-10}) uslijed rasta i pasaže zaraženih stanica u subinhibitornim koncentracijama linkomicina (112). Rezistentne mutante karakterizira mutacija u oba gena za 23S rRNA, što odgovara mutacijama kod sojeva *E. coli* rezistentnih na ovaj antibiotik (125).

1.6. Metode testiranja antimikrobne osjetljivosti *C. trachomatis*

1.6.1. Kultivacija uz detekciju izravnom imunofluorescencom

Određivanje antimikrobne osjetljivosti *C. trachomatis* znatno se razlikuje od standardnih postupaka u bakteriologiji, s obzirom da je potrebno dokazati sposobnost ili nesposobnost umnažanja ovog uzročnika u stanicama uz prisutnost različitih koncentracija antibiotika. Sustavi temeljeni na staničnoj kulturi uz dodatak serijski razrijeđenih koncentracija antibiotika predstavljaju tradicionalnu, ali još uvijek najčešće korištenu metodu za testiranje osjetljivosti klamidijских sojeva (127). Umnažanje klamidija unutar samih stanica prije se detektiralo dokazom unutarstaničnih inkluzija bojenjem jodom ili prema Giemsi (128,129). Danas su takva bojanja napuštena te se vizualizacija postiže pomoću monoklonskih protutijela obilježenih fluoresceinom (130).

U samom testiranju moguće je koristiti nekoliko različitih vrsta staničnih kultura ljudskog ili životinjskog porijekla. Najčešće su to McCoy (mišji fibroblasti), HeLa (ljudski adenokarcinom vrata maternice), HEp-2 (ljudski epidermoidni karcinom larinksa) i HL (ljudske epitelne stanice), dok se rjeđe koriste stanične linije bubrega primata BGMK i Vero (92). Suchland i suradnici su demonstrirali približno jednaku osjetljivost svih navedenih staničnih linija kod testiranja na tetraciklin, doksiciklin i ofloksacin, no MIC i MCC azitromicina i eritromicina su pokazivali varijacije ovisno o primijenjenoj kulturi (uz značajno povišene vrijednosti pri korištenju BGMK stanica) (92).

Laboratorijski uvjeti poput temperature, pH vrijednosti, hranjivih sastojaka u mediju, polarnosti zaraženih stanica i lučenja citokina mogu utjecati na mogućnost penetracije i

postizanja učinka određenih antimikrobnih lijekova (131). Rota je pokazao da se u mediju s visokom koncentracijom glukoze, neutralnom pH vrijednošću i temperaturom između 33 i 35 °C tijekom centrifugiranja javlja veći broj klamidijskih inkluzija u zaraženim McCoy stanicama (132). Wyrick je sa suradnicima pokazao kako korištenje polariziranih stanica omogućuje učinkovitiji prijenos i unutarstanično nakupljanje azitromicina, zbog čega se *C. trachomatis* doima osjetljivija na aktivnost tog antibiotika (133). Nadalje, za postizanje optimalnih rezultata testa osjetljivosti bitna je i konstantna kontrola kvalitete korištene stanične linije.

Dodatni čimbenici koji mogu utjecati na rezultate testa osjetljivosti uključuju veličinu inokuluma, period između postizanja infekcije i primjene antimikrobnog lijeka, te pravovremeno odstranjivanje antibiotika. Suchland i suradnici nisu primijetili razlike u vrijednostima MIC-ova ako se antimikrobni lijekovi dodaju između 0 i 8 sati od infekcije, dok su se nakon 8 sati vrijednosti u pravilu povećavale (92). Notomi i suradnici pokazali su kako ni dodatak ofloksacina ili sparfloksacina u koncentracijama od 64 µg/ml ne može spriječiti formiranje klamidijskih inkluzijskih tjelešaca ako se dodaju 20 sati nakon početka infekcije (134). Dodatak antimikrobnog lijeka nakon kritičnog vremenskog intervala stoga može smanjiti antibakterijski učinak na sojeve *C. trachomatis*.

Najvažniji aspekt u određivanju antimikrobne osjetljivosti *C. trachomatis* je precizno definiranje MIC-a, s obzirom da je razlikovanje aberantnih od normalnih inkluzija vrlo često teško i podložno subjektivnoj interpretaciji. Zbog toga je uveden MIC_{TP} (engl. *transition point*) kao ono razrjeđenje kod kojeg dolazi do izrazite promjene morfologije i veličine inkluzija, kad je gotovo svaka prisutna inkluzija aberantna (Slika 6). U daljnjim serijskim razrjeđenjima ponekad se može vidjeti pokoja inkluzija za koju je vrlo teško reći je li ona tipične

povećanja 400X. Na taj način se osigurava dovoljan broj inkluzija za precizno očitavanje svih inhibitornih koncentracija (92).

S obzirom da se radi o tehnički zahtjevnoj, skupoj i dugotrajnoj metodi (velik broj pasaža uz dugotrajan biološki ciklus klamidije), testiranje antimikrobne osjetljivosti *C. trachomatis* u staničnoj kulturi ne provodi se rutinski u kliničkom laboratoriju, već samo u usko specijaliziranim laboratorijima.

1.6.2. Kultivacija uz detekciju RT-PCR-om

Testiranje antimikrobne osjetljivosti klamidijskih sojeva pomoću tehnike lančane reakcije polimerazom uz prethodnu reverznu transkripciju (engl. RT-PCR, *reverse transcription polymerase chain reaction*) predstavlja alternativni pristup koji se temelji na detekciji specifičnog transkripta DnaK (139). Metoda se sastoji od kombinacije uzgoja na staničnoj kulturi i molekularne detekcije živih bakterija u supernatantu, a prednost je dokaz klamidija u kulturama koje se smatraju negativnima nakon imunofluorescentnog bojenja. Premda se danas ova metoda ne koristi u testiranju osjetljivosti sojeva *C. trachomatis*, usporedba sa staničnom kulturom uz detekciju izravnom imunofluorescencom otkriva određene prednosti.

Nakon uzgoja u staničnoj kulturi uz dodatak antibiotskih razrjeđenja, stanice iz svake jažice podvrgavaju se ekstrakciji RNA i RT-PCR-u. U postupku Crossa i suradnika korištena je *Tth* DNA-polimeraza i dvije oligonukleotidne početnice (prednja početnica 5'CCTGCAAAACGTCAAGCAGT3'; stražnja početnica 5'AATGCGTCCAGCATCTTTTG3'), a rezultirajući produkt bio je veličine 318 parova baza

(140). MIC je definiran kao najmanja koncentracija antibiotika koja je inhibirala pojavu navedenog produkta u obliku vrpce na gelu obojanom etidijevim bromidom.

MIC-ovi dobiveni RT-PCR tehnikom u istraživanju Crossa i suradnika većinom su usporedivi, premda konzistentno viši u usporedbi s koncentracijama dobivenim metodom imunofluorescence, što upućuje na poboljšanu osjetljivost ove metode (140). Navedeno je povećanje variralo od 1,6 puta u slučaju eritromicina, do više od 195 puta pri testiranju amoksicilina. To se tumači dostatno suprimiranim rastom klamidija pri koncentracijama iznad vrijednosti MIC-ova izmjerenih u staničnoj kulturi, ali uz prisutnost replikacije vrlo niske razine detektibilne PCR-om.

Prednost RT-PCR tehnike pred običnim PCR-om jest detekcija RNA koju proizvode samo vijabilni organizmi, u usporedbi s nevijabilnima čiju DNA može detektirati konvencionalni PCR (141). Ipak, zbog upitne laboratorijske i kliničke vrijednosti aberantnih inkluzija u kojima može biti prisutna rezidualna replikacija, stanične kulture uz definiran MIC_{TP} su i nakon više od deset godina opisa molekularne tehnike ostale standard za određivanje antimikrobne osjetljivosti izolata *C. trachomatis*. U slučaju daljnjeg razvoja metode RT-PCR za ovu svrhu, primjenu bi mogla pronaći u detekciji perzistentnih klamidijskih infekcija, tj. tjelešaca.

1.6.3. Kultivacija uz detekciju protočnom citometrijom

Protočna citometrija ima svoju ulogu kako u dijagnostici klamidijskih infekcija, tako i u proučavanju procesa vezanja, ulaska i rasta *C. trachomatis* u staničnoj kulturi (142-144).

Proučavanje antimikrobne osjetljivosti brojnih bakterija i gljiva (145-147), ali i unutarstaničnih organizama poput virusa (148) pomoću ove metode danas je vrlo razvijeno. Određivanje osjetljivosti kliničkih klamidijских izolata na standardne antibiotike pomoću protočne citometrije sa suradnicima je opisala Dessus-Babus još 1998. godine (149). Premda se danas laboratoriji koji se bave proučavanjem antimikrobnog profila sojeva *C. trachomatis* njome ne koriste, zbog svoje reproducibilnosti predstavlja solidnu alternativu gore navedenim metodama.

Sojevi *C. trachomatis* prvo se moraju uzgojiti na McCoy stanicama i obojati FITC-protutijelima. Inficirane stanice nakon bojenja fluoresciraju intenzivno zeleno, što se očituje prisutnošću desnostranog „peaka“ na histogramima (ljevostrani „peak“ predstavlja neinficirane stanice) (Slika 7). Prije pristupanja samom mjerenju potrebno je arbitrarno odrediti prag pozitivnog zelenog fluorescentnog signala koji treba iznositi između 0,5 i 1% pozitivnih stanica u usporedbi s neinficiranim kontrolnim stanicama.

Nadalje, potrebno je vrednovati dva parametra populacije pozitivnih stanica: postotak pozitivnih stanica i njihov srednji intenzitet fluorescencije (MFI, engl. *mean fluorescence intensity*). Upravo je MFI ključan u procjeni antibiotske aktivnosti, a pozitivnim nalazom smatra se barem jedna jedinična vrijednost više u usporedbi s negativnom kontrolom. Aktivna koncentracija antimikrobnog lijeka izražava se kao inhibitorna koncentracija 50 (IC₅₀), što predstavlja koncentraciju potrebnu za pedeset postotno smanjenje MFI-ja u usporedbi s kontrolom bez dodatka antibiotika.

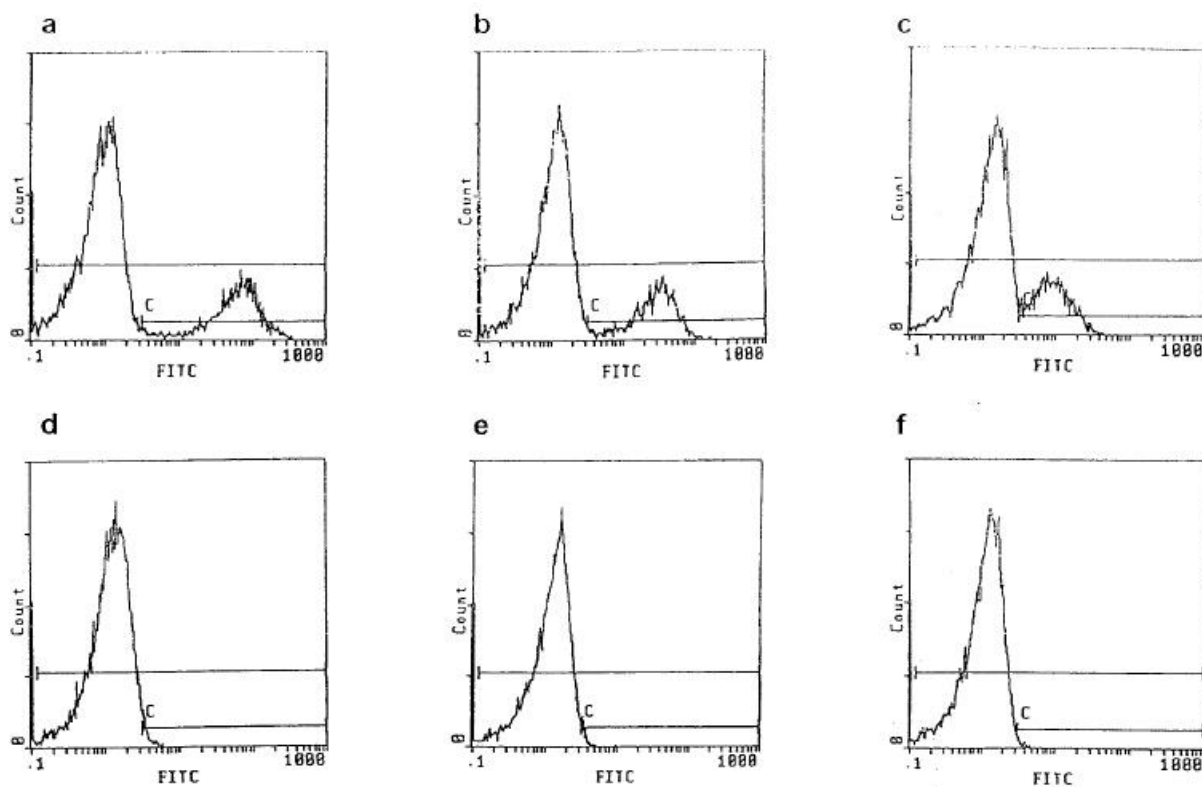
Upotreba protočne citometrije za određivanje osjetljivosti *C. trachomatis* od stanične se kulture razlikuje u količini inokuluma i vremenu inkubacije. Protočna citometrija zahtjeva

veći inokulum klamidija – konkretno 100 000 IFU/ml (149), za razliku od 5 000 - 10 000 IFU/ml koliko se preporuča u staničnoj kulturi (92). Klamidijske kulture sa i bez dodatka antimikrobnog lijeka inkubiraju se tijekom 25 sati (za razliku od 48 sati kod mikroskopskog očitavanja), što je dovoljan period kako bi se postigao antibiotski učinak na rast klamidija vidljiv protočnom citometrijom, ali i elektronskom mikroskopijom (150).

Dessus-Babus i suradnici uspoređivali su rezultate antimikrobne osjetljivosti na eritromicin, doksiciklin i ofloksacin dobivene metodama imunofluorescence i protočne citometrije (149). Antibiotsku aktivnost kod protočne citometrije označavala je redukcija vrijednosti MFI, a MIC-ovi dobiveni na taj način bili su ekvivalentni onima kod imunofluorescence. Izračun IC_{50} se od vrijednosti MIC-a razlikovao od jednog do dva razrjeđenja za ofloksacin, te od dva do tri razrjeđenja za eritromicin i doksiciklin.

Iako nije osjetljiva kao metoda imunofluorescence nakon inkubacije u staničnoj kulturi, glavne prednosti kultivacije uz detekciju protočnom citometrijom za određivanje osjetljivosti *C. trachomatis* na različite antimikrobne lijekove jesu specifičnost, reproducibilnost i objektivna interpretacija. Glavni nedostatak je nemogućnost detekcije „heterotipne rezistencije“ zbog nedovoljne osjetljivosti otkrivanja niske razine infekcije. Osim toga, visoka cijena aparature i vremenski vrlo zahtjevna obrada uzoraka zbog potrebe velikog inokuluma također otežavaju širu implementaciju ove metode.

Slika 7. Fluorescentni histogrami dobiveni protočnom citometrijom. Prisutnost zaraženih stanica karakterizirana ljevostranim i desnostranim „peakom“ detektirana je u slučajevima (a), (b) i (c), dok je nalaz negativan u slučajevima (d), (e) i (f) gdje je vidljiv samo ljevostrani „peak“. Dakle, nalaz MIC-a doksiciklina za testirani izolat iznosi 0,05 µg/ml (Izvor: Dessus-Babus S, Belloc F, Bébéar CM, Poutiers F, Lacombe F, Bébéar C, de Barbeyrac B. Antibiotic susceptibility testing for *Chlamydia trachomatis* using flow cytometry. *Cytometry* 1998; 31: 37-44.)



| Histogram | a | b | c | d | e | f (negative control) |
|----------------------------------|------|--------|-------|------|------|----------------------|
| doxycycline concentration (mg/l) | 0 | 0.0125 | 0.025 | 0.05 | 0.1 | 0 |
| % of positive cells | 21.5 | 21.2 | 21.3 | 1.9 | 1.6 | 0.6 |
| MFI | 53.5 | 26.1 | 9.22 | 3.84 | 3.79 | 3.89 |



2. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA

2.1. Obrazloženje teme

U Hrvatskoj do sada nije provedeno istraživanje antimikrobne osjetljivosti sojeva *C. trachomatis*, stoga nema podataka jesu li vrijednosti usporedive s drugim zemljama te ima li u općoj populaciji rezistentnih izolata. Kako je Hrvatska zemlja s visokom stopom propisivanja antibiotika (za azitromicin je prema nekim podacima ona najviša u Europi), ovakvo istraživanje je nužno kako bi se vidjelo može li takva praksa rezultirati smanjenom osjetljivošću ili rezistencijom klamidijskih sojeva.

Osim deskriptivne statistike koja je uobičajena za istraživanja MIC-ova i MCC-ova, formalnom statističkom analizom će se usporediti dobivene vrijednosti s obzirom na testirane antimikrobne lijekove. Također će se izvršiti usporedba s obzirom na vrstu kliničkog uzroka, tj. mjesta infekcije (obrisak vrata maternice, obrisak muške uretre i eksprimat prostate). Proučit će se korelacija dobivenih vrijednosti s već provedenim sličnim studijama u svijetu te radovima koji proučavaju klinički odgovor na standardne antimikrobne lijekove u bolesnika s klamidijskom infekcijom.

Izradom ove disertacije znanstvenoj zajednici će po prvi puta biti dostupni rezultati određivanja antimikrobne osjetljivosti urogenitalnih sojeva bakterije *C. trachomatis* izoliranih iz hrvatskih pacijenata. Rezultati ovog istraživanja mogli bi otkriti eventualnu prisutnost rezistentnih ili slabije osjetljivih sojeva, pomoći kod buduće izrade smjernica za liječenje klamidijske infekcije te služiti u procjeni učinkovitosti standardno propisivane terapije. Uspostavljena metodologija i dobiveni rezultati služit će kao podloga za buduća istraživanja.

2.2. Hipoteza

Hipoteze ovog istraživanja su:

1. Vrijednosti minimalnih inhibitornih koncentracija (MIC) i minimalnih klamicidnih koncentracija (MCC) testiranih urogenitalnih kliničkih izolata *C. trachomatis* izoliranih iz hrvatskih pacijenata na azitromicin, doksiciklin i levofloksacin neće prelaziti 4 µg/ml.
2. Mogući pronalazak sojeva otpornih na visoke koncentracije antibiotika (MIC i MCC > 4 µg/ml) pokazivat će obrazac „heterotipne rezistencije“.

2.3. Ciljevi istraživanja

2.3.1. Opći cilj

1. Određivanje MIC-ova i MCC-ova azitromicina, doksiciklina (antimikrobni lijekovi prvog izbora u liječenju klamidijske infekcije) i levofloksacina za urogenitalne sojeve bakterije *C. trachomatis* izolirane iz hrvatskih pacijenata

2.3.2. Specifični ciljevi

1. Međusobna usporedba dobivenih MIC-ova i MCC-ova s obzirom na testirani antimikrobni lijek
2. Međusobna usporedba dobivenih MIC-ova i MCC-ova s obzirom na vrstu kliničkog uzorka
3. Usporedba rezultata dobivenih *in vitro* s rezultatima dostupnih kliničkih studija o učinkovitosti antimikrobne terapije na pacijentima
4. Analiza učinkovitosti levofloksacina *in vitro* čija se šira oralna primjena kao jedinog registriranog antibiotika iz skupine fluorokinolona III generacije u Hrvatskoj tek očekuje
5. Potencijalni pronalazak „heterotipne rezistencije“ ili „homotipne rezistencije“ kod određenih klamidijskih sojeva
6. Uspostava metodologije i stvaranje baze antimikrobnog profila kliničkih klamidijskih izolata za daljnja uspoređivanja



3. MATERIJALI I METODE

3.1. Klinički uzorci

Klinički materijali za izolaciju klamidijских sojeva korišteni u ovom istraživanju su obrisци iz ženskog i muškog spolno-mokraćnog sustava (obrisak vrata maternice kod žena i uretre kod muškaraca) te eksprimat prostate. Obrisci vrata maternice oduzeti su u ginekološkoj ordinaciji i dopremljeni u laboratorij u specijalnom transportnom mediju za klamidije. Obrisci muške uretre oduzeti su u ambulantama Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo (HZJZ), na način da se sterilni dakronski bris uveo dva do četiri centimetra u uretru, zarotirao i ostavio nekoliko sekundi, nakon čega je pažljivo izvučen i umočen u transportni medij za klamidije. Eksprimati prostate zaprimljeni su iz Urološke ambulante Klinike za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“, također u transportnom mediju za klamidije. Svaki uzorak dopremljen ili oduzet na navedeni način dobio je svoj jedinstveni laboratorijski broj, te se do obrade čuvao u laboratoriju na +4 °C. Ako uzorci nisu mogli biti inokulirani unutar 24 sata, pohranjeni su na -70 °C do izvođenja postupka izolacije.

Sam transportni medij pripreman je na odsjeku za biokemiju, a sterilno rastočen u laboratoriju za klamidije HZJZ-a. Korišteno je saharoza-fosfatno transportno hranilište za klamidije (2SP), koje se priprema na način opisan u nastavku. U 300 ml deionizirane vode otopi se 2,01 g kalijevog dihidrogen fosfata (KH_2PO_4), 1,13 g natrijevog hidrogen fosfata (NaHPO_4) te 68,46 g šećera saharoze. Otopina se pomiješa i doda deionizirane vode do volumena od 1000 ml. pH vrijednost se prilagođava između 7,2 i 7,4. Zatim se dodaje organski pufer HEPES do koncentracije od 20 mM (20,0 ml od 1 M otopine na 1000 ml). Sterilizacija se provodi korištenjem filtera veličine pora od 0,2 μm , a zatim se sterilno dodaju antibiotici u odgovarajućim koncentracijama (gentamicin 25 $\mu\text{g/ml}$, vankomicin 100 $\mu\text{g/ml}$ i nistatin 25

U/ml). Tako pripremljen medij se rastače u staklene epruvete po 2 ml u zaštitnom kabinetu, pohranjuje na -20 °C do 6 mjeseci te otaplja neposredno pred upotrebu.

Osnovni sastojci za pripremu hranilišta za izolaciju klamidija, konkretno Eaglov minimalni esencijalni medij (MEM) i glukoza, također su pripremljeni na odsjeku za biokemiju. MEM, čiji je sastav prikazan na Tablici 3, se do upotrebe čuvao na +4 °C, a glukoza, fetalni serum i cikloheksimid na -20 °C. Neposredno prije postupka izolacije u MEM je potrebno dodati određeni postotak fetalnog seruma, glukoze i cikloheksimida, ovisno o tome želimo li dobiti pet ili deset postotno hranilište. Pet postotno hranilište zahtjeva dodatak 5 ml fetalnog seruma i 5 ml glukoze u 100 ml MEM-a za klamidije. Deset postotno hranilište zahtjeva dodatak 10 ml fetalnog seruma, 5 ml glukoze i 1 ml cikloheksimida u 100 ml MEM-a za klamidije. Fetalni serum se prije upotrebe inaktivirao na 56 °C tijekom 30 minuta kako bi se inaktivirale komponente komplementa.

Stanična linija korištena za izolaciju su McCoy stanice. Radi se o kontinuiranoj staničnoj kulturi fibroblasta adherentnog rasta, dobivenih iz domaćeg miša (*Mus musculus*). Navedeni fibroblasti sadrže strukturno abnormalni kromosomalni profil karakterističan za L-tip mišjih fibroblasta. Subkultivacija McCoy stanica vršila se na sljedeći način: uklanjanje medija, dodavanje 0,25-postotne otopine tripsin/versena na 1-2 minute, zatim uklanjanje tripsin/versena, čekanje da se stanice odvoje od podloge, dodavanje medija za rast, raspršivanje stanica te rastakanje u nove bočice. Omjer subkultivacije iznosio je od 1:2 do 1:4, a stanična linija se koristila do šezdesete pasaže.

Tablica 3. Sastav osnovnog Eaglovog minimalnog esencijalnog medija (MEM) korištenog u izolaciji klamidija i testiranju antimikrobne osjetljivosti

| Aminokiseline | Koncentracija (g/L) | Anorganske soli, vitamini i drugo | Koncentracija (g/L) |
|--------------------------------------|----------------------------|---|----------------------------|
| <i>L-Alanin</i> | 0,00890 | <i>CaCl₂ (anhidrirani)</i> | 0,20000 |
| <i>L-Arginin·HCl</i> | 0,12640 | <i>MgSO₄ (anhidrirani)</i> | 0,09767 |
| <i>L-Asparagin·H₂O</i> | 0,01500 | <i>KCl</i> | 0,40000 |
| <i>L-Aspartat</i> | 0,01330 | <i>NaHCO₃</i> | 1,50000 |
| <i>L-Cistin·2HCl</i> | 0,03120 | <i>NaCl</i> | 6,80000 |
| <i>L-Glutamat</i> | 0,01470 | <i>NaH₂PO₄·H₂O</i> | 0,14000 |
| <i>L-Glutamin</i> | 0,29200 | <i>Kolin klorid</i> | 0,00100 |
| <i>Glicin</i> | 0,00750 | <i>Folna kiselina</i> | 0,00100 |
| <i>L-Histidin·HCl·H₂O</i> | 0,04190 | <i>Mioinozitol</i> | 0,00200 |
| <i>L-Izoleucin</i> | 0,05250 | <i>Nikotinamid</i> | 0,00100 |
| <i>L-Leucin</i> | 0,05250 | <i>D-Pantotenska kis.</i> | 0,00100 |
| <i>L-Lizin·HCl</i> | 0,07250 | <i>Piridoksin·HCl</i> | 0,00100 |
| <i>L-Metionin</i> | 0,01500 | <i>Riboflavin</i> | 0,00010 |
| <i>L-Fenialanin</i> | 0,03250 | <i>Tiamin·HCl</i> | 0,00100 |
| <i>L-Prolin</i> | 0,01150 | <i>D-Glukoza</i> | 1,00000 |
| <i>L-Serin</i> | 0,01050 | <i>Fenol crveno</i> | 0,01000 |
| <i>L-Treonin</i> | 0,04760 | <i>Natrijev piruvat</i> | 0,11000 |
| <i>L-Triptofan</i> | 0,01000 | | |
| <i>L-Tirozin·2Na·2H₂O</i> | 0,05190 | | |
| <i>L-Valin</i> | 0,04680 | | |

3.2. Izolacija u staničnoj kulturi

C. trachomatis je bakterija koja pripada u uzročnike drugog stupnja biosigurnosti (BSL-2). Zbog toga je za izolaciju i rad s klamidijskim sojevima korištena zaštitna odjeća uz zaštitne rukavice koje su mijenjane prilikom svakog novog koraka, a svi postupci rađeni su u kabinetu biosigurnosnog stupnja 2.

Stanice za izolaciju pripremane su tako da se suspenzija stanica McCoy rastakala po 1 ml u epruvete sa stakalcima i ravnim dnom. Slijedio je period umnožavanja u termostatu na 37 °C tijekom 48 sati, sve dok nisu izrasle u jedan sloj. Neposredno prije inokulacije materijala mikroskopski se provjeravao izgled stanica, a epruvete su označene sukladno laboratorijskim brojevima dobivenim prilikom urudžbiranja zaprimljenih materijala.

Sljedeći korak bila je obrada materijala. U epruvete sa staklenim kuglicama dodano je 1 ml pet postotnog hranilišta, uz odstranjivanje plutenih čepova. Prije rastakanja hranilišta u epruvete ili začepeljivanja svaka epruveta spaljena je nad plamenikom. Brisevi su dobro ocijedeni o stijenku epruvete, a zatim se u obrađene uzorke dodalo 1 ml pet postotnog hranilišta sa staklenim kuglicama, nakon čega su svi materijali dobro promiješani na tresalici (najmanje 30 sekundi).

Prije same inokulacije označene epruvete su odčepljene, spaljene, čepovi su složeni u sterilnu Petrijevu ploču, a hranilište izliveno u odljevnu čašu. Tada su se obrađeni uzorci inokulirali sterilnim pipetama (na način da je za svaki uzorak korištena nova pipeta) po 1 ml s desna na lijevo. Inokulirane epruvete zatvorene su sterilnim plutenim čepovima, a zatim posložene u nastavke za centrifugu. Nakon tariranja na vazi centrifugirane su 1 sat na 3000 rpm i

temperaturi od 36 °C. Po završetku centrifugiranja epruvete su vraćene na stalak i ostavljene u termostatu na 36 °C kroz 2 sata. Nakon 2 sata iz epruveta se odstranio inokulum u sterilnu odlijevnu čašu te se zamijenio deset postotnim hranilištem s cikloheksimidom. Nakon toga su epruvete zatvorene gumenim čepovima i vraćene u termostat (36 °C), gdje su stajale 72 sata.

Po završetku 72-satne inkubacije iz epruveta sa stanicama hranilište se odstranilo u odlijevnu čašu te se započelo s postupkom fiksacije. Metanol-pipetom se dodao metanol (Carlo Erba Reagenti), koji se inače čuva u hladnjaku na +4 °C. Metanol je dodan u količini dovoljnoj da se pokrije sloj stanica (1 ml po epruveti). Stanice su potom fiksirane na sobnoj temperaturi (23 °C ± 3 °C) kroz 10 minuta. Metanol se zatim aspirirao iz svake epruvete, nakon čega se odmah moglo pristupiti bojenju.

Postupak bojenja vršen je monoklonskim protutijelima Chlamydia Culture Confirmation System (Pathfinder, BIO-RAD) specifičnim za rod (anti-LPS protutijela) i obilježenim fluoresceinom. Prije postupka bojenja protutijela su izvađena iz hladnjaka (gdje se čuvaju na +4 °C) kako bi se ugrijala na sobnu temperaturu. U svaku epruvetu sa stakalcem i stanicama dodano je 2 kapljice, tj. 60 µL navedenih monoklonskih protutijela, koja su potpuno prekrila sloj stanica. Epruvete sa stanicama i staklom premještene su u vlažnu komoru, gdje su se zaštićene od svjetla inkubirale na sobnoj temperaturi (23 °C ± 3 °C) kroz 30 minuta.

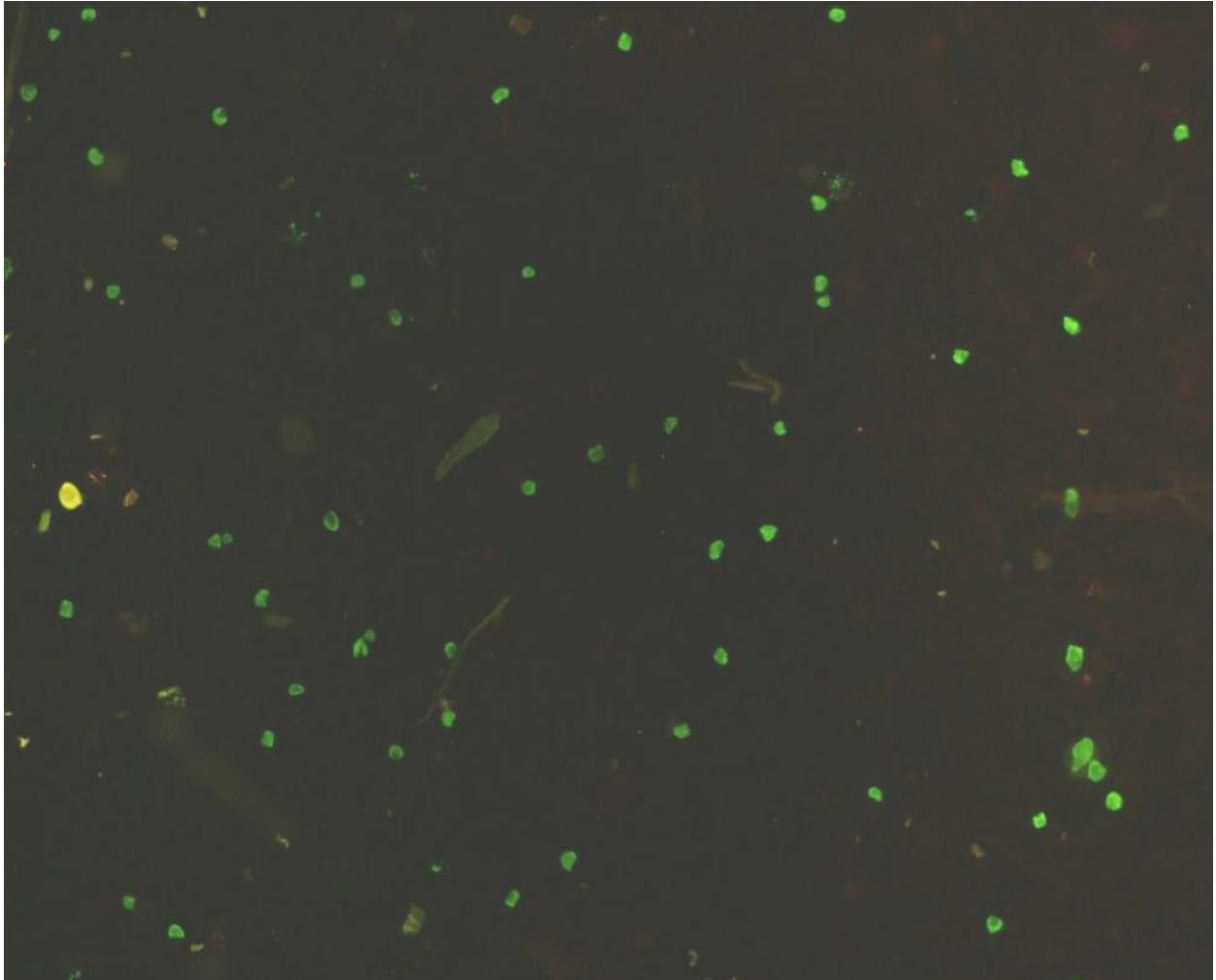
Nakon 30 minuta u svaku epruvetu je dodana deionizirana voda kako bi se isprala protutijela koja se nisu vezala tijekom razdoblja inkubacije, a ista se izvlačila 10-20 sekundi kasnije pomoću pipete. Zatim su stakalca sa stanicama pažljivo izvučena pincetom, lagano osušena na upijajućem papiru te odmah uklopljena. Na prethodno označeno predmetno stakalce stavljena je jedna kap medija za uklapanje (LIGHT DIAGNOSTICS Mounting Fluid – Millipore), a

zatim je na taj medij dodano stakalce sa stanicama koje moraju biti okrenute prema mediju. Tako pripremljeni preparati očitani su unutar 24 sata, a do očitavanja poslagani u kartonsku mapu kako bi se zaštitili od svjetla te čuvani u hladnjaku na +4 °C.

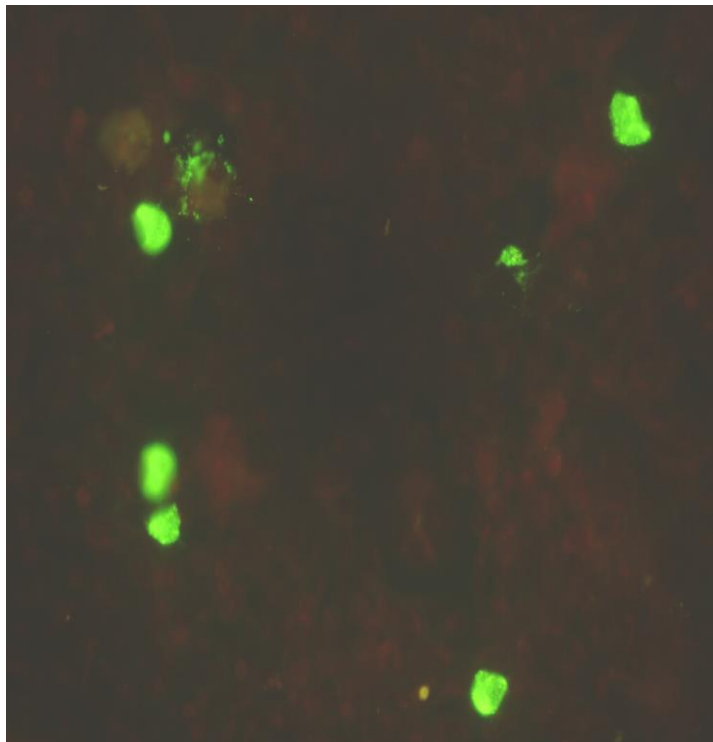
Posljednji korak bio je dokaz klamidijske infekcije. Sva uklopljena stakalca pretražena su na klamidijske inkluzije fluorescentnim mikroskopom koristeći najmanje povećanje od 100x (po potrebi je korišteno i povećanje od 400x). U slučaju infekcije stanica klamidijama bila je vidljiva prisutnost žarko zelenih inkluzija unutar stanica, do čega dolazi uslijed vezanja monoklonskih protutijela za uzročnika. Inkluzije izgledaju kao dobro definirane, fluorescentno zelene tvorbe smještene u citoplazmi inficiranih stanica blizu jezgre (Slika 8-10). Nespecifično bojanje je žute, bijele ili tamnozelene boje (vidljivo na slici 8), dok su nezaražene stanice, kao i pozadina zaraženih stanica, crvenog kolorita (navedeni kontrast najuočljiviji je na slici 9).

Dokaz jedne ili više specifičnih klamidijskih inkluzija smatra se pozitivnim nalazom. Svi pozitivni uzorci pohranjeni su na -70 °C i čine banku klamidijskih sojeva Odsjeka za klamidije Službe za mikrobiologiju HZJZ-a.

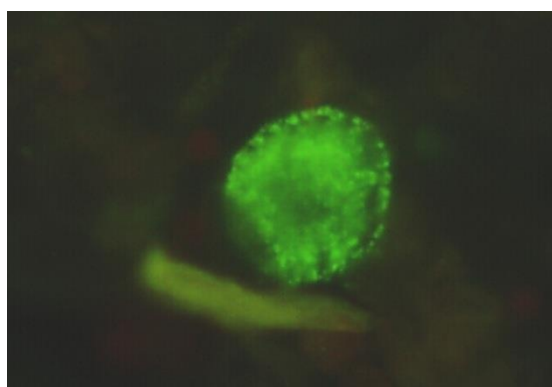
Slika 8. Inkluzije *C. trachomatis* u staničnoj kulturi McCoy stanica prikazane pomoću monoklonskih protutijela uz povećanje od 100x (Izvor: Odsjek za klamidije, Služba za mikrobiologiju, HZJZ)



Slika 9. Inkluzije *C. trachomatis* u staničnoj kulturi McCoy stanica prikazane pomoću monoklonskih protutijela uz povećanje od 400x (Izvor: Odsjek za klamidije, Služba za mikrobiologiju, HZJZ)



Slika 10. Uvećani prikaz odabrane inkluzije *C. trachomatis* u staničnoj kulturi McCoy stanica obojane monoklonskim protutijelima (Izvor: Odsjek za klamidije, Služba za mikrobiologiju, HZJZ)



3.3. Priprema za testiranje antimikrobne osjetljivosti

Od kliničkih sojeva *C. trachomatis* izoliranih u staničnoj kulturi na prethodno opisan način, pomoću tablice slučajnih brojeva za testiranje je odabrano ukupno 40 izolata izoliranih 2010., 2011. i 2012. godine. Od ukupnog broja odabrana su 23 soja izolirana iz obrisaka vrata maternice, 16 sojeva izoliranih iz obrisaka uretre, te jedan soj izoliran iz ekspirata prostate. Također su, sukladno rezultatima istraživanja o distribuciji pojedinih serotipova na području sjevernoistočne Hrvatske (37), kao referentni sojevi odabrani serotip E BOUR te serotip F ICCal, izolirani 1998. godine. Referentne sojeve ustupio je prof. dr. sc. Julius Schachter, voditelj Laboratorija za istraživanje klamidija Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Kaliforniji u gradu San Francisco (UCSF). Istraživanje je dobilo odobrenje Etičkog povjerenstva HZJZ-a.

Prije pristupanja izradi antibiograma izolirane sojeve *C. trachomatis* potrebno je umnožiti u svrhu postizanja dostatne količine za sva tri testirana antibiotika te veličine inokuluma 5 000 – 10 000 IFU po jažici mikrotitarske pločice. Svaki od izolata odabranih za testiranje umnožen je višestrukim pasažama tako da inficira barem 50% stanica. Zbog dugotrajnog biološkog ciklusa (48-72 sata) i velikog broja pasaža kojima se podvrgavaju izolati, prosječni vremenski period umnožavanja svakog soja iznosio je pet tjedana.

Antimikrobni lijekovi korišteni u ovom istraživanju su azitromicin, doksiciklin i levofloksacin. Azitromicin i doksiciklin ustupila je tvrtka PLIVA HRVATSKA d.o.o. (Zagreb, Hrvatska), a levofloksacin je kupljen od tvrtke Sigma-Aldrich Co. LLC (St. Louis, Missouri, SAD). Svaki antimikrobni lijek prvotno u obliku praška pripremljen je kao izvorna otopina (engl. *stock solution*) u koncentraciji od 1024 µg/ml, sukladno njegovoj potenciji, te rastočen u epruvete

po 1 ml. Tako pripravljene otopine čuvane su na temperaturi od -70 °C kroz maksimalno dva tjedna, nakon čega se postupak ponavlja.

Potencije svakog lijeka izračunate su prema čistoći pripravka određenoj HPLC-om, izmjerenoj količini vode te aktivnoj frakciji, sukladno opsežnoj specifikaciji koju je ustupio proizvođač lijeka. Za azitromicin je potencija iznosila 940,9 µg/mg, za doksiciklin 863,4 µg/mg, a za levofloksacin 968,1 µg/mg. Na primjeru azitromicina prikazana je specifikacija pripravka (Tablica 4,5) i izračun potencije (Izračun 1).

Suspenzija stanica McCoy za testiranje pripravljena je u čistom MEM-u s deset postotnim fetalnim serumom, bez dodatka ikakvih antibiotika i bez cikloheksimida. Suspenzija je potom rastočena u mikrotitarsku pločicu koja sadrži 96 jažica s ravnim dnom, tako da se u svakoj jažici nalazila količina od 100 µl (Slika 11). Stanice su umnožavane u termostatu na 37 °C tijekom 24-48 sati dok nisu izrasle u jedan sloj. Neposredno prije inokulacije materijala mikroskopski se provjeravao izgled stanica kako bi se procijenila adekvatnost rasta te isključila eventualna prisutnost infekcije.

Netom prije testiranja antimikrobne osjetljivosti pripravljena je radna lista na obrascu za mikrotitarsku pločicu. S lijeve strane upisan je broj soja koji se testira i na koje redove se odnosi, a razrjeđenja antimikrobnog lijeka koji će se dodati na vrh stupca, s time da je prva jažica ostavljena kao kontrola soja bez dodatka antibiotika. Za svaki soj je planirano korištenje razrjeđenja u rasponu od 0,008 do 8 µg/ml. U slučaju identifikacije rezistentnijih sojeva radila bi se nova radna lista, a testiranje takvih sojeva bi se ponavljalo s nižim razrjeđenjima antimikrobnog lijeka.

Tablica 4. Specifikacija za prašak azitromicina u obliku azitromicin dihidrata - šifra materijala: 8000192, 80009220, 80009740, SDIR000767/6 (Izvor: PLIVA HRVATSKA d.o.o., Zagreb)

| PARAMETAR | ZAHTJEV | METODA | SAP WORK CENTAR | KOLIČINA UZORKA |
|---|-----------------------------------|------------------|-----------------|------------------|
| IZGLED | bijeli do skoro bijeli liofilizat | GMP000009 | | |
| BISTRINA OTOPINE | bistra otopina | MPC003965 | QOSFFERT | 40 bočica |
| BOJA OTOPINE | bezbojna otopina | | | |
| STRANE ČESTICE: | | | | |
| Vidljive | Praktički ne sadržava | | | |
| Subvidljive | Po bočici: | | | |
| ≥ 10 μm | najviše 6000 | | | |
| ≥ 25 μm | najviše 600 | | | |
| SREDNJA MASA | 1050 mg | | | |
| VARIRANJE MASA | ± 5% | | | |
| PH VRIJEDNOST | 6,2 – 6,8 | | | |
| VODA (Karl Fischer) | najviše 3,0% | MPC002832 | QSAELEKT | 3 bočice |
| IDENTIFIKACIJA | odgovara standardu | MPC004549 | QSAHPLC | 29 bočica |
| SADRŽAJ AZITROMICINA | 500,0 – 550,0 mg | | | |
| UJEDNAČENOST DOZIRNIH JEDINICA Ujednačenost sadržaja | odgovara zahtjevu Ph.Eur. 2.9.40. | | | |

| | | | | |
|---|-----------------------------------|------------------|-----------------|---|
| ONEČIŠĆENJA (HPLC): | | | | |
| Onečišćenje F | najviše 0,5 % | | | |
| Onečišćenje I | najviše 0,7 % | | | |
| Onečišćenje B | najviše 1,0 % | | | |
| Onečišćenje J + | | | | |
| Onečišćenje D | najviše 0,5 % | | | |
| Onečišćenje E | najviše 0,5 % | MPC006079 | QSAHPLC | 29 bočica |
| Onečišćenje M | najviše 0,5 % | | | |
| Onečišćenje N | najviše 0,5 % | | | |
| Pojedinačno nespecificirano onečišćenje | najviše 0,2 % | | | |
| Ukupna onečišćenja | najviše 3,0 % | | | |
| STERILNOST | injekcije moraju biti sterilne | MMA000132 | QSAMIKR1 | 20 bočica |
| BAKTERIJSKI ENDOTOKSINI | najviše 0,35 EU / mg | MBA000171 | QSAFARM | Bočice: 2 početak 2 sredina 2 kraj |

Tablica 5. Sastav onečišćenja za prašak azitromicina u obliku azitromicin dihidrata: dio prateće specifikacije ustupljenog lijeka (Izvor: PLIVA HRVATSKA d.o.o., Zagreb)

| | |
|----------------------|---|
| Onečišćenje F | (3'-N-demetil-3'-N-formilazitromicin) |
| Onečišćenje I | 3'-N-demetilazitromicin |
| Onečišćenje B | Azitromicin B |
| Onečišćenje J | 13-O-dekladinofilazitromicin |
| Onečišćenje D | Azitromicin F |
| Onečišćenje E | Aminoazitromicin |
| Onečišćenje M | 3'-(N,N-didemetil)-3'-N-formilazitromicin |
| Onečišćenje N | 3'-de(dimetilamino)-3'-oksoazitromicin |

Slika 11. Mikrotitarska pločica za testiranje antimikrobne osjetljivosti klamidijских sojeva sa suspenzijom McCoy stanica (Izvor: Odsjek za klamidije, Služba za mikrobiologiju, HZJZ)



Izračun 1. Izračun potencije antimikrobnog lijeka za potrebe pripravljanja izvorne otopine na primjeru azitromicina (Izvor formula: CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard - Ninth Edition. CLSI document M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.)

Azitromicin dihidrat

Podaci iz specifikacije:

Ukupna onečišćenja (HPLC): najviše 3% (iz čega proizlazi čistoća pripravka od 97%)

Sadržaj vode: najviše 3% (po Karl-Fischerovoj metodi)

Aktivna frakcija: 100% (sadržaj azitromicina)

Potencija = (čistoća pripravka) * (aktivna frakcija) * (1 – sadržaj vode)

Potencija = (970) * (1.0) * (1 – 0.03)

Potencija = 940,9 µg/mg

Težina (mg) = volumen * koncentracija / potencija

Težina (mg) = 100 ml * 1024 µg/ml / 940,9 µg/mg

Težina (mg) = 109 mg

Dakle, za 100 ml pripravka izvorne otopine početne koncentracije 1024 µg/ml potrebno je preciznom vagom odvagnuti i otopiti 109 mg praška azitromicina.

3.4. Izrada antibiograma i određivanje koncentracijskih vrijednosti

Prilikom svakog testiranja istovremeno su rađene dvije mikrotitarske pločice: jedna u kojoj se određivao MIC i druga u kojoj se određivao MCC. Potonja je nakon inkubacije od 72 sata smrznuta na $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, nakon čega je rađena pasaža za svako razrjeđenje antibiotika na novu pločicu s hranilištem bez antibiotika. Pločice su označene datumom, brojem prema radnoj listi te ovisno o tome testira li se MIC ili MCC.

Hranilište je iz mikrotitarskih pločica aspirirano multikanalnom pipetom i odbačeno. Sojevi umnoženi na prethodno opisan način su prema radnoj listi dodani u jažice (svaki s drugim nastavkom) u količini od $100\text{ }\mu\text{l}$. Mikrotitarske pločice su zatim poklopljene, posložene u nastavke za centrifugu i tarirane na vazi. Centrifugirane su 1 sat na 3000 rpm i temperaturi od $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Rotina 380R Hettich Zentrifugen). Nakon centrifugiranja pločice su odmah premještene u termostat na $36\text{ }^{\circ}\text{C}$ uz $3,9\%$ CO_2 (Napco Model 5410), gdje su inkubirane tijekom 2 sata.

Za to vrijeme pripremljena su razrjeđenja antibiotika u 10% -tnom hranilištu s cikloheksimidom. Prethodno pripravljena i rastočena izvorna otopina antibiotika serijski je razrijeđena u MEM-u s cikloheksimidom od početne koncentracije $1024\text{ }\mu\text{g/ml}$ do $0,008\text{ }\mu\text{g/ml}$. Nakon što su po završetku dvosatne inkubacije pločice izvađene iz termostata, a hranilište aspirirano multikanalnom pipetom i odbačeno, u svaki stupac su (prema radnoj listi) dodana razrjeđenja antibiotika po $100\text{ }\mu\text{l}$. Za svako razrjeđenje korišteni su drugi pipetni nastavci. U prvu se jažicu, koja je služila kao kontrola soja, dodao MEM s cikloheksimidom bez antibiotika; zatim je slijedilo dodavanje razrjeđenja u rasponu od $0,008$ do $8\text{ }\mu\text{l}$.

Nakon dodavanja antibiotika mikrotitarske pločice su poklopljene i vraćene u termostat na 36 °C uz 3,9% CO₂ (Napco Model 5410), gdje su stajale 72 sata.

Nakon 72 sata pločica označena s MIC je podvrgnuta postupku fiksacije, dok je pločica označena MCC pohranjena na -70 °C. Iz pločice je aspirirano hranilište multikanalnom pipetom (s desna na lijevo, tj. od najmanjeg razrjeđenja prema najvećem) te je dodan metanol (Carlo Erba Reagenti) po 100 µl. Nakon 10 minuta metanol je aspiriran i u svaku jažicu je dodana jedna kap monoklonskih protutijela Chlamydia Culture Confirmation System (Pathfinder, BIO-RAD) obilježenih fluoresceinom. Pločice su zatim premještene u vlažnu komoru, gdje su se zaštićene od svjetla inkubirale na sobnoj temperaturi (23 °C ± 3 °C) kroz 30 minuta.

Po završetku inkubacije ispiranje je provedeno dva puta, na način da je jažice dodano po 100 µl deionizirane vode, nakon čega se ona odlije, a pločica osuši na papirnatom ručniku. Zatim je svaka jažica uklopljena jednom kapi glicerola (LIGHT DIAGNOSTICS Mounting Fluid – Millipore) kako bi pločica bila spremna za određivanje antimikrobne osjetljivosti uz pomoć invertnog fluorescentnog mikroskopa (Olympus IX51[®]) (Slika 5).

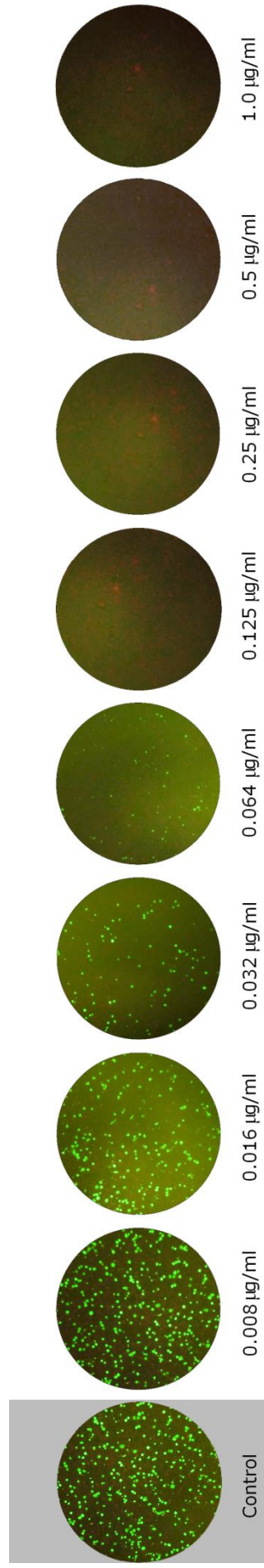
Jednakom metodološkom postupku u drugom navratu podliježe i pločica označena s MCC, uz razliku da se za svako razrjeđenje antimikrobnog lijeka radi pasaža na novu pločicu s hranilištem bez istog. Nadalje, za određivanje MCC-a se, nakon centrifugiranja i dvosatne inkubacije, umjesto razrjeđenja antimikrobnih lijekova u sve jažice ukapava MEM s cikloheksimidom bez antibiotika. Na ovaj način kompletno testiranje svakog soja (dakle, kako bi se dobio i MIC i MCC za određeni antimikrobni lijek) traje dva tjedna.

MIC je mikroskopski određen kao najmanja koncentracija antibiotika bez vidljivih inkluzija, a iznosi jedno razrjeđenje više od MIC_{TP} , dakle od koncentracije antibiotika kod koje dolazi do promjene u broju i morfologiji inkluzija (Slika 6). MCC je koncentracija antibiotika kod koje nije bilo vidljivih inkluzija nakon pasaže soja iz stanične kulture s dodatkom antibiotika na staničnu kulturu bez antibiotika.

Slika 12. Invertni fluorosecentni mikroskop Olympus IX51[®] (Izvor: Odjel za znanstvena istraživanja, Klinika za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“)



Slika 13. Sekvencijska fotomikrografija koja pokazuje obrazac rasta i određivanje MIC-a za soj *C. trachomatis* izoliran iz obriska muške uretre (Tablica 8, Izolat broj 1) u prisustvu rastućih koncentracija azitromicina. Na koncentraciji 0,064 µg/ml vidljiv je MIC_{TP}, prijelazna točka gdje koncentracija antimikrobnog lijeka prvi puta značajno utječe na klamidijske inkluzije; MIC je stoga određen kao jedno dvostruko razrijeđenje više (0,125 µg/ml) kao najniža koncentracija bez vidljivih inkluzija (Izvor: Odsjek za klamidije, Služba za mikrobiologiju, HZJZ. Objavljeno u: Ljubin-Sternak S, Meštrović T, Vilibić-Čavlek T, Mlinarić-Galinović G, Sviben M, Markotić A, Škerk V. *In vitro* susceptibility of urogenital *Chlamydia trachomatis* strains in a country with high azithromycin consumption rate. Folia Microbiol (Praha) 2013; 58: 361-5.)



3.5. Statistička analiza i prikaz podataka

Dobivene vrijednosti MIC-ova i MCC-ova inicijalno su obrađene deskriptivnom statistikom. Koncentracijskim rasponom prikazana je razlika između najmanje i najveće koncentracije za svaki antimikrobni lijek. MIC₅₀ predstavlja onu koncentraciju koja inhibira rast ili djeluje klamicidno na 50%, tj. polovinu testiranih klamidijjskih izolata. Ta vrijednost ne predstavlja koncentraciju antibiotika kojom se smanjuje broj inkluzija za 50% niti je oznaka za srednju vrijednost MIC-ova, već se tumači kao medijan ili centralna vrijednost. MIC₉₀ predstavlja onu koncentraciju koja inhibira rast ili djeluje klamicidno na 90% testiranih klamidijjskih izolata. Postotni udio MIC-ova i MCC-ova za pojedini antimikrobni lijek prikazan je kružnim dijagramima.

Usporedba učinkovitosti testiranih antimikrobnih lijekova provedena je eksplorativnom analizom pomoću histograma, točkastih piktograma i dijagrama rasipanja te formalnom statističkom analizom. S obzirom na diskretnu narav podataka, u formalnoj statističkoj analizi korišten je neparametrijski Kruskal-Wallisov test, post-hoc analiza višestruke usporedbe i Spearmanov korelacijski test.

Usporedba dobivenih koncentracija ovisno o vrsti kliničkog uzorka provedena je eksplorativnom analizom pomoću histograma, violinskih dijagrama i dijagrama paralelnih koordinata te formalnom statističkom analizom. U formalnom statističkom uspoređivanju briseva vrata maternice, briseva muške uretre zajedno s eksprimatom prostate te referentnih sojeva korišten je neparametrijski Kruskal-Wallisov test i post-hoc analiza višestruke usporedbe. Brisevi vrata maternice i brisevi muške uretre zajedno s eksprimatom prostate uspoređeni su i Mann-Whitneyevim U-testom ili testom sume rangova.

Statistička analiza i najveći dio grafičkog prikaza podataka proveden je korištenjem programa R version 3.0.0. (Masked Marvel), Copyright (C) 2013 The R Foundation for Statistical Computing, platform: x86_64-w64-mingw32/x64 (64-bit). Dijagram rasipanja i prikaz MIC-ova i MCC-ova izrađeni su korištenjem programa JMP[®] Pro 10.0.0 64-bit. Kružni dijagrami izrađeni su korištenjem programa Microsoft Excel 2010 Version: 14.0.6129.5000 (64-bit).



4. REZULTATI

4.1. Deskriptivna analiza rezultata

Testiranje antimikrobne osjetljivosti provedeno je na 40 kliničkih izolata *C. trachomatis* (23 iz obrisaka vrata maternice, 16 iz obrisaka muške uretre te 1 iz eksprimata prostate) izoliranih u rasponu od tri godine, kao i na 2 referentna soja (serovar E Bour i serovar F ICCal). Svi ispitivani sojevi bili su osjetljivi na azitromicin, doksiciklin i levofloksacin. Vrijednost MIC-a za sve sojeve u slučaju azitromicina i doksiciklina nije prelazila 0,125 µg/ml, a u slučaju levofloksacina 1,0 µg/ml. Vrijednost MCC-a za sve sojeve u slučaju doksiciklina nije prelazila 1,0 µg/ml, a u slučaju azitromicina i levofloksacina 2,0 µg/ml. Obrazac „homotipne“ ili „heterotipne rezistencije“ nije pronađen kod niti jednog testiranog soja.

Promatrajući antimikrobnu osjetljivost svih izolata zajedno, najmanji raspon pokazuju MIC-ovi za azitromicin (0,064 – 0,125 µg/ml), dok su najvećeg raspona MCC-ovi za azitromicin i doksiciklin (0,064 – 2,0 µg/ml, tj. 0,032 – 1,0 µg/ml) (Tablica 11). Vrijednosti MCC-ova bile su jednake vrijednostima MIC-ova, ili su bile više u rasponu od jednog do pet razrjeđenja. Vrijednosti MCC-ova oba referentna soja bile su više od vrijednosti MIC-ova za jedno razrjeđenje u slučaju sva tri testirana antimikrobna lijeka (Tablica 12).

Detaljan deskriptivni prikaz rezultata svih ispitanih sojeva prikazan je u nastavku (Tablica 6-12, Slika 14-31). S obzirom na samo jedan izolat iz eksprimata prostate (Tablica 9), u daljnjoj je analizi grupiran zajedno s izolatima iz obrisaka muške uretre.

Tablica 6. Minimalne inhibitorne i minimalne klamicidne koncentracije klamidijskih sojeva izoliranih iz obrisaka vrata maternice

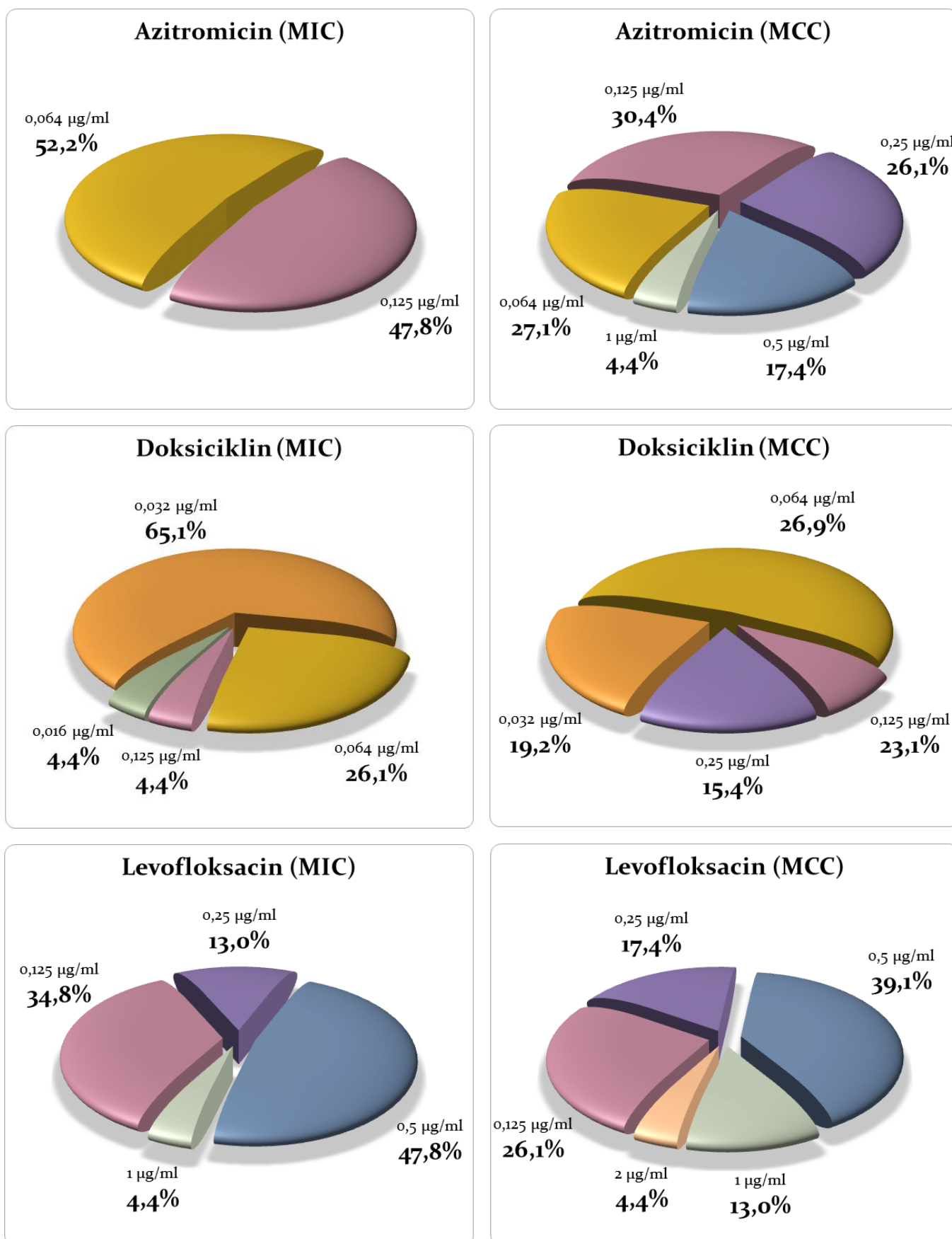
| Godina izolacije | Uzorak: bris vrata maternice | <i>Azitromicin</i> | | <i>Doksiciklin</i> | | <i>Levofloksacin</i> | |
|------------------|------------------------------|--------------------|-------------|--------------------|-------------|----------------------|-------------|
| | | MIC (µg/ml) | MCC (µg/ml) | MIC (µg/ml) | MCC (µg/ml) | MIC (µg/ml) | MCC (µg/ml) |
| 2010. | Izolat broj 1 | 0,064 | 0,25 | 0,032 | 0,064 | 0,125 | 0,125 |
| 2010. | Izolat broj 2 | 0,064 | 0,5 | 0,064 | 0,25 | 0,5 | 1,0 |
| 2010. | Izolat broj 3 | 0,125 | 1,0 | 0,064 | 0,25 | 0,5 | 1,0 |
| 2010. | Izolat broj 4 | 0,125 | 0,25 | 0,032 | 0,032 | 0,125 | 0,125 |
| 2010. | Izolat broj 5 | 0,064 | 0,5 | 0,032 | 0,064 | 0,125 | 0,25 |
| 2010. | Izolat broj 6 | 0,125 | 0,125 | 0,032 | 0,064 | 0,5 | 1,0 |
| 2010. | Izolat broj 7 | 0,064 | 0,125 | 0,032 | 0,032 | 0,5 | 0,5 |
| 2010. | Izolat broj 8 | 0,125 | 0,25 | 0,032 | 0,032 | 0,125 | 0,125 |
| 2010. | Izolat broj 9 | 0,125 | 0,5 | 0,064 | 0,064 | 1,0 | 2,0 |
| 2010. | Izolat broj 10 | 0,125 | 0,5 | 0,016 | 0,032 | 0,125 | 0,125 |
| 2010. | Izolat broj 11 | 0,125 | 0,125 | 0,032 | 0,25 | 0,25 | 0,5 |
| 2010. | Izolat broj 12 | 0,125 | 0,125 | 0,032 | 0,032 | 0,5 | 0,5 |
| 2010. | Izolat broj 13 | 0,064 | 0,125 | 0,032 | 0,064 | 0,25 | 0,25 |
| 2010. | Izolat broj 14 | 0,064 | 0,064 | 0,032 | 0,064 | 0,5 | 0,5 |
| 2010. | Izolat broj 15 | 0,125 | 0,25 | 0,064 | 0,125 | 0,25 | 0,25 |
| 2011. | Izolat broj 16 | 0,125 | 0,25 | 0,064 | 0,125 | 0,5 | 0,5 |
| 2011. | Izolat broj 17 | 0,064 | 0,064 | 0,032 | 0,064 | 0,5 | 0,5 |
| 2011. | Izolat broj 18 | 0,064 | 0,064 | 0,125 | 0,25 | 0,5 | 0,5 |

| | | | | | | | |
|--------------|----------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| 2011. | Izolat broj 19 | 0,064 | 0,125 | 0,032 | 0,064 | 0,5 | 0,5 |
| 2011. | Izolat broj 20 | 0,064 | 0,064 | 0,032 | 0,064 | 0,125 | 0,25 |
| 2011. | Izolat broj 21 | 0,064 | 0,25 | 0,064 | 0,064 | 0,5 | 0,5 |
| 2012. | Izolat broj 22 | 0,064 | 0,064 | 0,032 | 0,064 | 0,125 | 0,125 |
| 2012. | Izolat broj 23 | 0,125 | 0,125 | 0,032 | 0,064 | 0,125 | 0,125 |

Tablica 7. Deskriptivna statistička analiza antimikrobne osjetljivosti sojeva izoliranih iz obrisaka vrata maternice (ukupno 23 uzorka)

| Antibiotik | MIC – raspon | MCC – raspon | MIC₅₀ | MCC₅₀ | MIC₉₀ | MCC₉₀ |
|----------------------|----------------------|---------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| <i>Azitromicin</i> | 0,064 - 0,125 | 0,064 - 1,0 | 0,064 | 0,125 | 0,125 | 1,0 |
| <i>Doksiciklin</i> | 0,016 - 0,125 | 0,032 – 0,25 | 0,032 | 0,064 | 0,064 | 0,25 |
| <i>Levofloksacin</i> | 0,125 - 1,0 | 0,125 - 2,0 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 1,0 |

Slika 14-19. Postotni udio minimalnih inhibitornih i minimalnih klamicidnih koncentracija klamidijskih sojeva izoliranih iz obrisaka vrata maternice



Tablica 8. Minimalne inhibitorne i minimalne klamicidne koncentracije klamidijskih sojeva izoliranih iz obrisaka muške uretre

| Godina izolacije | Uzorak: bris uretre | <i>Azitromicin</i> | | <i>Doksiciklin</i> | | <i>Levofloksacin</i> | |
|------------------|---------------------|--------------------|-------------|--------------------|-------------|----------------------|-------------|
| | | MIC (µg/ml) | MCC (µg/ml) | MIC (µg/ml) | MCC (µg/ml) | MIC (µg/ml) | MCC (µg/ml) |
| 2010. | Izolat broj 1 | 0,125 | 0,125 | 0,016 | 0,032 | 0,125 | 0,5 |
| 2010. | Izolat broj 2 | 0,125 | 2,0 | 0,032 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| 2010. | Izolat broj 3 | 0,125 | 1,0 | 0,032 | 0,064 | 1,0 | 1,0 |
| 2010. | Izolat broj 4 | 0,064 | 0,125 | 0,032 | 0,064 | 0,125 | 0,25 |
| 2010. | Izolat broj 5 | 0,125 | 1,0 | 0,064 | 0,064 | 1,0 | 1,0 |
| 2010. | Izolat broj 6 | 0,125 | 1,0 | 0,032 | 0,064 | 1,0 | 1,0 |
| 2010. | Izolat broj 7 | 0,064 | 0,125 | 0,032 | 0,125 | 0,25 | 0,25 |
| 2010. | Izolat broj 8 | 0,064 | 0,064 | 0,064 | 0,125 | 0,125 | 0,5 |
| 2010. | Izolat broj 9 | 0,064 | 0,125 | 0,016 | 0,032 | 0,125 | 0,25 |
| 2011. | Izolat broj 10 | 0,064 | 0,125 | 0,032 | 0,064 | 0,5 | 1,0 |
| 2011. | Izolat broj 11 | 0,064 | 0,064 | 0,016 | 0,032 | 0,5 | 0,5 |
| 2012. | Izolat broj 12 | 0,064 | 0,064 | 0,032 | 0,032 | 0,25 | 0,25 |
| 2012. | Izolat broj 13 | 0,125 | 0,125 | 0,032 | 0,064 | 0,25 | 0,5 |
| 2012. | Izolat broj 14 | 0,064 | 0,125 | 0,032 | 0,064 | 0,5 | 0,5 |
| 2012. | Izolat broj 15 | 0,125 | 0,25 | 0,016 | 0,064 | 0,5 | 1,0 |
| 2012. | Izolat broj 16 | 0,125 | 1,0 | 0,016 | 0,032 | 0,25 | 0,5 |

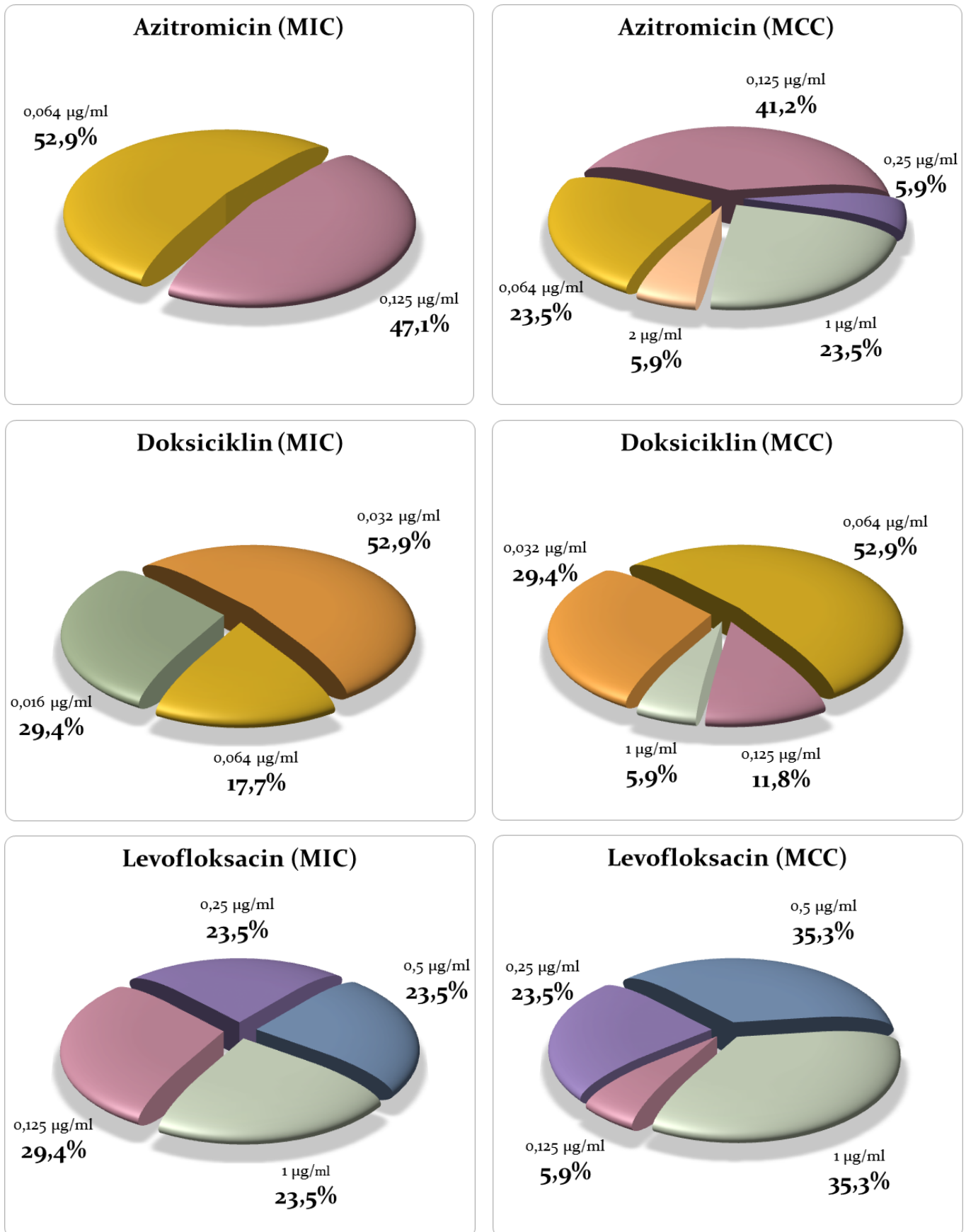
Tablica 9. Minimalna inhibitorna i minimalna klamicidna koncentracija klamidijskog soja izoliranog iz eksprimata prostate

| Godina izolacije | Uzorak: eksprimat prostate | <i>Azitromicin</i> | | <i>Doksiciklin</i> | | <i>Levofloksacin</i> | |
|-------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| | | MIC ($\mu\text{g/ml}$) | MCC ($\mu\text{g/ml}$) | MIC ($\mu\text{g/ml}$) | MCC ($\mu\text{g/ml}$) | MIC ($\mu\text{g/ml}$) | MCC ($\mu\text{g/ml}$) |
| 2010. | Izolat broj 1 | 0,064 | 0,064 | 0,064 | 0,064 | 0,125 | 0,125 |

Tablica 10. Zajednička deskriptivna statistička analiza antimikrobne osjetljivosti sojeva izoliranih iz obrisaka muške uretre i eksprimata prostate (ukupno 17 uzoraka)

| Antibiotik | MIC – raspon | MCC – raspon | MIC₅₀ | MCC₅₀ | MIC₉₀ | MCC₉₀ |
|----------------------|----------------------|---------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| <i>Azitromicin</i> | 0,064 - 0,125 | 0,064 - 2,0 | 0,064 | 0,125 | 0,125 | 1,0 |
| <i>Doksiciklin</i> | 0,016 - 0,064 | 0,032 – 1,0 | 0,032 | 0,064 | 0,064 | 0,125 |
| <i>Levofloksacin</i> | 0,125 - 1,0 | 0,25 - 1,0 | 0,25 | 0,5 | 1,0 | 1,0 |

Slika 20-25. Postotni udio minimalnih inhibitornih i minimalnih klamicidnih koncentracija klamidijskih sojeva izoliranih iz obrisaka muške uretre i eksprimata prostate



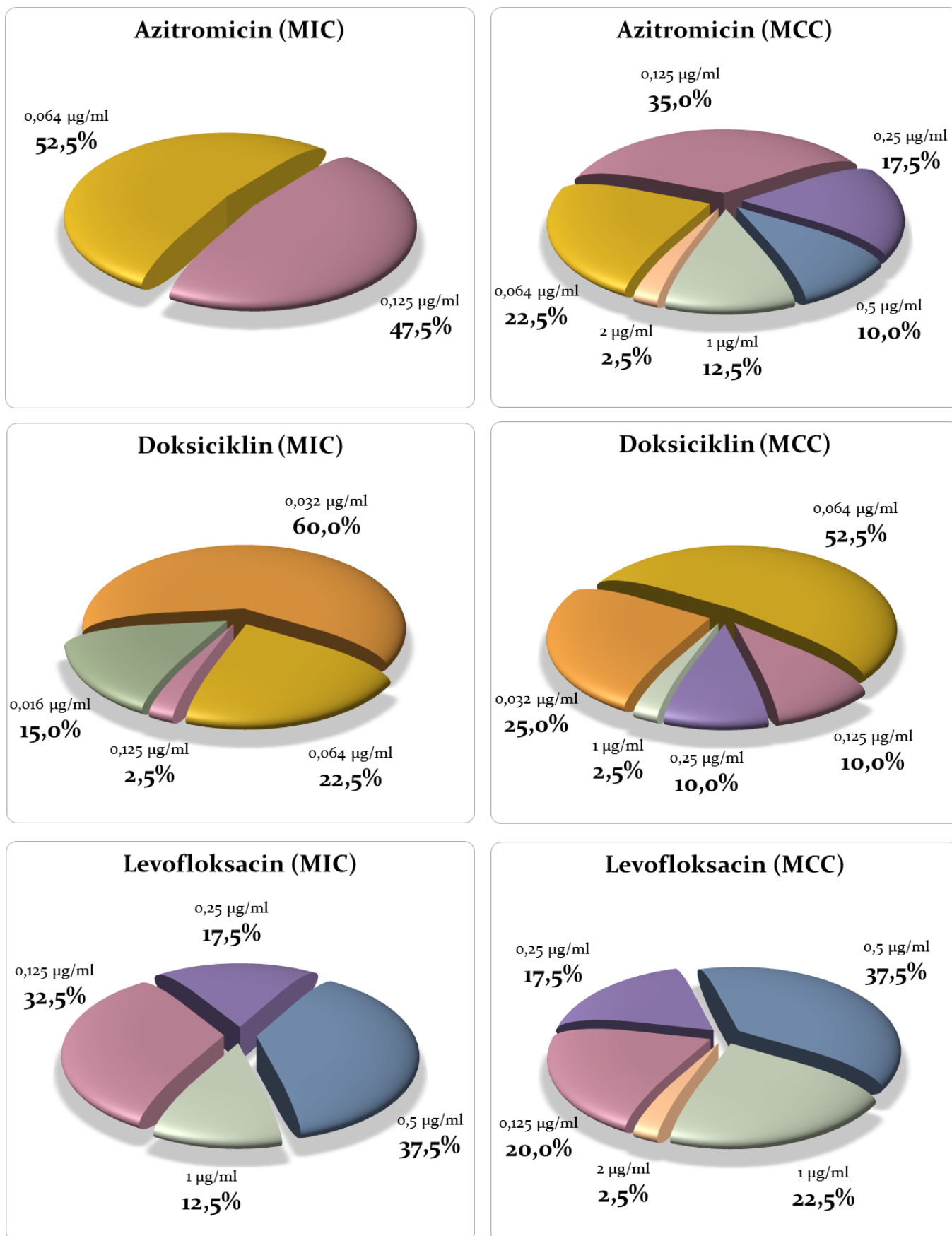
Tablica 11. Deskriptivna statistička analiza antimikrobne osjetljivosti sojeva izoliranih iz svih vrsta kliničkih uzoraka (ukupno 40 uzoraka)

| Antibiotik | MIC – raspon | MCC – raspon | MIC₅₀ | MCC₅₀ | MIC₉₀ | MCC₉₀ |
|----------------------|----------------------|---------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| <i>Azitromicin</i> | 0,064 - 0,125 | 0,064 - 2,0 | 0,064 | 0,125 | 0,125 | 1,0 |
| <i>Doksiciklin</i> | 0,016 - 0,125 | 0,032 - 1,0 | 0,032 | 0,064 | 0,064 | 0,25 |
| <i>Levofloksacin</i> | 0,125 - 1,0 | 0,125 - 2,0 | 0,25 | 0,5 | 1,0 | 1,0 |

Tablica 12. Minimalne inhibitorne i minimalne klamicidne koncentracije referentnih klamidijskih sojeva (serovar E i serovar F)

| Godina izolacije | Uzorak: referentni sojevi | <i>Azitromicin</i> | | <i>Doksiciklin</i> | | <i>Levofloksacin</i> | |
|-------------------------|----------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|----------------------|--------------------|
| | | MIC (µg/ml) | MCC (µg/ml) | MIC (µg/ml) | MCC (µg/ml) | MIC (µg/ml) | MCC (µg/ml) |
| 1998. | Ser. E BOUR | 0,125 | 0,25 | 0,032 | 0,064 | 0,5 | 1,0 |
| 1998. | Ser. F ICCal | 0,064 | 0,125 | 0,032 | 0,064 | 0,5 | 1,0 |

Slika 26-31. Postotni udio minimalnih inhibitornih i minimalnih klamicidnih koncentracija klamidijjskih sojeva izoliranih iz svih vrsta kliničkih uzoraka



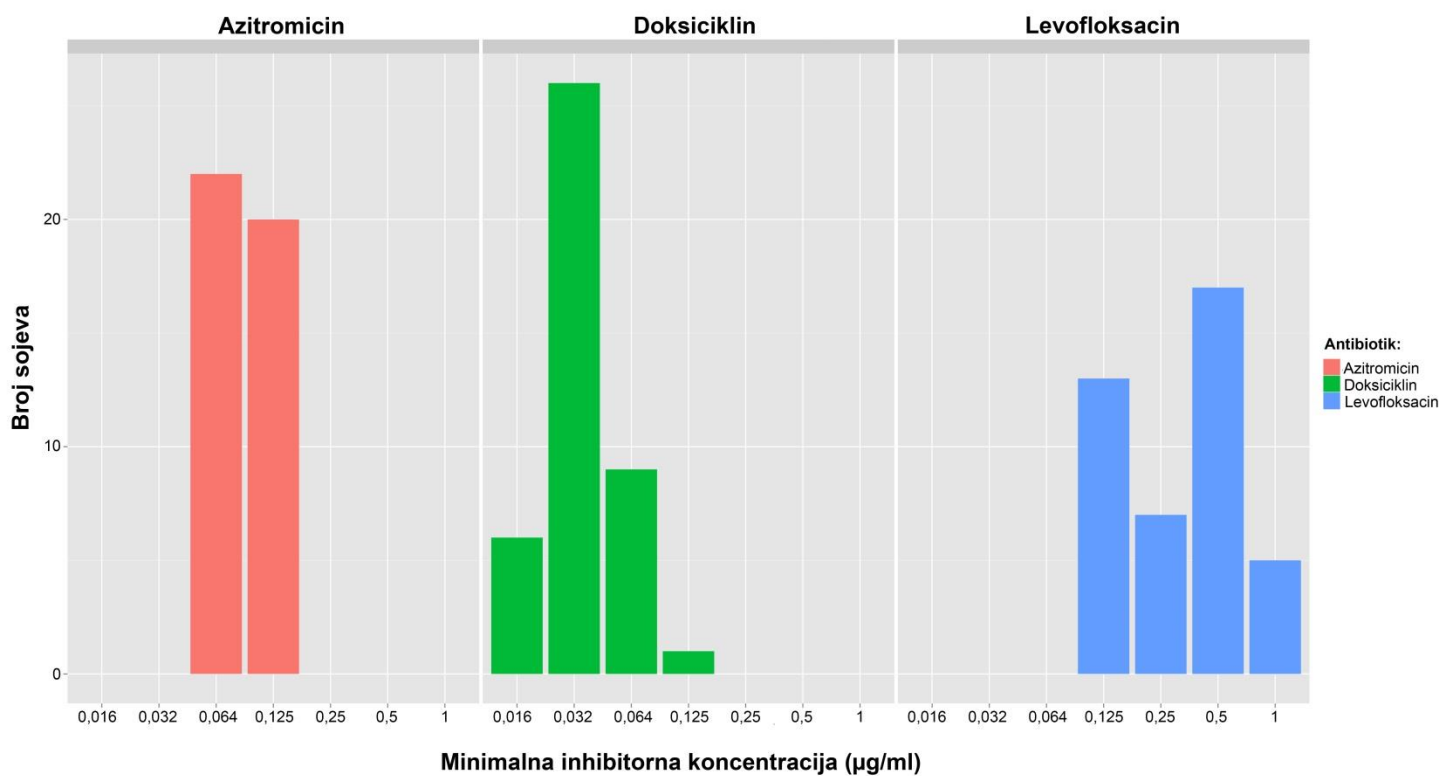
4.2. Usporedba učinkovitosti testiranih antimikrobnih lijekova

Učinak antimikrobnih lijekova na izolate *C. trachomatis* u uvjetima *in vitro* međusobno je uspoređen pomoću eksplorativne analize podataka te korištenjem odgovarajućih statističkih testova.

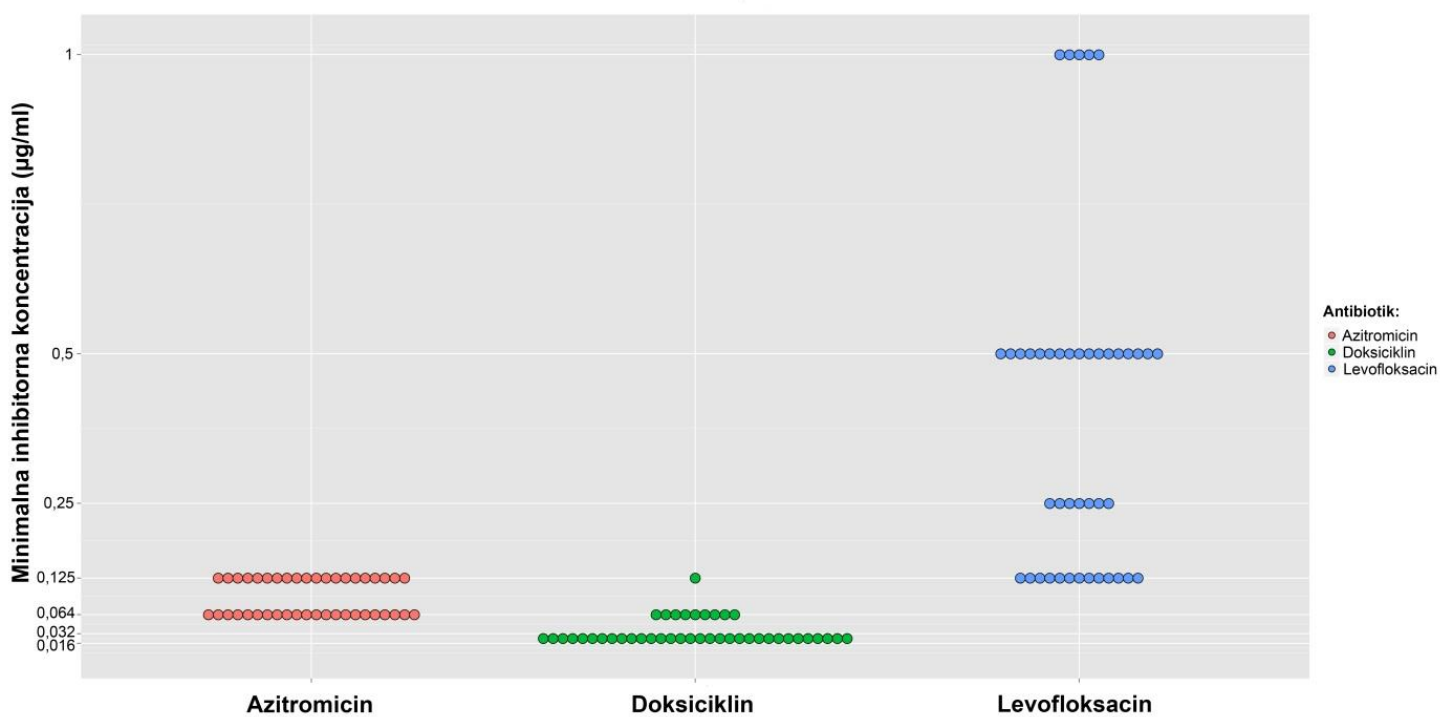
Eksplorativnom analizom je grafički pomoću histograma i točkastih piktograma prikazana distribucija MIC-ova i MCC-ova za sva tri testirana antimikrobna lijeka (Slika 32-35). Iz prikaza se vidi nejednolika distribucija antimikrobne aktivnosti, što ukazuje na njihov različiti učinak na pojedine klamidijske sojeve. Koncentracije azitromicina i doksiciklina su sličnije distribucije, dok levofloksacin u oba slučaja teži prema višim koncentracijskim vrijednostima. Ova analiza sugerira da u uvjetima *in vitro* najbolju aktivnost pokazuje doksiciklin, kojeg slijedi azitromicin, a najslabiju levofloksacin. Razlike u aktivnosti antimikrobnih lijekova potkrijepljene su formalnom statističkom analizom u nastavku.

Međusoban odnos između dobivenih koncentracija testiranih antibiotika prikazan je i dijagramom rasipanja (Slika 36), koji ukazuje na pozitivne korelacijske povezanosti većine prikazanih parova. S obzirom da diskretna priroda podataka dovodi do preklapanja vrijednosti i otežava utvrđivanje međusobne korelacije, bolji uvid pruža formalna analiza korelacije u nastavku.

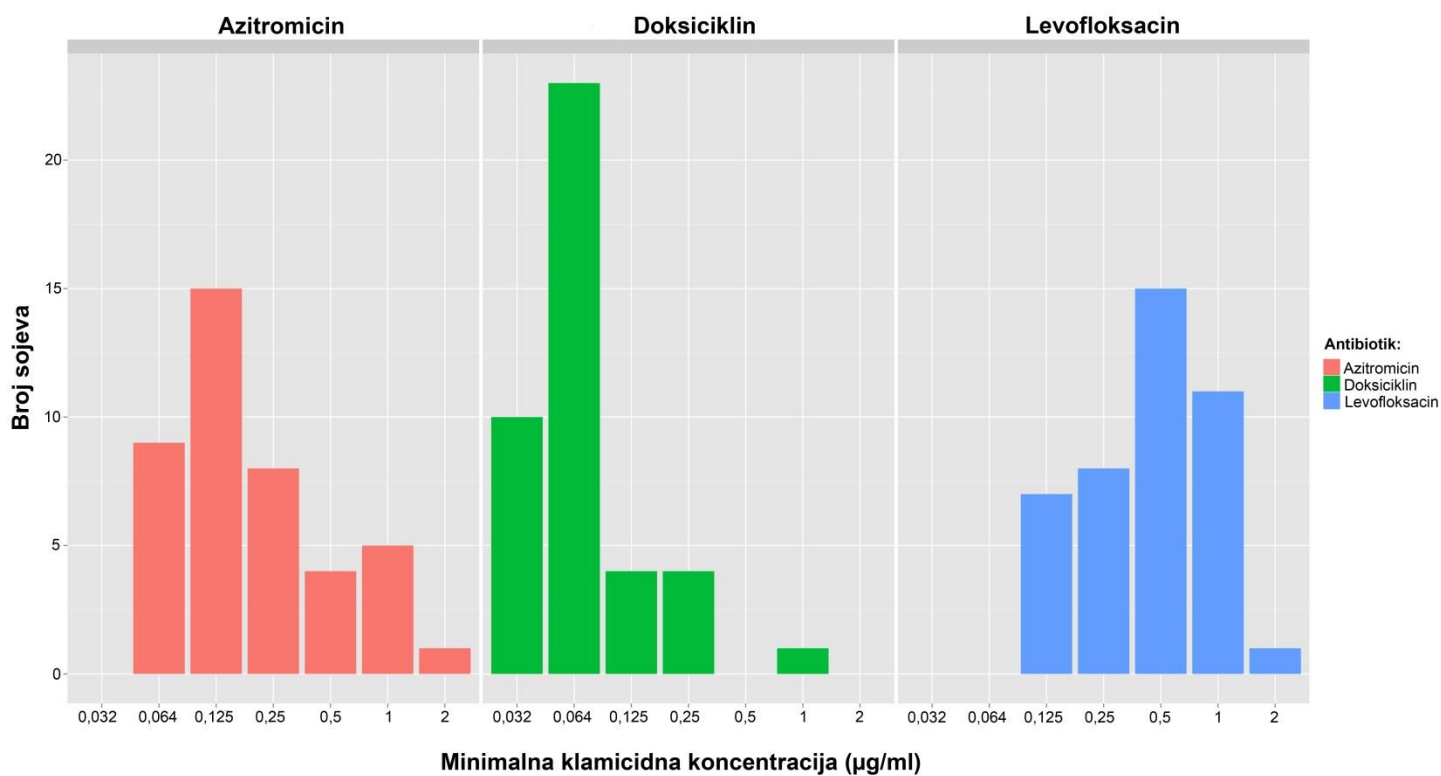
Slika 32. Histogram minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) u odnosu prema antimikrobnom lijeku



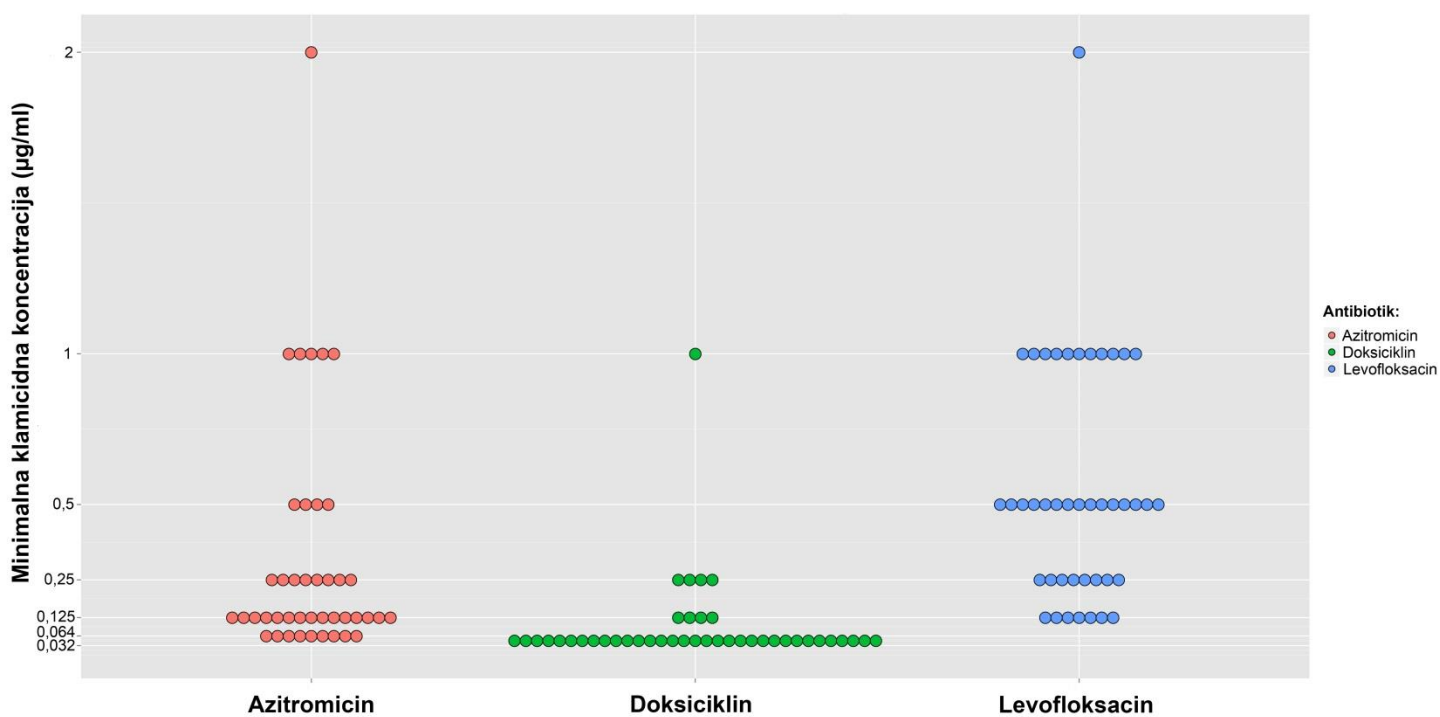
Slika 33. Točkasti piktoqram minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) u odnosu prema antimikrobnom lijeku



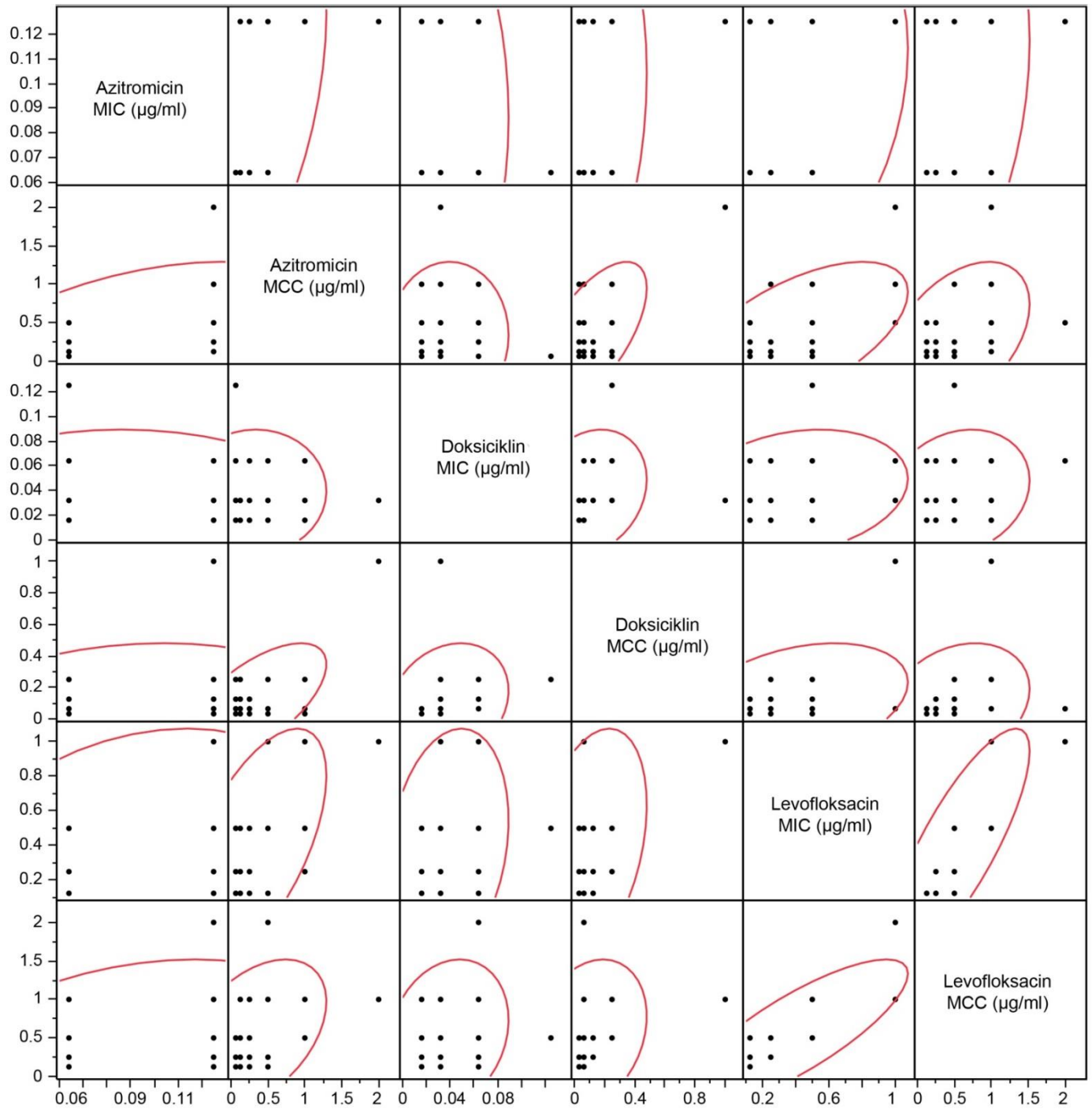
Slika 34. Histogram minimalne klamicidne koncentracije (MCC) u odnosu prema antimikrobnom lijeku



Slika 35. Točkasti piktoqram minimalne klamicidne koncentracije (MCC) u odnosu prema antimikrobnom lijeku

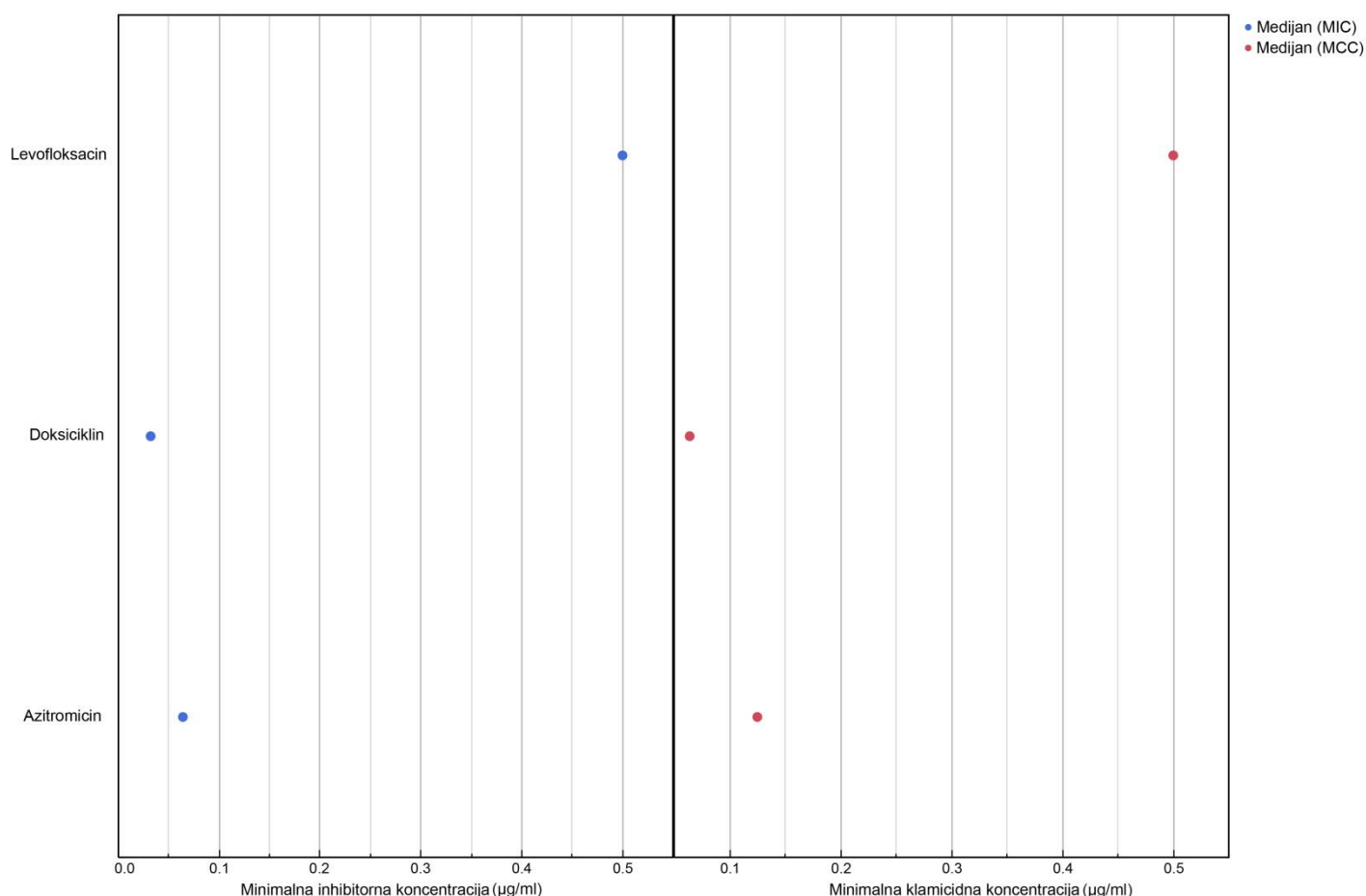


Slika 36. Dijagram rasipanja



Razlike između MIC-ova i MCC-ova za sva tri testirana antimikrobna lijeka utvrđene su Kruskal-Wallisovim testom. Prije provođenja Kruskal-Wallisovog testa istaknuti su koncentracijski medijani svih izolata za sva tri antimikrobna lijeka, koji su u deskriptivnoj statističkoj analizi označeni kao MIC₅₀ i MCC₅₀ (Tablica 11). Medijan MIC-a za azitromicin iznosi 0,64 µg/ml, za doksiciklin 0,032 µg/ml, a za levofloksacin 0,5 µg/ml. Medijan MCC-a za azitromicin iznosi 0,125 µg/ml, za doksiciklin 0,064 µg/ml, a za levofloksacin 0,5 µg/ml (Slika 37).

Slika 37. Prikaz medijana minimalnih inhibitornih i minimalnih klamicidnih koncentracija za azitromicin, doksiciklin i levofloksacin



Premda su razlike između medijana vidljive, p-vrijednosti dobivene Kruskal-Wallisovim testom govore o postojanju statistički značajne razlike ($p < 0,001$) između aktivnosti pojedinih antimikrobnih lijekova *in vitro* (Tablica 13). Drugim riječima, dobivene vrijednosti MIC-ova statistički se značajno razlikuju ovisno o testiranom lijeku, a takva razlika postoji i između vrijednosti MCC-ova.

Tablica 13. Kruskal-Wallisov test za analizu distribucijske razlike minimalnih inhibitornih i minimalnih klamacidnih koncentracija između testiranih antimikrobnih lijekova

| Razlika u antibiotskom učinku | Kruskal-Wallis χ^2 | Stupnjevi slobode | p-vrijednost |
|--|---|--------------------------|-------------------------------------|
| MIC | 99,0933 | 2 | $< 2.2e^{-16}$ |
| MCC | 61,672 | 2 | $4.056e^{-14}$ |

Post-hoc analizom višestruke usporedbe možemo testirati specifične razlike učinka pojedinih antimikrobnih lijekova, uz specifičnu prilagodbu za višestruko istovremeno uspoređivanje. Na tako provedenu usporedbu može se gledati kao na multiplu Mann-Whitneyevu analizu u odnosu na jednu prilagođenu p-vrijednost (151). Dobiveni rezultati ukazuju da su razlike u vrijednostima MIC-ova i MCC-ova statistički značajne kod svih parova antimikrobnih lijekova (Tablica 14 i 15). Analizom originalnih medijana i dobivenih rezultata možemo zaključiti da doksiciklin pokazuje najjači antimikrobni učinak na testirane sojeve u uvjetima *in vitro*, slijedi ga azitromicin, dok levofloksacin pokazuje najslabiji antimikrobni učinak.

Tablica 14. Post-hoc analiza višestruke usporedbe minimalnih inhibitornih koncentracija antimikrobnih lijekova u odnosu na jednu prilagođenu p-vrijednost ($p = 0,05$)

| Uspoređeni par (MIC) | Uočena razlika | Kritična vrijednost | Razlika |
|-----------------------------|-----------------------|----------------------------|----------------|
| Azitromicin - Doksiciklin | 38,70238 | 19,07688 | TRUE |
| Azitromicin - Levofloksacin | 38,77381 | 19,07688 | TRUE |
| Doksiciklin - Levofloksacin | 77,47619 | 19,07688 | TRUE |

Tablica 15. Post-hoc analiza višestruke usporedbe minimalnih klamicidnih koncentracija antimikrobnih lijekova u odnosu na jednu prilagođenu p-vrijednost ($p = 0,05$)

| Uspoređeni par (MCC) | Uočena razlika | Kritična vrijednost | Razlika |
|-----------------------------|-----------------------|----------------------------|----------------|
| Azitromicin - Doksiciklin | 35,23810 | 19,07688 | TRUE |
| Azitromicin - Levofloksacin | 25,98810 | 19,07688 | TRUE |
| Doksiciklin - Levofloksacin | 61,22619 | 19,07688 | TRUE |

Formalnom korelacijskom analizom moguće je utvrditi linearnu povezanost (ali i druge vrste povezanosti) između MIC-ova i MCC-ova za različite lijekove, što nam daje uvid u kovarijancu između antimikrobnih lijekova. Za tu svrhu korišten je Spearmanov korelacijski test koji je prikladan za diskretne neparametrijske uzorke.

Tablica 16. Spearmanov korelacijski test za utvrđivanje odnosa minimalnih inhibitornih koncentracija između različitih antimikrobnih lijekova

| Uspoređeni par (MIC) | Mjera korelacije | Statistička vrijednost | p-vrijednost |
|-----------------------------|-------------------------|-------------------------------|---------------------|
| Azitromicin - Doksiciklin | - 0,07491492 | 13265,52 | 0,6373 |
| Azitromicin - Levofloksacin | 0,1950488 | 9933,903 | 0,2158 |
| Doksiciklin - Levofloksacin | 0,2532561 | 9215,567 | 0,1056 |

Tablica 17. Spearmanov korelacijski test za utvrđivanje odnosa minimalnih klamicidnih koncentracija između različitih antimikrobnih lijekova

| Uspoređeni par (MCC) | Mjera korelacije | Statistička vrijednost | p-vrijednost |
|-----------------------------|-------------------------|-------------------------------|---------------------|
| Azitromicin - Doksiciklin | 0,1089088 | 10996,96 | 0,4924 |
| Azitromicin - Levofloksacin | 0,3521474 | 7995,149 | 0,02219 |
| Doksiciklin - Levofloksacin | 0,3147656 | 8456,477 | 0,04233 |

Statistički značajna korelacija pronađena je u slučaju dva antimikrobna para za MCC-ove: azitromicina i levofloksacina ($p=0,02$), te doksiciklina i levofloksacina ($p=0,04$) (Tablica 17). Utvrđivanje statističke značajnosti samo je prvi korak, a dalje je korelaciju nužno tumačiti s obzirom na vrijednost koeficijenta ili mjere korelacije, pomoću kojeg se izračunava jakost povezanosti izražena kao udio zajedničkih vrijednosti. Mjera korelacije u oba slučaja ukazuje na slabu, pozitivno usmjerenu monotoničku povezanost navedenih parova antimikrobnih lijekova. Drugim riječima, u oba navedena slučaja sojevi kojima je potrebna veća koncentracija azitromicina ili doksiciklina za postizanje klamicidnog efekta trebaju i veću koncentraciju levofloksacina.

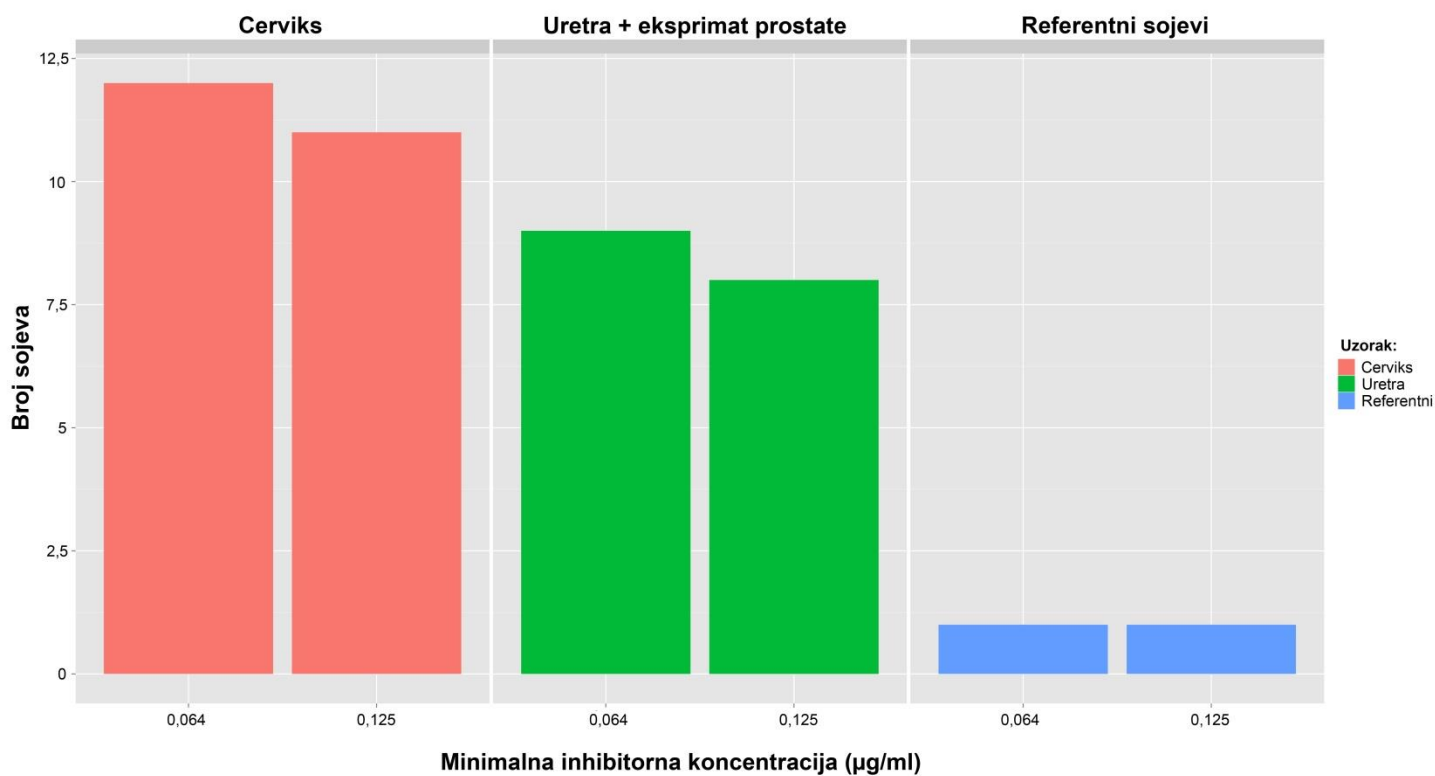
4.3. Usporedba dobivenih koncentracija ovisno o vrsti kliničkog uzorka

Razlike u dobivenim koncentracijama ovisno o vrsti kliničkog uzorka (bris cerviksa, bris mokraćne cijevi i eksprimat prostate) također su međusobno uspoređene pomoću eksplorativne analize podataka te korištenjem odgovarajućih statističkih testova. U analizu su uključeni i referentni klamidijски sojevi.

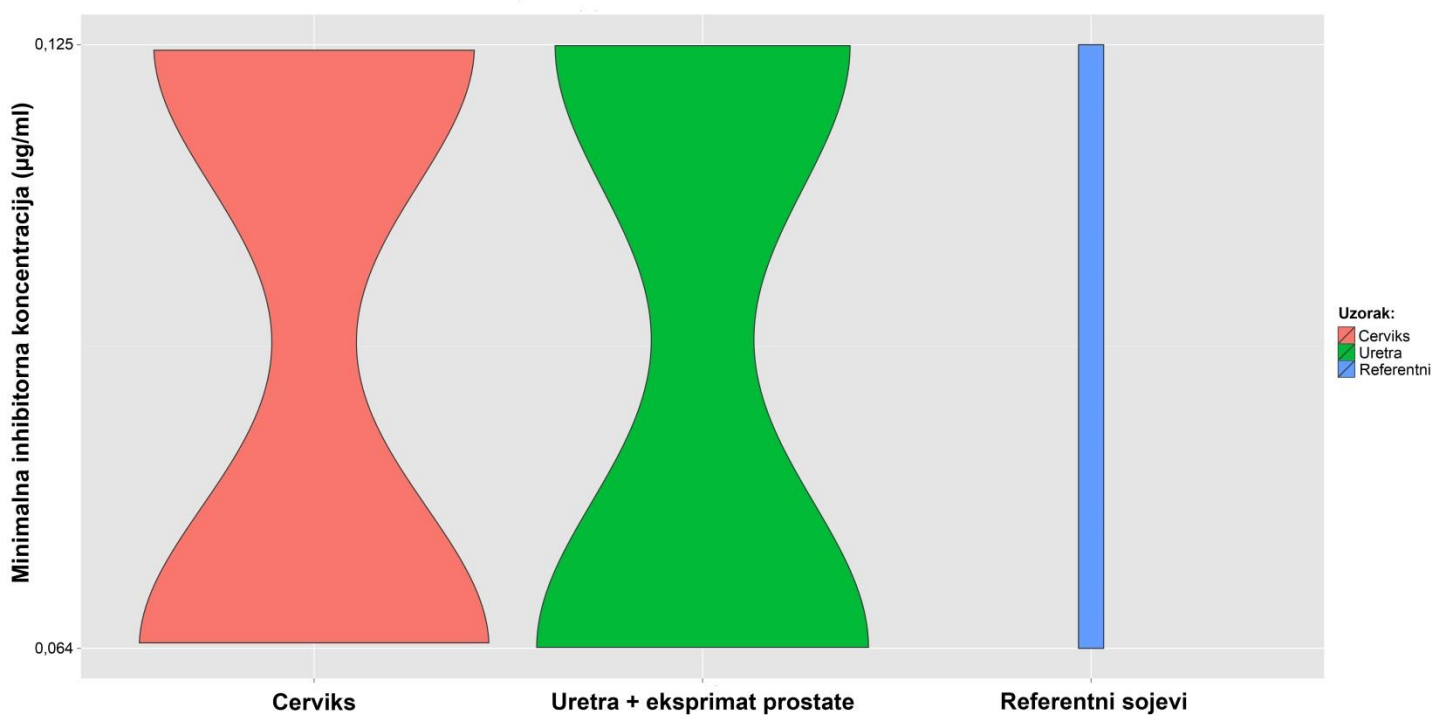
Eksplorativnom analizom je grafički pomoću histograma i violinskih dijagrama prikazana distribucija MIC-ova i MCC-ova, ovisno o tome iz koje regije potječu izolati (Slika 38-49). Violinski dijagram je nalik kutijastim dijagramima (engl. *box-plot*), osim što ukazuje i na gustoću vjerojatnosti za različite koncentracije. Pomoću njih je moguće vizualizirati koncentracijsku uniformnost za oba područja u slučaju azitromicina, ali i odstupanja koja pokazuju određeni izolati – primjerice, izolat uretre br. 2 (Tablica 8) koji u slučaju doksiciklina doseže MCC od 1 $\mu\text{g/ml}$ (Slika 45). Ipak, samom distribucijom nije moguće utvrditi postoje li značajne razlike u koncentracijama ovisno o vrsti kliničkog uzorka, stoga je u nastavku provedena formalna statistička analiza.

Međusoban odnos između dobivenih koncentracija testiranih antibiotika i vrste kliničkog uzorka prikazan je i dijagramom paralelnih koordinata (Slika 50). Opservacije su istaknute kao linije koje prolaze kroz paralelne osi, dok svaka os predstavlja jednu varijablu.

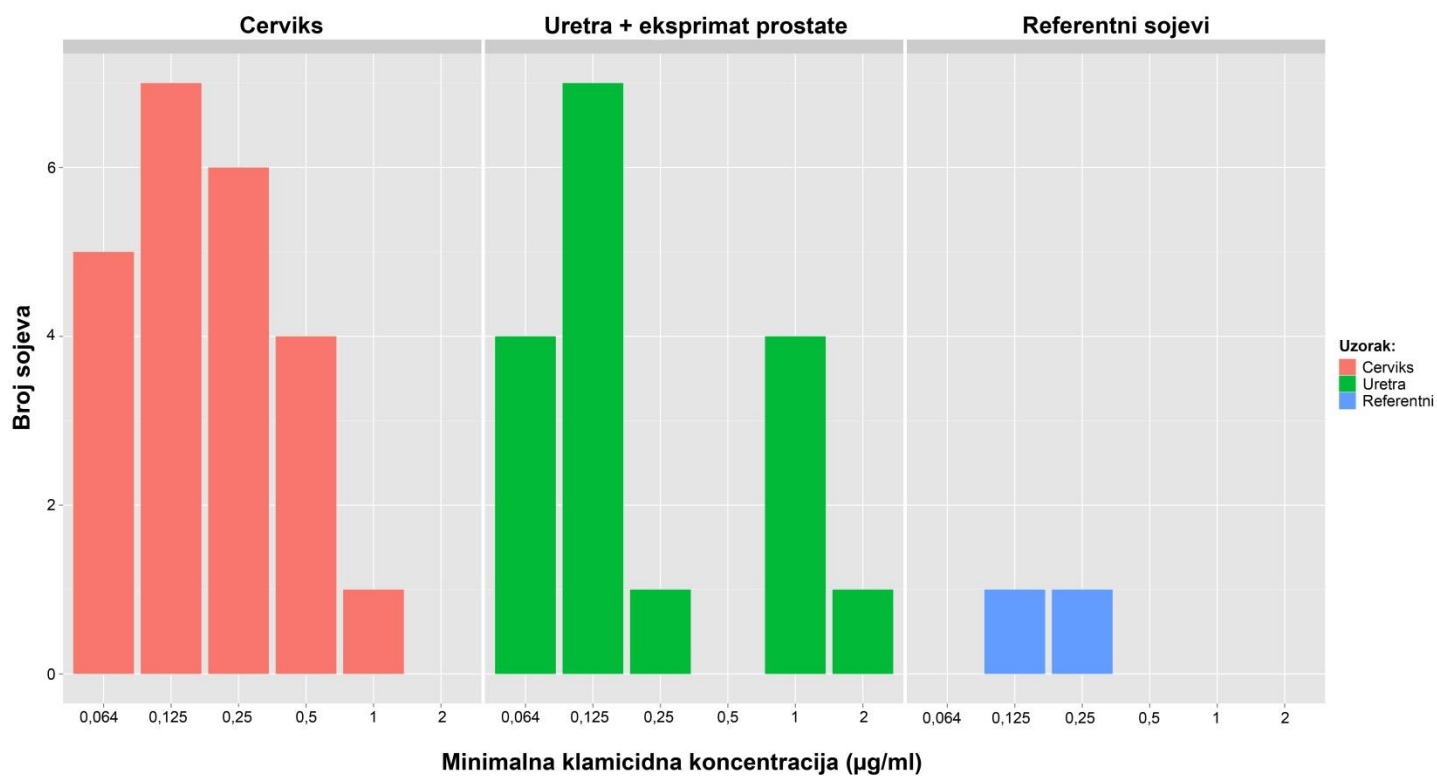
Slika 38. Histogram minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) za azitromicin u odnosu prema vrsti kliničkog uzorka



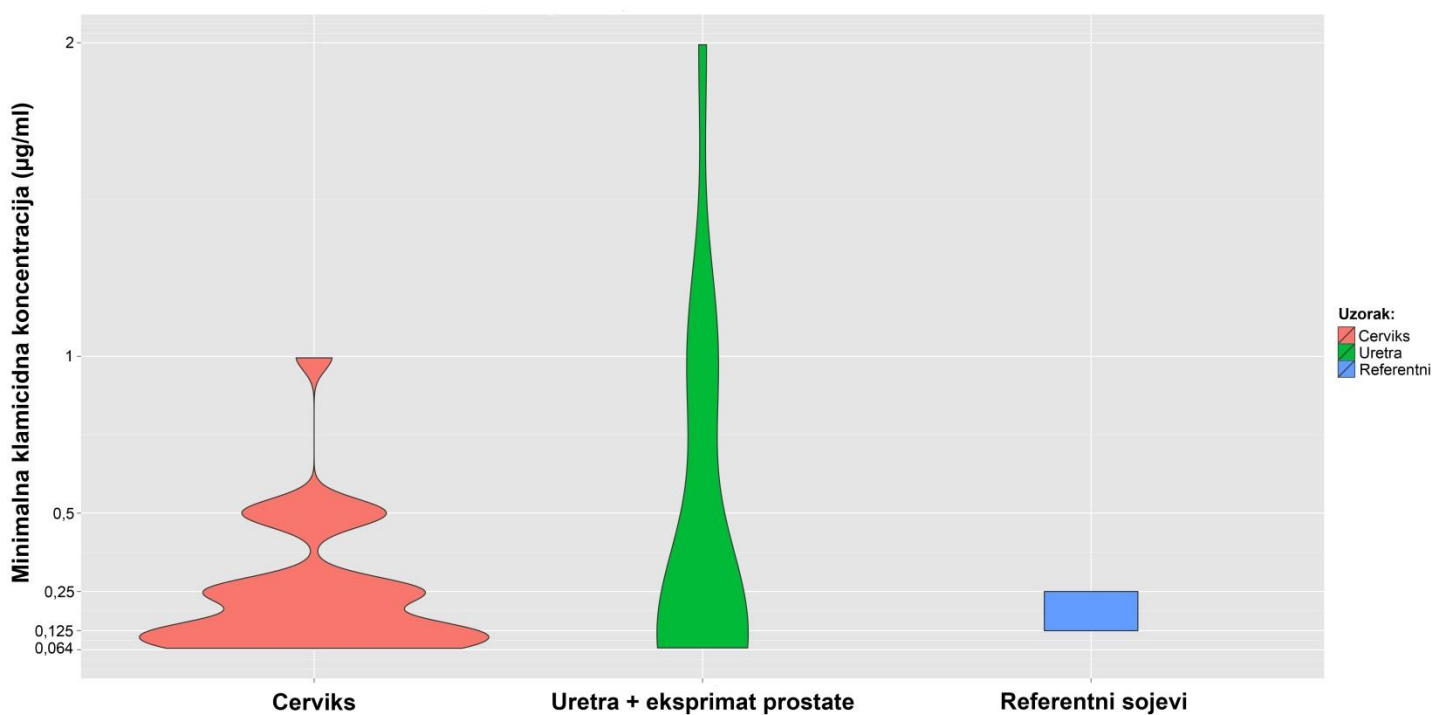
Slika 39. Violinski dijagram minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) za azitromicin u odnosu prema vrsti kliničkog uzorka



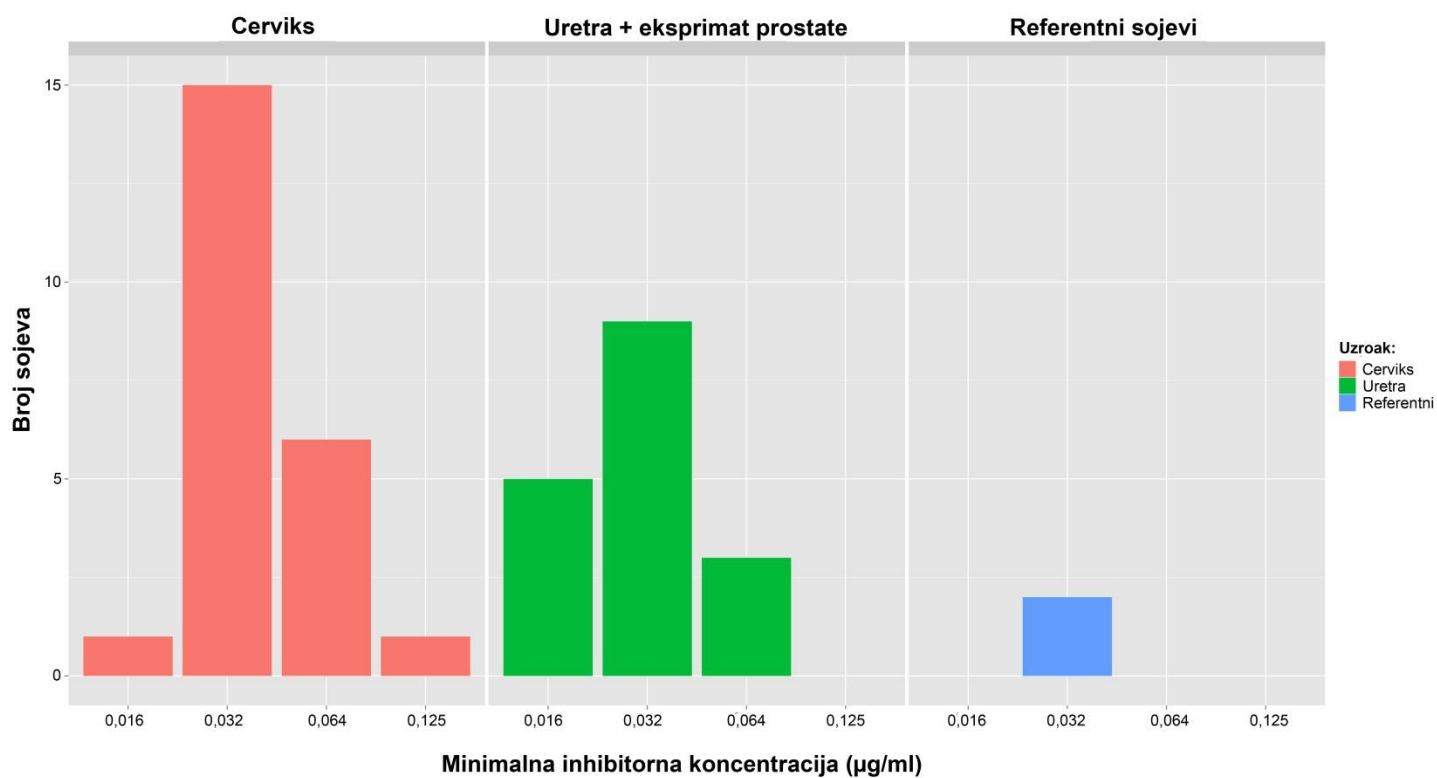
Slika 40. Histogram minimalne klamicidne koncentracije (MCC) za azitromicin u odnosu prema vrsti kliničkog uzorka



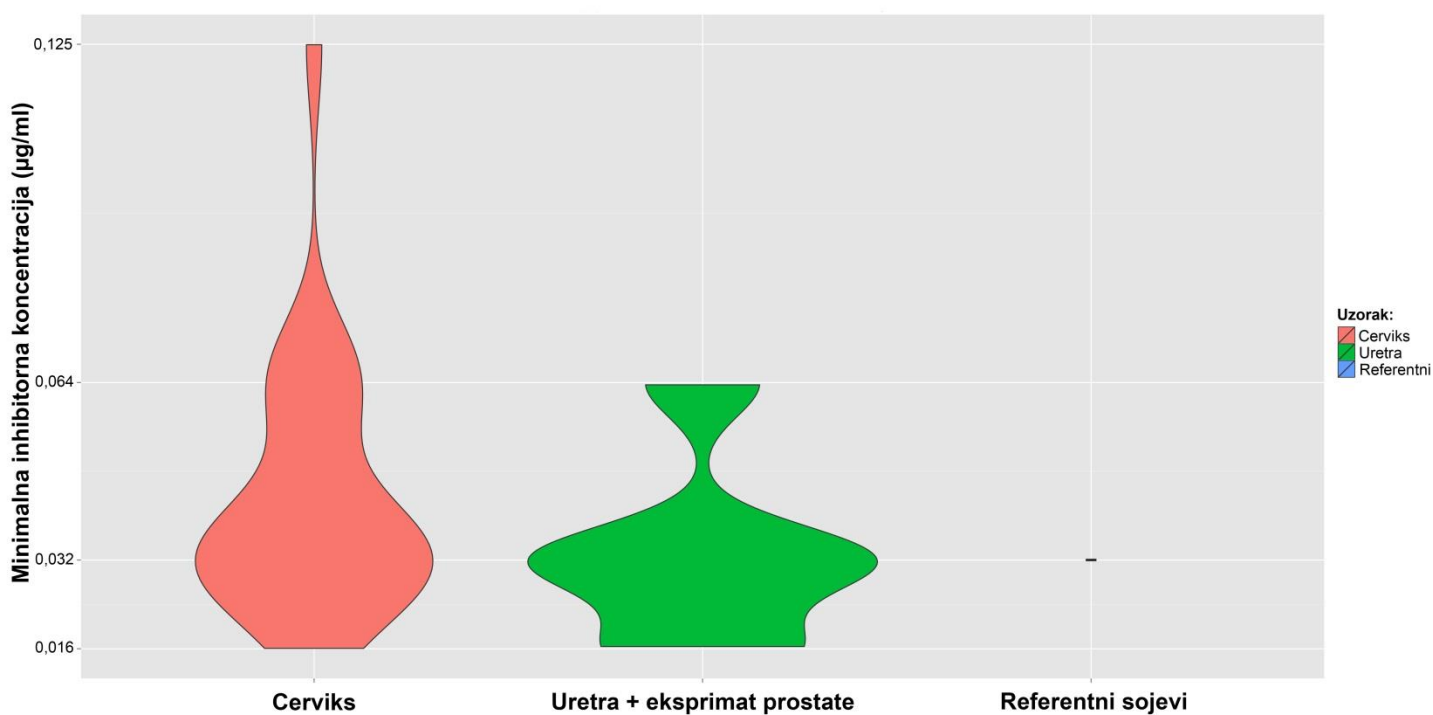
Slika 41. Violinski dijagram minimalne klamicidne koncentracije (MCC) za azitromicin u odnosu prema vrsti kliničkog uzorka



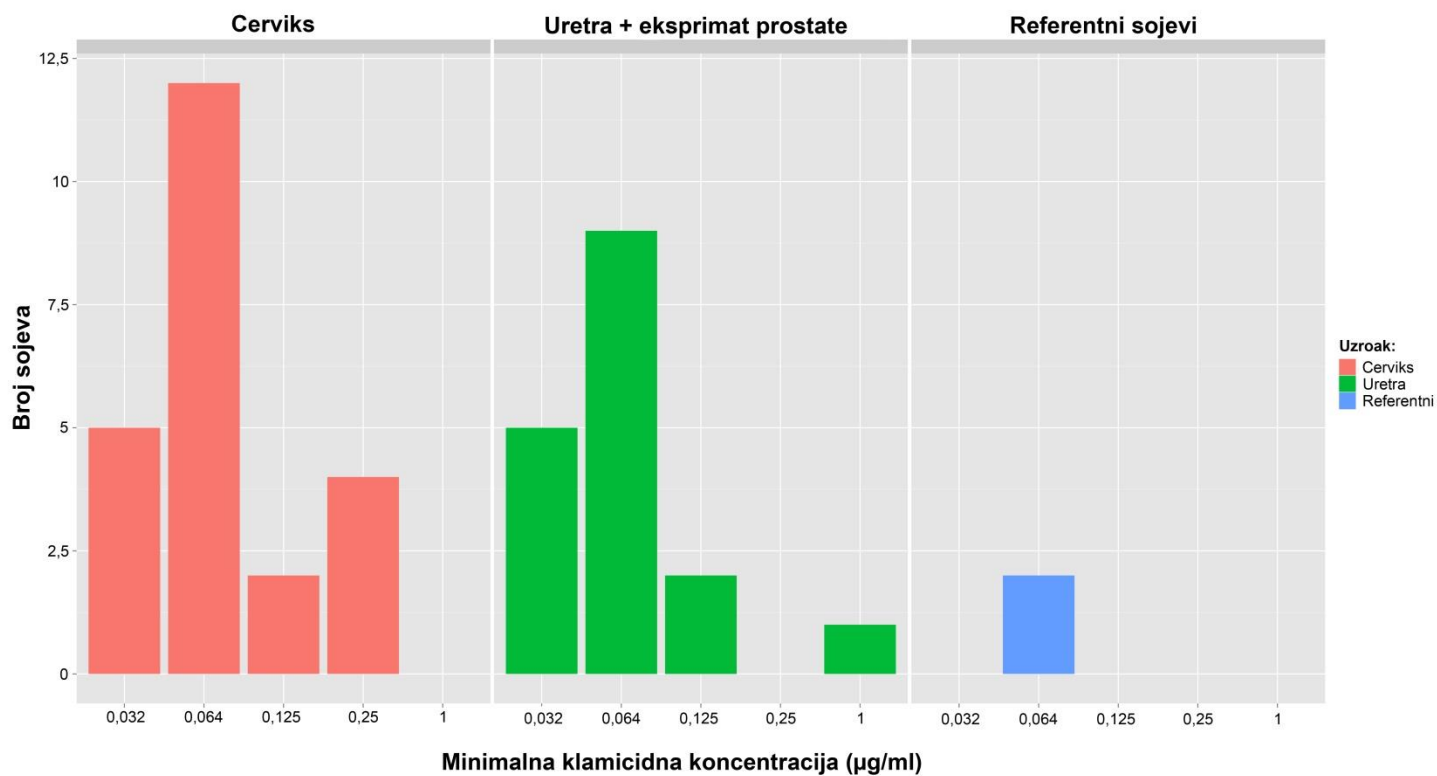
Slika 42. Histogram minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) za doksiciklin u odnosu prema vrsti kliničkog uzorka



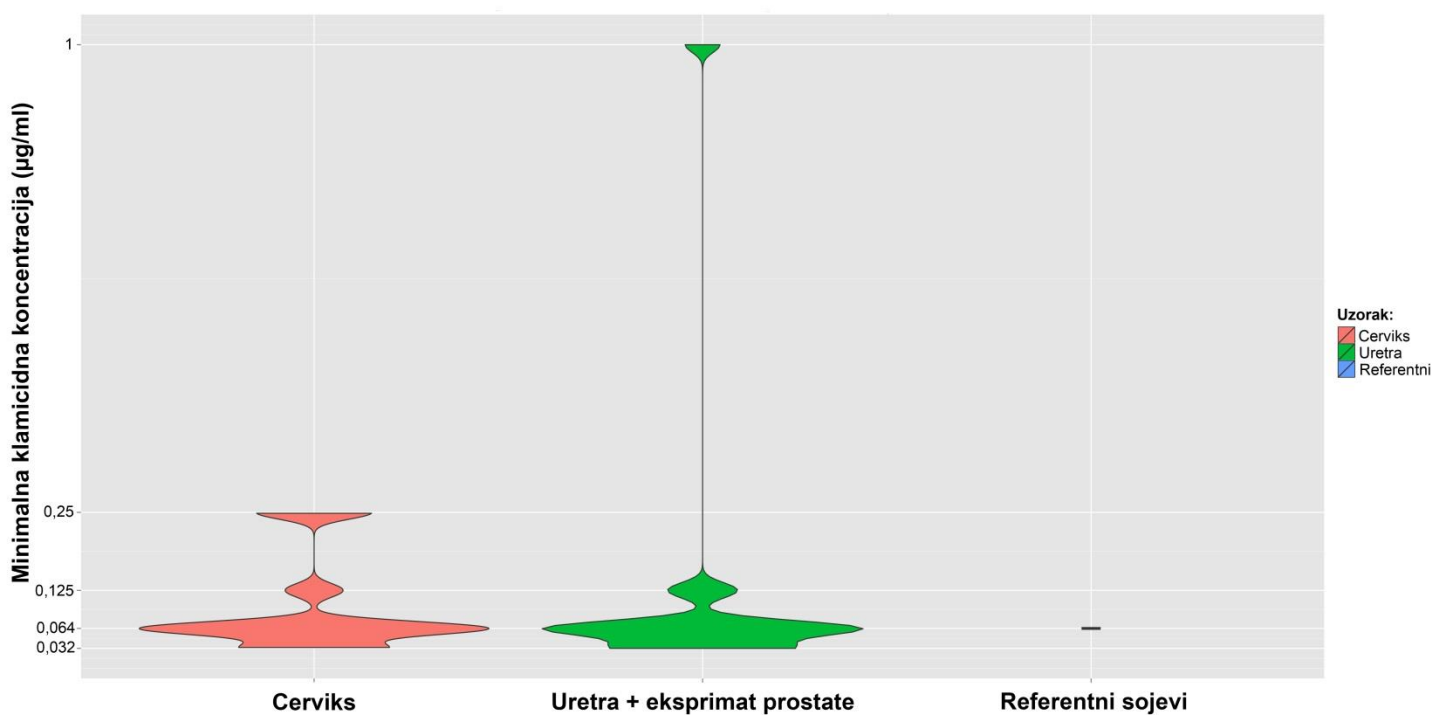
Slika 43. Violinski dijagram minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) za doksiciklin u odnosu prema vrsti kliničkog uzorka



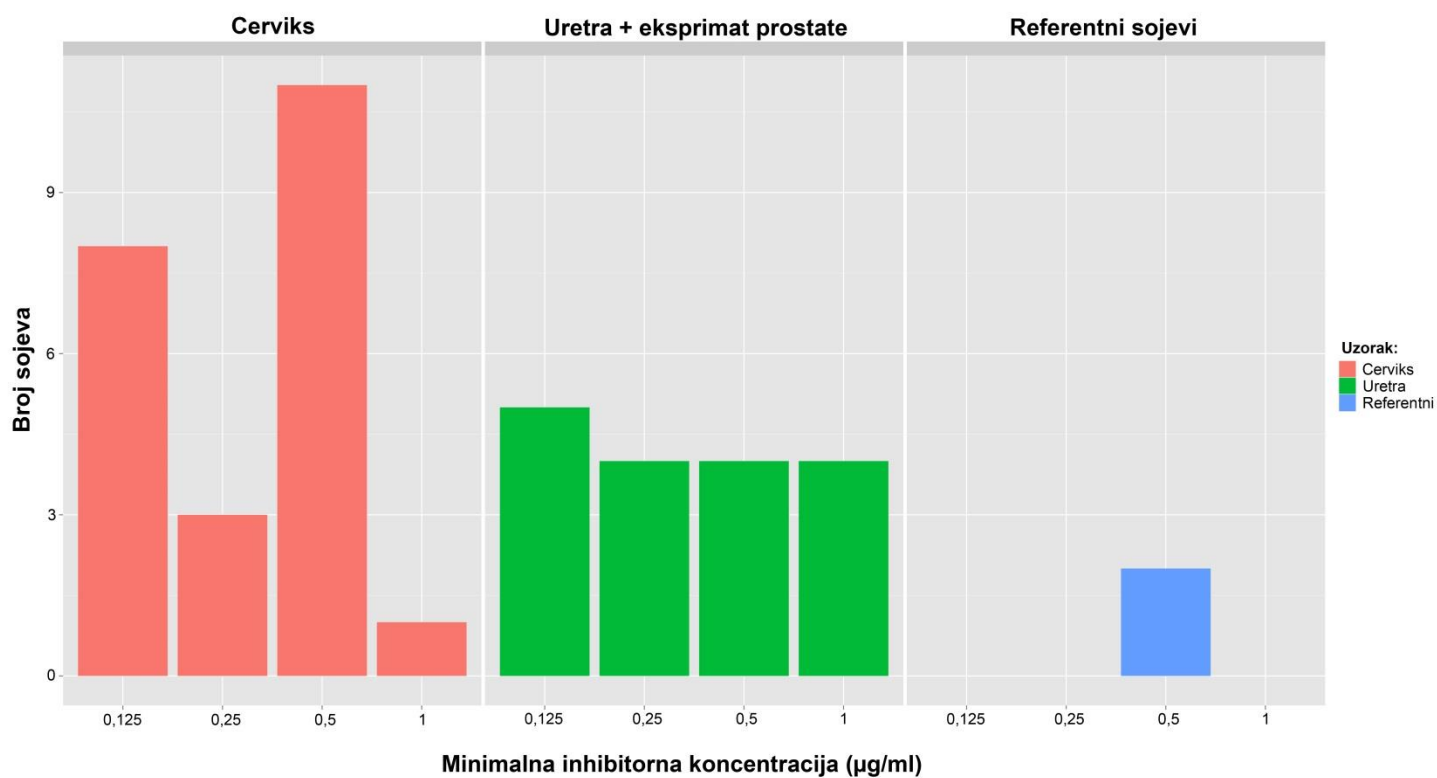
Slika 44. Histogram minimalne klamicidne koncentracije (MCC) za doksiciklin u odnosu prema vrsti kliničkog uzorka



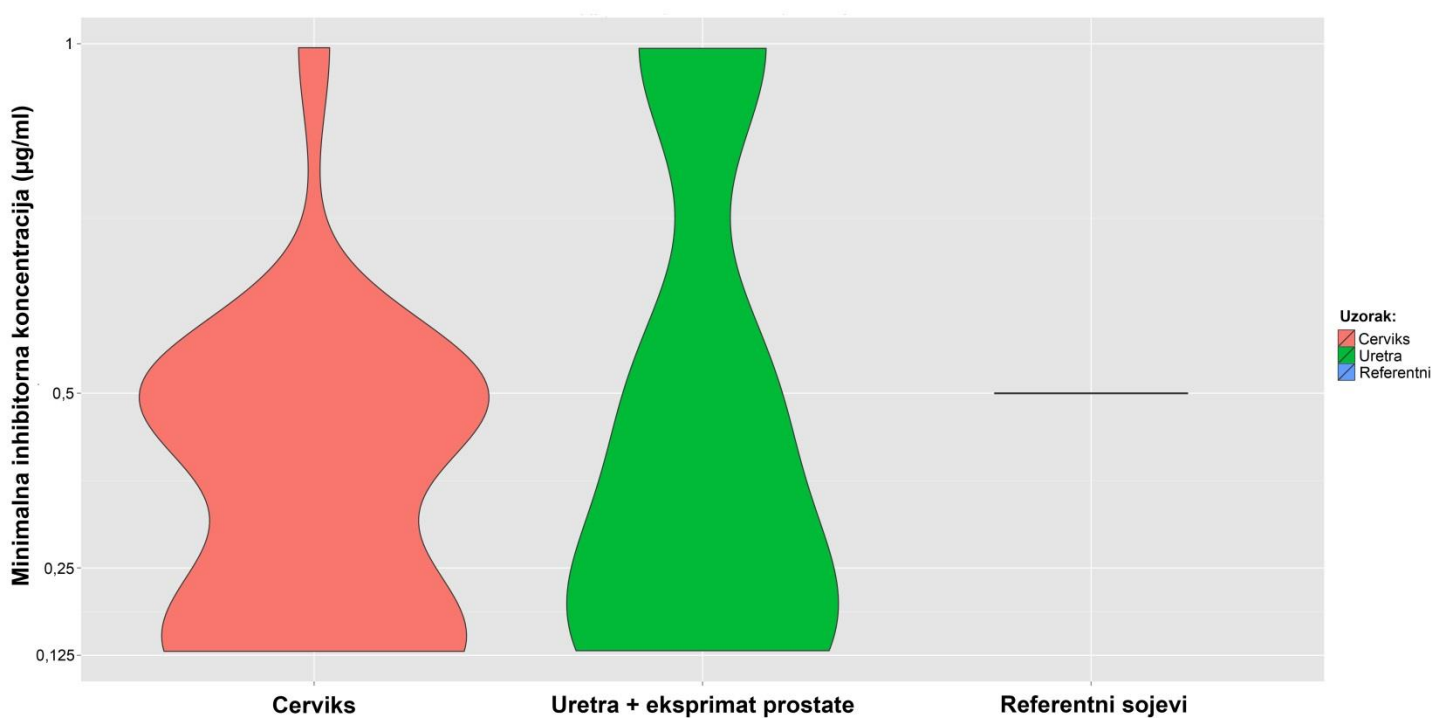
Slika 45. Violinski dijagram minimalne klamicidne koncentracije (MCC) za doksiciklin u odnosu prema vrsti kliničkog uzorka



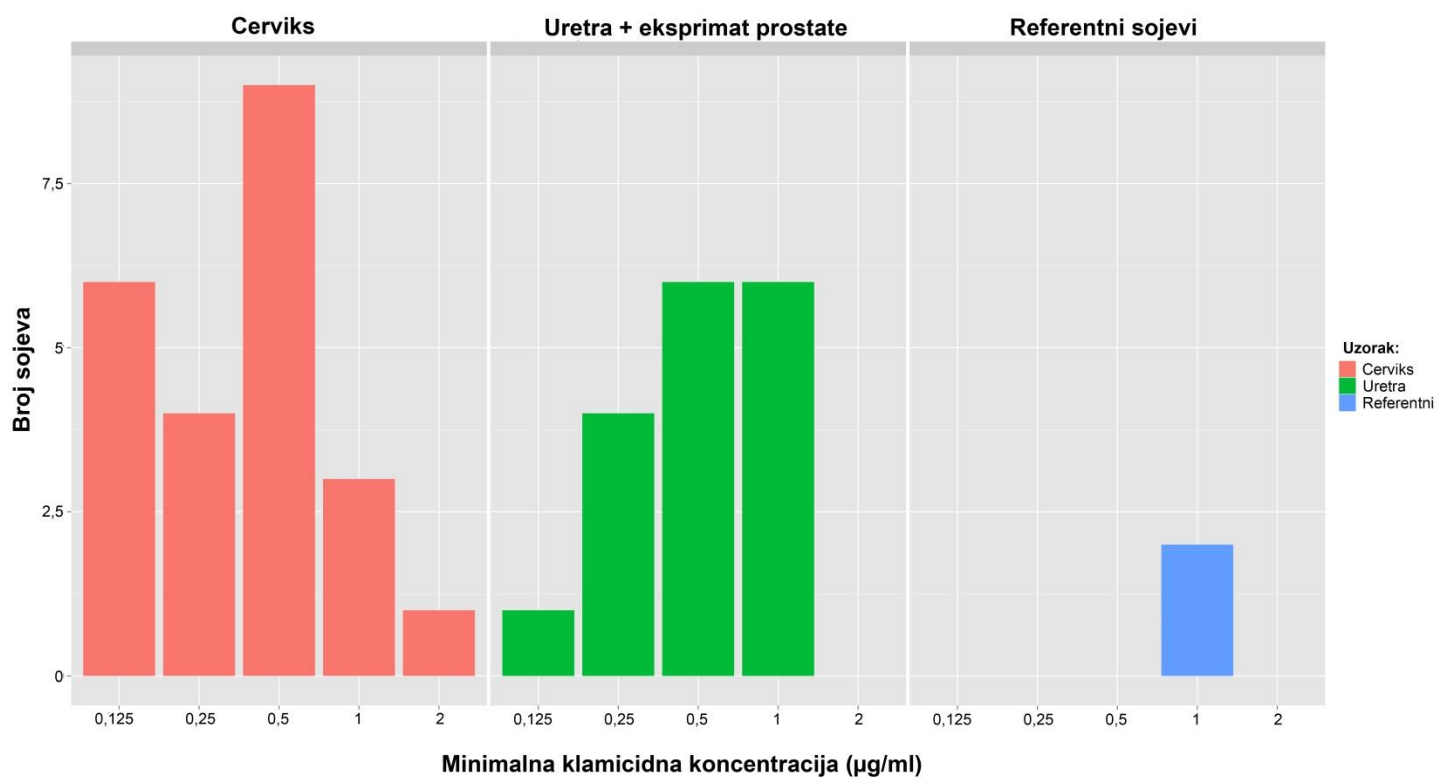
Slika 46. Histogram minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) za levofloksacin u odnosu prema vrsti kliničkog uzorka



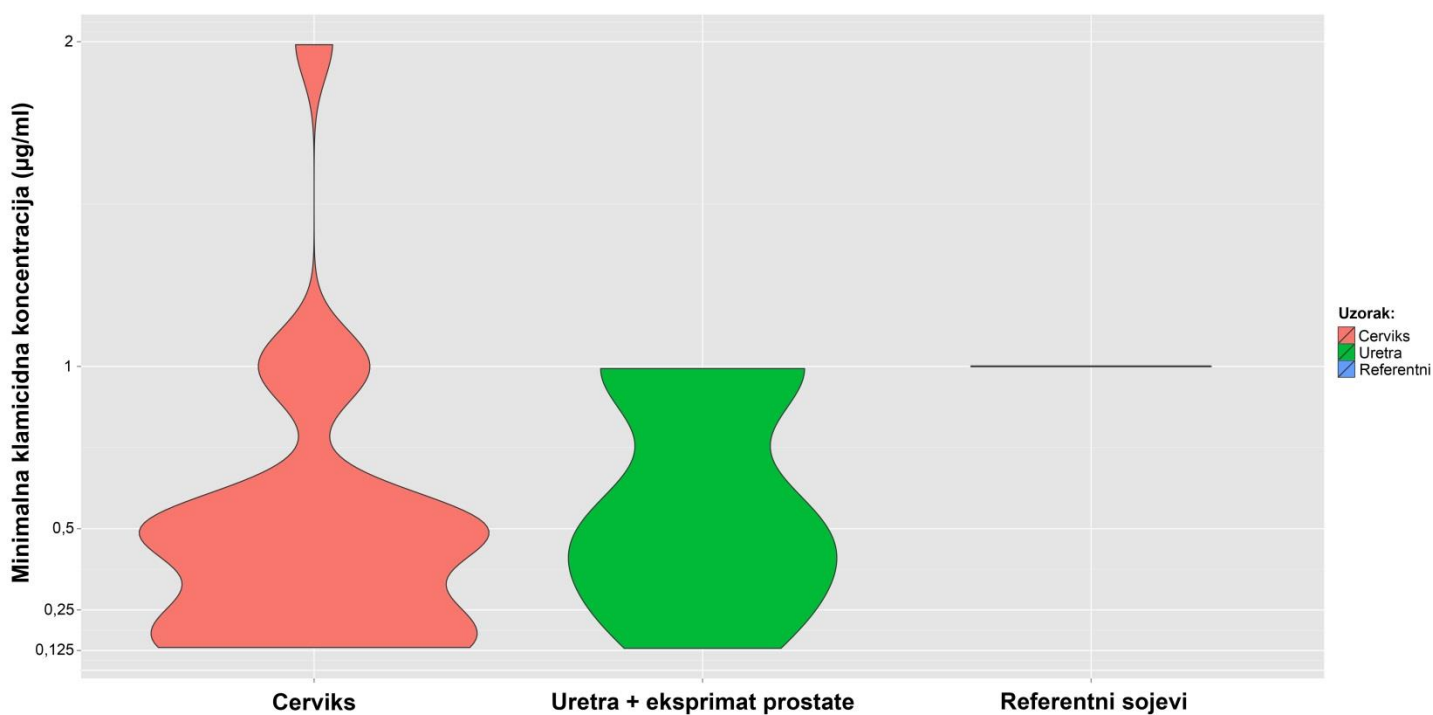
Slika 47. Violinski dijagram minimalne minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) za levofloksacin u odnosu prema vrsti kliničkog uzorka



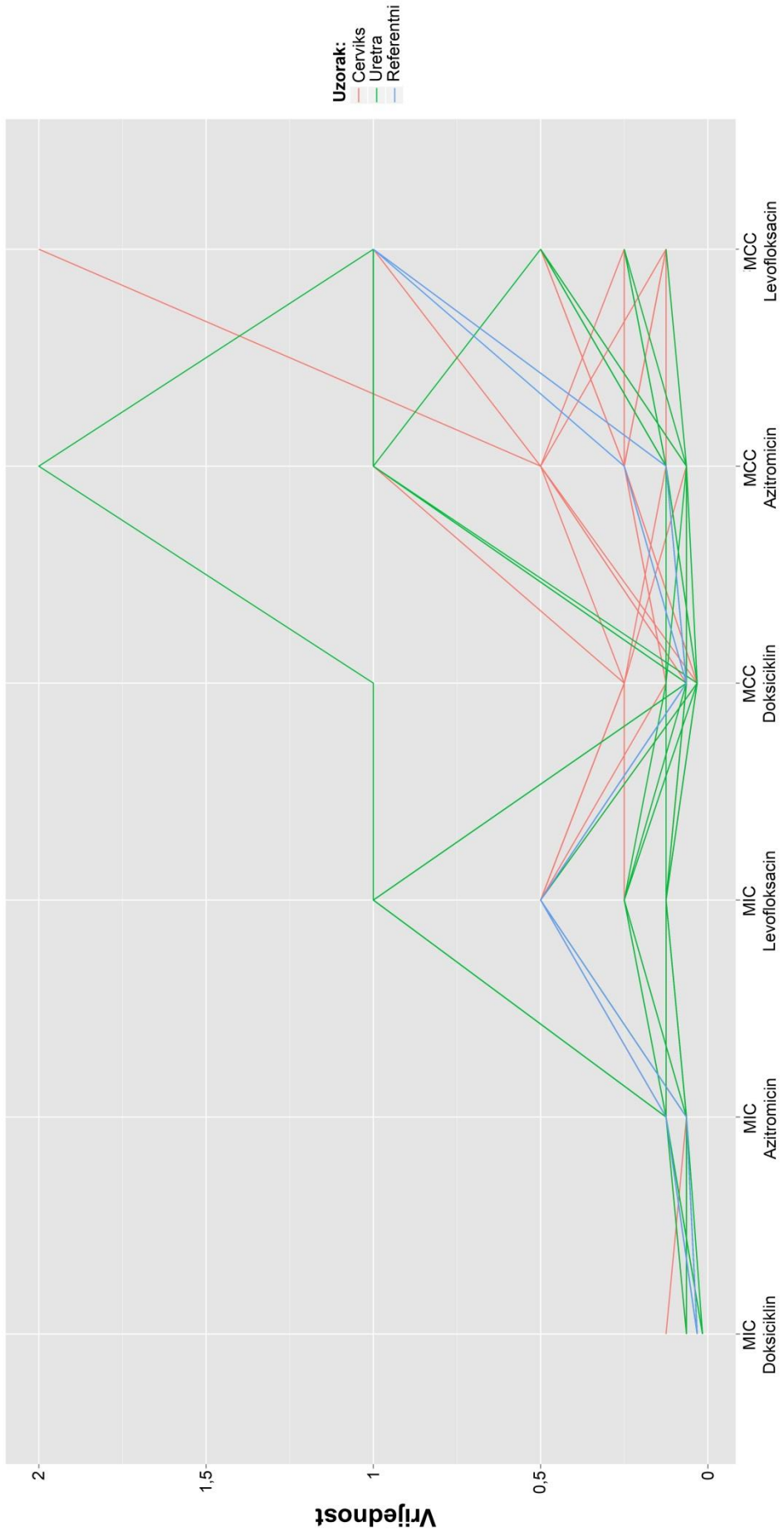
Slika 48. Histogram minimalne klamicidne koncentracije (MCC) za levofloksacin u odnosu prema vrsti kliničkog uzorka



Slika 49. Violinski dijagram minimalne klamicidne koncentracije (MCC) za levofloksacin u odnosu prema vrsti kliničkog uzorka



Slika 50. Dijagram paralelnih koordinata



Statistička analiza ovisno o vrsti uzorka provedena je na jednak način kao i međusobna usporedba antibiotske aktivnosti. Kruskal-Wallisovim testom usporebde koncentracijskih medijana izolata iz različitih sijela nije pronađena statistički značajna razlika između briseva cerviksa, briseva muške uretre zajedno s eksprimatom prostate te referentnih sojeva (Tablica 18 i 19), što je potvrđeno i post-hoc analizom višestruke usporedbe (Tablica 20).

Tablica 18. Kruskal-Wallisov test za analizu distribucijske razlike minimalnih inhibitornih koncentracija za sva tri antibiotika među različitim kliničkim uzorcima

| Antibiotik | Kruskal-Wallis χ^2 | Stupnjevi slobode | p-vrijednost |
|-------------------|---|--------------------------|---------------------|
| Azitromicin | 0,0069 | 2 | 0,9966 |
| Doksiciklin | 3,6924 | 2 | 0,1578 |
| Levofloksacin | 1,1728 | 2 | 0,5563 |

Tablica 19. Kruskal-Wallisov test za analizu distribucijske razlike minimalnih klamicidnih koncentracija za sva tri antibiotika među različitim kliničkim uzorcima

| Antibiotik | Kruskal-Wallis χ^2 | Stupnjevi slobode | p-vrijednost |
|-------------------|---|--------------------------|---------------------|
| Azitromicin | 0,0241 | 2 | 0,988 |
| Doksiciklin | 0,589 | 2 | 0,7449 |
| Levofloksacin | 5,0674 | 2 | 0,07937 |

Tablica 20. Post-hoc analiza višestruke usporedbe minimalne inhibitorne i minimalne klamicidne koncentracije različitih kliničkih uzoraka za sva tri antibiotika u odnosu na jednu prilagođenu p-vrijednost ($p = 0,05$)

| Uspoređeni par | Uočena razlika | Kritična vrijednost | Razlika |
|--|-----------------------|----------------------------|----------------|
| Cerviks – Uretra (Azitromicin MIC) | 0,1611253 | 9,393563 | FALSE |
| Cerviks – Uretra (Azitromicin MCC) | 0,1086957 | 9,393563 | FALSE |
| Cerviks – Uretra (Doksiciklin MIC) | 6,465473 | 9,393563 | FALSE |
| Cerviks – Uretra (Doksiciklin MCC) | 2,7186701 | 9,393563 | FALSE |
| Cerviks – Uretra (Levofloksacin MIC) | 2,0882353 | 9,393563 | FALSE |
| Cerviks – Uretra (Levofloksacin MCC) | 5,199488 | 9,393563 | FALSE |
| Cerviks – Referentni sojevi (Azitromicin MIC) | 0,4565217 | 21,651093 | FALSE |
| Cerviks – Referentni sojevi (Azitromicin MCC) | 1,3586957 | 21,651093 | FALSE |
| Cerviks – Referentni sojevi (Doksiciklin MIC) | 4,847826 | 21,651093 | FALSE |
| Cerviks – Referentni sojevi (Doksiciklin MCC) | 0,6304348 | 21,651093 | FALSE |
| Cerviks – Referentni sojevi (Levofloksacin MIC) | 8,739130 | 21,651093 | FALSE |
| Cerviks – Referentni sojevi (Levofloksacin MCC) | 17,434783 | 21,651093 | FALSE |
| Uretra – Referentni sojevi (Azitromicin MIC) | 0,6176471 | 21,954628 | FALSE |
| Uretra – Referentni sojevi (Azitromicin MCC) | 1,2500000 | 21,954628 | FALSE |

| | | | |
|--|------------------|------------------|--------------|
| Uretra – Referentni sojevi (Doksiciklin MIC) | 1,617647 | 21,954628 | FALSE |
| Uretra – Referentni sojevi (Doksiciklin MCC) | 2,0882353 | 21,954628 | FALSE |
| Uretra – Referentni sojevi (Levofloksacin MIC) | 6,705882 | 21,954628 | FALSE |
| Uretra – Referentni sojevi (Levofloksacin MCC) | 12,235294 | 21,954628 | FALSE |

Brisevi cerviksa i brisevi muške uretre zajedno s eksprimatom prostate (bez referentnih sojeva) su uspoređeni i Mann-Whitneyevim U-testom ili testom sume rangova, kojim je potvrđena odsutnost statistički značajne razlike između te dvije skupine izolata (Tablica 21 i 22).

Tablica 21. Mann-Whitneyev U-test za analizu distribucijske razlike minimalnih inhibitornih koncentracija za sva tri antibiotika među izolatima cerviksa i muške uretre zajedno s eksprimatom prostate

| Antibiotik | Vrijednost testa (W) | p-vrijednost |
|-------------------|-----------------------------|---------------------|
| Azitromicin | 197 | 0,9748 |
| Doksiciklin | 255 | 0,0658 |
| Levofloksacin | 177 | 0,6049 |

Tablica 22. Mann-Whitneyev U-test za analizu distribucijske razlike minimalnih klamicidnih koncentracija za sva tri antibiotika među izolatima cerviksa i muške uretre zajedno s ekprimatom prostate

| Antibiotik | Vrijednost testa (W) | p-vrijednost |
|-------------------|-----------------------------|---------------------|
| Azitromicin | 193,5 | 0,9662 |
| Doksiciklin | 220,5 | 0,4641 |
| Levofloksacin | 146 | 0,1629 |



5. DISKUSIJA

Rezistencija bakterija na antibiotike bez sumnje je jedan od glavnih problema današnje medicine koji dovodi u pitanje ne samo liječenje zaraznih bolesti, već i daljnji medicinski napredak. Nije sporno kako su uvođenje penicilina u kliničku praksu ranih četrdesetih godina prošlog stoljeća (152) i posljedični razvoj brojnih antimikrobnih lijekova rezultirali visokim stupnjem zdravstvene zaštite kakva nam je danas poznata. No mehanizmi rezistencije uslijed brzog prilagođavanja različitih bakterijskih vrsta su brojni, tako da u kliničkoj praksi ne postoji antibiotik na koji rezistencija nije razvijena. Uzimajući u obzir da je 80% izolata bakterije *N. gonorrhoeae* danas rezistentno na neki od antimikrobnih lijekova, kao i godišnju incidenciju od 440 tisuća slučajeva multirezistentne tuberkuloze (što su samo dva primjera fakultativno unutarstaničnih bakterija), velik broj stručnjaka se slaže da smo već zakoračili u tzv. postantibiotsku eru (153).

Dosad se rezistenciji humanih klamidijskih vrsta nije pridavala velika pažnja. Naime, s obzirom da se *C. trachomatis* razmnožava isključivo u citoplazmi stanice osjetljivog domaćina, prevladava mišljenje kako je stjecanje rezistencije rijedak moment u životnom ciklusu tog mikroorganizma. Ipak, kontinuirana i višestruka primjena antibiotika može za posljedicu imati razvoj kompenzatornih mutacija u zahvaćenim klamidijskim sojevima, bez obzira na eventualni gubitak sposobnosti (engl. *fitness cost*) izazvan primarnom mutacijom (154). Mogućnost selekcije antimikrobne rezistencije uslijed izlaganja subinhibitornim koncentracijama antibiotika u laboratorijskim uvjetima sugerira da bi analogni mehanizam mogao djelovati i kao izvor rezistentnih klamidijskih sojeva u ljudi (ili životinja) izloženih antimikrobnoj terapiji (92).

Ovaj rad predstavlja prvo istraživanje osjetljivosti kliničkih izolata *C. trachomatis* na standardno propisivane antibiotike u Republici Hrvatskoj, ali i na antimikrobni lijek

levofloksacin iz skupine fluorokinolona III generacije čija se šira oralna primjena u našoj zemlji tek očekuje. 23 izolata iz obrisaka vrata maternice, 16 izolata iz obriska muške uretre te jedan izolat iz eksprimata prostate podvrgnuti su rastućim koncentracijama azitromicina, doksiciklina i levofloksacina u kulturi McCoy stanica. Svi testirani izolati imali su MIC i MCC ≤ 2 $\mu\text{g/ml}$ za sva tri testirana antimikrobna lijeka, dakle bili su osjetljivi na njihovu antimikrobnu aktivnost, što potvrđuje hipotezu ovog istraživanja. Obrazac „homotipne“ ili „heterotipne rezistencije“ nije pronađen kod niti jednog testiranog izolata.

Za sve izolate raspon MIC-a azitromicina je iznosio 0,064 – 0,125 $\mu\text{g/ml}$, doksiciklina 0,016 – 0,125 $\mu\text{g/ml}$, a levofloksacina 0,125 – 1,0 $\mu\text{g/ml}$; raspon MCC-a azitromicina je iznosio 0,064 – 2,0 $\mu\text{g/ml}$, doksiciklina 0,032 – 1,0 $\mu\text{g/ml}$, a levofloksacina 0,125 – 2,0 $\mu\text{g/ml}$. Vrijednosti MCC-ova bile su jednake vrijednostima MIC-ova, ili su bile više u rasponu od jednog do pet razrjeđenja, što ukazuje da je u slučaju određenih izolata potrebna znatno viša koncentracija antimikrobnog lijeka za postizanje potpune klamicidne aktivnosti *in vitro*. Takvi otporniji sojevi mogli bi biti odgovorni za neuspjeh liječenja klamidijske infekcije.

Nekoliko je studija identificiralo mehanizme na koje bi antibiotska terapija u kliničkom okružju ili kod dugotrajnih infekcija mogla dovesti do fenotipske rezistencije na antimikrobne lijekove koji su inače vrlo učinkoviti u liječenju klamidijskih infekcija. Tako su Wyrick i Knight pokazali da perzistentna *C. trachomatis* prethodno tretirana penicilinom postaje refrakтерна na učinak azitromicina (155). Nadalje, Clark i suradnici su ultrastrukturnom analizom pokazali kako eritromicin sprječava diferencijaciju ET u RT ako se doda unutar 12 sati od infekcije, a u razdoblju između 18 i 24 sata od infekcije dovodi do pojave RT duplo većeg promjera u usporedbi s netretiranim kontrolnim sojem, što je put prema perzistentnoj

infekciji (156). Istraživana je i mogućnost efluksog mehanizma kao strategije u preživljavanju klamidijskih sojeva pri suočavanju s antimikrobnim lijekom (96).

Kao glavni čimbenik u razvoju rezistencije klamidijskih sojeva sve se više razmatra lateralni prijenos gena – proces prepoznat u evoluciji tog mikroorganizma (125,157). Takav prijenos genskog materijala se kod miješanih infekcija s različitim sojevima lako može detektirati u laboratorijskim uvjetima (120). U studiji Sayade i suradnika (ali i u drugim radovima) navodi se kako je bar nekoliko postotaka infekcija u ljudi uzrokovano više od jednim sojem *C. trachomatis*, što stvara plodno tlo za njihovu rekombinaciju (158). Premda se smatra da je prijenos gena za rezistenciju ovim mehanizmom rijedak događaj, potrebna su dodatna istraživanja na kliničkim izolatima (napose rezistentnim) te primjena komparativne i funkcionalne genomike kako bi se odredio stupanj i raznolikost rekombinacije (159).

Među članicama projekta The European Surveillance of Antimicrobial Consumption (ESAC), koji je za cilj imao praćenje korištenja antimikrobnih lijekova u pojedinim europskim zemljama, Hrvatska s 23,37 DDD na 1000 stanovnika spada među države s velikom izvanbolničkom potrošnjom antibiotika (160). U toj skupini se još nalaze Francuska i Italija. Prema istraživanju iz 2010. godine, stope propisivanja azitromicina i sulfonamida u našoj zemlji najviše su u Europi (161), uz naglašeno visoke stope propisivanja tetraciklina (posebice doksiciklina) i fluorokinolona (161). Takva pretjerana potrošnja antimikrobnih lijekova predstavlja nezanemariv potencijal razvoja i daljnjeg širenja antibiotske rezistencije.

U tom je pravcu neke istraživače zanimao utjecaj masovne distribucije antimikrobnih lijekova (konkretno azitromicina) na pojavu rezistencije klamidijskih sojeva u područjima endemske prisutnosti trahoma (162,163). Naime, u tim se krajevima nakon prekida masovne distribucije

lijekova infekcija često vraća, stoga postoji bojazan da bi pojava rezistentnih sojeva mogla rezultirati nemogućnošću lokalne eliminacije trahoma (164). 18 mjeseci nakon četiri polugodišnja režima liječenja na području Etiopije, u razdoblju između 2003. i 2004. godine, Hong i suradnici nisu pronašli značajne razlike u osjetljivosti na azitromicin i doksiciklin u usporedbi s kontrolnim uzorcima prije provedene terapije (162).

Na sličan je način Solomon sa suradnicima u Tanzaniji promatrao osjetljivost klamidijских sojeva izoliranih iz briseva spojnice osoba s aktivnim trahomom i pozitivnim nalazom PCR-a za okluarnu *C. trachomatis*, i to prije (43 izolata) te dva mjeseca nakon (9 izolata) provedenog masovnog antibiotskog liječenja (163). Svaki je stanovnik u terapiji dobio jednokratnu dozu azitromicina ili tetraciklinsku mast za oči u slučaju prisutne alergije. Premda nisu pronašli rezistentne sojeve, uočen je blag porast centralne vrijednosti ili medijana MIC-a u izolatima nakon završetka liječenja (162,163).

Pojava klamidijских sojeva rezistentnih na antimikrobne lijekove može se očekivati tek nakon višestruko provedenih kura liječenja. Primjerice, u Nepal su sojevi bakterije *S. pneumoniae* s rezistencijom na azitromicin uočeni tek nakon uzastopnih godišnjih terapijskih režima u svrhu liječenja trahoma (165); selektivni pritisak ponavljane distribucije azitromicina (ali i drugih antibiotika) mogao bi omogućiti rapidno širenje rezistentnih klonova (166). Stoga se s pravom postavlja pitanje ima li široka potrošnja antibiotika i u kojoj mjeri utjecaj na osjetljivost sojeva *C. trachomatis*. Odgovore na takva pitanja treba tražiti skriningom antimikrobne osjetljivosti kliničkih klamidijских izolata u zemljama s visokom stopom propisivanja antibiotika.

Upravo je zbog toga utvrđivanje profila osjetljivosti klamidijskih izolata bila jedna od primarnih motivacija za izradu ovog rada. Od Europskih zemalja slične su studije provedene u Izraelu (167) i Italiji (137), a višestruko u SAD-u, ponajviše zbog usporedbe učinkovitosti standardne terapije s nekim novim antibiotikom (168-174). Četiri istraživanja (92,137,167,175) koja su se držala preporučene metodologije za testiranje osjetljivosti klamidijskih izolata izabrana su kao referentne točke za usporedbu s rezultatima dobivenim u ovom istraživanju (Slika 51 i 52 na kraju diskusije).

Jedno od njih upravo je i metodološki vrijedno istraživanje Suchlanda i suradnika koje je utvrdilo standarde za daljnja istraživanja antimikrobne osjetljivosti *C. trachomatis* (92). Za potrebe usporedbe s koncentracijama dobivenim na hrvatskim sojevima korištene su vrijednosti ispitivanja klamidijskih izolata na McCoy stanicama; naime, u istraživanju su pojedini klamidijski izolati usporedno testirani i u drugim staničnim linijama (HeLa, BGMK, HEp-2, HL i Vero). Ispitivanju je podvrgnuto ukupno 42 klinička izolata te 4 referentna soja iz CDC-a. Raspon MIC-ova bio je od 0,125 do 0,25 µg/ml za azitromicin, od 0,064 do 0,125 µg/ml za doksiciklin, te od 0,5 do 1,0 µg/ml za ofloksacin. Raspon MCC-ova bio je za jedno razrjeđenje veći od raspona MIC-ova, te se kretao od 0,25 do 0,5 µg/ml za azitromicin, od 0,125 do 0,25 µg/ml za doksiciklin, te od 1,0 do 2,0 µg/ml za ofloksacin.

Samra i suradnici su u Izraelu proveli istraživanje na 50 kliničkih sojeva *C. trachomatis* (31 od muških ispitanika te 19 od ženskih ispitanika) izoliranih iz 45 uzoraka genitalnog trakta te 5 uzoraka spojnice oka u razdoblju između 1997. i 1999. godine (167). Među testiranim antibioticima bili su azitromicin i doksiciklin, potonji sa slabijom antimikrobnom aktivnošću *in vitro*. Raspon MIC-ova se za azitromicin kretao od 0,064 do 0,125 µg/ml, a za doksiciklin od 0,064 do 0,25 µg/ml. Raspon MCC-ova se je za azitromicin bio između 0,064 i 0,25 µg/ml,

a za doksiciklin između 0,125 i 4,0. Dakle, MCC doksiciklina je u nekim slučajevima bio za četiri razrjeđenja viši od pripadajućeg MIC-a. Za azitromicin MIC₅₀ je iznosio 0,064 µg/ml, MCC₅₀ 0,125 µg/ml, MIC₉₀ 0,125 µg/ml, a MCC₉₀ 0,25 µg/ml. Za doksiciklin MIC₅₀ je iznosio 0,125 µg/ml, MCC₅₀ 0,5 µg/ml, MIC₉₀ 0,25 µg/ml, a MCC₉₀ 2,0 µg/ml.

Roblin je 2010. godine sa suradnicima u ispitivanju učinkovitosti novog fluoriranog ketolidnog antibiotika testirao ukupno 10 klamidijskih izolata koji su uključivali standardne i kliničke sojeve *C. trachomatis* (potonji su izolirani iz cervikalnih briseva i spojnice oka dojenčeta) (175). U usporednoj analizi su, između ostaloga, korišteni azitromicin i doksiciklin. Rasponi MIC-ova i MCC-ova za azitromicin bili su identični i iznosili su od 0,016 do 0,125 µg/ml. Rasponi MIC-ova i MCC-ova za doksiciklin također su bili jednaki i kretali se od 0,016 do 0,064 µg/ml. MIC₅₀, MCC₅₀, MIC₉₀, a MCC₉₀ za azitromicin imali su vrijednost 0,125 µg/ml. MIC₅₀, MCC₅₀, MIC₉₀, a MCC₉₀ za doksiciklin iznosili su 0,064 µg/ml.

Nedavno objavljeni rad Donati i njenih kolega iz Italije sadrži sistematsku evaluaciju osjetljivosti urogenitalnih sojeva *C. trachomatis* (serovari od D do K) na eritromicin, klaritromicin, azitromicin, doksiciklin i levofloksacin (137). Testiranjem je obuhvaćeno ukupno 45 kliničkih izolata (dobivenih od muških pacijenata s negonokoknim uretritisom te ženskih pacijenata s cervicitisom) i 5 referentnih sojeva. MIC-ovi za azitromicin bili su u rasponu od 0,25 do 0,5 µg/ml, za doksiciklin od 0,03 do 0,06 µg/ml, a za levofloksacin od 0,25 do 0,5 µg/ml. MCC-ovi su se kretali od 0,5 µg/ml do 1,0 µg/ml za azitromicin, od 0,03 do 0,06 µg/ml za doksiciklin te od 0,25 do 1,0 µg/ml za levofloksacin. MCC-ovi su, osim u slučaju levofloksacina, bili veći za jedno do dva razrjeđenja usporedivši ih s pripadajućim MIC-ovima.

Kao i u našem istraživanju, u navedenim radovima nisu pronađeni rezistentni izolati. Ipak, međusobnom usporedbom rezultata moguće je primijetiti nekoliko zanimljivih trendova. MIC-ovi i MCC-ovi za levofloksacin dobiveni na hrvatskim sojevima podudaraju se s istraživanjem Donati i suradnika, te s vrijednostima ofloksacina u Suchlandovoj studiji. MIC-ovi za doksiciklin također su podudarni u svih pet istraživanja, dok je MCC za taj antimikrobni lijek u istraživanju Samre i suradnika istaknuto viši u usporedbi s preostale četiri studije. Premda su vrijednosti MIC-ova za azitromicin nešto viši samo u istraživanju Donati i suradnika, MCC-ovi za azitromicin su vidljivo viših vrijednosti ne samo u tom, nego i u našem istraživanju.

Teško je objasniti navedene razlike u koncentracijskim rasponima između različitih studija. Promatrajući samo najviše vrijednosti MCC-ova, u Samrinoj studiji se za doksiciklin ona nalazi na samoj granici rezistencije (4,0 µg/ml). MCC za azitromicin u istraživanju Donati i suradnika doseže 1,0 µg/ml, a u našem istraživanju 2,0 µg/ml. Iako samo jedan klinički soj izoliran iz hrvatskih pacijenata doseže tu koncentraciju (Tablica 8, Izolat br. 2), MCC za azitromicin iznosi 1,0 µg/ml kod čak 23,5% izolata iz obrisaka muške uretre i eksprimata prostate (Slika 21) te kod 12,5% svih testiranih izolata (Slika 27).

Koncentracijske vrijednosti testiranih referentnih sojeva (serovar E Bour i serovar F ICCal) podudaraju se s medijanima (MIC₅₀) ili su za jedno razrjeđenje viši od medijana urogenitalnih klamidijskih izolata iz hrvatskih pacijenata. Uključivanje tih sojeva u studiju je itekako vrijedno jer nam pruža dobar orijentir koliko koncentracije nekih sojeva uistinu odskaču od dobivenih referentnih vrijednosti u našem modelu. Tako je, primjerice, MCC azitromicina i doksiciklina već gore spomenutog izolata muške uretre (Tablica 8, izolat br. 2) za četiri razrjeđenja veći od referentnog soja serotipa F ICCal.

Ipak, treba napomenuti kako statističkom analizom u našem radu nije dokazana značajna razlika u vrijednostima MIC-ova i MCC-ova ovisno o vrsti kliničkog uzorka, odnosno mjesta infekcije. Premda nam to sugerira da ne postoji anatomski povlašeno mjesto gdje bi *C. trachomatis* lakše stekla otpornost i dovela do pojave viših vrijednosti MIC-ova i MCC-ova testiranih antimikrobnih lijekova, za takvu tvrdnju svakako manjka veći broj izolata iz eksprimata prostate. Također se u obzir mora uzeti i cirkuliranje klamidijjskih sojeva između partnera u sklopu tzv. „ping-pong efekta“.

Zanimljivo je kako su upravo Hrvatska i Italija, gdje su pronađeni najviši MCC-ovi za azitromicin, zemlje s najvišom stopom propisivanja tog antibiotika u Europi (161). S druge strane, u Izraelu se za liječenje klamidijjskih infekcija koristi isključivo doksiciklin, dok se azitromicin izbjegava zbog njegove visoke cijene (167). Premda je prema našim rezultatima možda prerano govoriti o mogućem skretanju antimikrobne osjetljivosti klamidijjskih sojeva prema višim vrijednostima MIC-ova i MCC-ova, kao i potencijalnom razvoju rezistencije, takav bi se hipotetski scenarij dugoročno svakako morao uzeti u obzir ukoliko se nastavi neracionalna potrošnja antibiotika kako kod nas, tako i u drugim zemljama svijeta.

Profil antimikrobne osjetljivosti *C. trachomatis* ne ovisi samo o antibiotskom opterećenju, nego i o okolišnim uvjetima te čimbenicima specifičnim za stanice domaćina, što također treba uzeti u obzir. Već je prepoznat utjecaj koncentracije kisika u ženskom urogenitalnom traktu na uspješnost antibiotskog liječenja (176,177). Također se uvidjelo kako patogeni mikroorganizmi iskorištavaju citoskelet domaćina za ulazak, kolonizaciju i preživljavanje unutar eukariotskih stanica (178). *C. trachomatis* se isto tako koristi aktinom i intermedijarnim filamentima za stvaranje dinamičkog omotača koji klamidijjskoj vakuoli

pruža strukturalni integritet, dočim istovremeno osigurava preživljavanje redukcijom imunološkog odgovora (179). Dakle, daljnje proučavanje čimbenika od strane domaćina nužno je za cjelovito shvaćanje antimikrobne osjetljivosti ovog uzročnika.

Rezultati kliničkih studija podudaraju se sa obrascem laboratorijske osjetljivosti klamidijskih sojeva kako u našem, tako i u drugim istraživanjima. U našoj se studiji najučinkovitijim *in vitro* pokazao doksiciklin ($MIC_{50} = 0,032 \mu\text{g/ml}$, $MCC_{50} = 0,064 \mu\text{g/ml}$), kojeg slijedi azitromicin s vrlo bliskim koncentracijskim vrijednostima ($MIC_{50} = 0,064 \mu\text{g/ml}$, $MCC_{50} = 0,125 \mu\text{g/ml}$), dok je najslabiju aktivnost iskazao levofloksacin s u prosjeku vrijednostima višim za dva razrjeđenja ($MIC_{50} = 0,25 \mu\text{g/ml}$, $MCC_{50} = 0,5 \mu\text{g/ml}$). Na takav međuodnos također ukazuju MIC_{90} i MCC_{90} (ona koncentracija koja inhibira rast, tj. djeluje klamicidno na 90% testiranih klamidijskih izolata), a potvrđen je i formalnom statističkom analizom.

Statistički značajna korelacija pronađena je kod MCC-ova azitromicina i levofloksacina te doksiciklina i levofloksacina, što znači da sojevi kojima je potrebna veća koncentracija azitromicina ili doksiciklina za postizanje klamicidnog efekta trebaju i veću koncentraciju levofloksacina. Nedavnim uvođenjem levofloksacina u kliničku praksu važno je taj podatak uzeti u obzir, budući da bi neuspjeh eradikacije *C. trachomatis* nakon provedenog liječenja azitromicinom ili doksiciklinom mogao zahtijevati veću dozu ili dulje trajanje terapije levofloksacinom.

Sukladno obrascu laboratorijske osjetljivosti na antimikrobne lijekove u ovom istraživanju brojne hrvatske i strane kliničke studije ukazuju na sličan terapijski odgovor *in vivo*: dakle, komparabilnu učinkovitost doksiciklina i azitromicina te nešto slabiji odgovor na fluorokinolone. Ossewaarde je sa suradnicima u Nizozemskoj usporedio učinkovitost

azitromicina i doksiciklina u liječenju infekcija vrata maternice uzrokovanih *C. trachomatis* (180). Njihov zaključak jest da je jednokratna doza azitromicina jednako učinkovita kao i sedmodnevno liječenje doksiciklinom kod klamidijom uzrokovanog cervicitisa.

Škerk i suradnici su u Hrvatskoj na uzorku od 150 pacijentica s akutnim uretralnim sindromom uzrokovanim *C. trachomatis* također došli do sličnih spoznaja, uz naglašene razlike u učinkovitosti različitih terapijskih režima ovisno o trajanju simptoma prije započinjanja terapije (manje ili više od tri tjedna) (181). Tako je u skupini žena kod kojih su klinički simptomi prije početka terapije trajali tri tjedna ili više statistički značajnije izlječenje uz eradikaciju postignuto nakon administracije azitromicina u dozi od 500 mg dnevno tijekom 6 dana, nego nakon jednokratne doze od 1 g. Također, bolji efekt se u toj skupini postigao davanjem doksiciklina u dozi 2 x 100 mg dnevno kroz 14 dana nego u istoj dozi kroz 7 dana.

U terapiji negonokoknog uretritisa Lauharanta i suradnici su na uzorku od 60 simptomatskih muškaraca s pozitivnim nalazom *C. trachomatis* u prospektivnoj randomiziranoj studiji usporedili učinkovitost jednokratne doze azitromicina sa sedmodnevnom kurom doksiciklina (182). Iako je kumulativna stopa eradikacije pet tjedana po završenoj terapiji bila neznatno bolja za doksiciklin (93%) nego azitromicin (87%), nije pronađena statistički značajna razlika u kliničkoj učinkovitosti ova dva tretmana. Lister i suradnici došli su do jednakog zaključka u studiji na 51 pacijentu s klamidijskim uretritisom (183), a Khosropour je sa suradnicima u recentnoj studiji na muškim pacijentima s rektalnom klamidijskom infekcijom dokazao veću učinkovitost doksiciklina u usporedbi s azitromicinom (184). Whatley i suradnici naglašavaju prednost trodnevnog uzimanja azitromicina u boljoj redukciji upalnog odgovora, premda je klirens *C. trachomatis* bio zadovoljavajuć i kod jednokratne primjene azitromicina i kod jednotjedne primjene doksiciklina (185).

U Hrvatskoj su provedene komparativne analize učinkovitosti antimikrobnih lijekova u liječenju kroničnog klamidijskog prostatitisa (186,187). Škerk je sa suradnicima na uzorku od 125 odraslih simptomatskih pacijenata s dokazanom infekcijom *C. trachomatis* pokazala jednaku učinkovitost u eradikaciji i stopi kliničkog izlječenja kod primjene 4 g azitromicina tijekom 4 tjedna (1 x 1000 mg tjedno) te 2 x 100 mg doksiciklina dnevno tijekom 28 dana (186). Usporedbom učinkovitosti azitromicina (ukupno 4,5 g u razdoblju od tri tjedna) i ciprofloksacina (2 x 500 mg dnevno tijekom 20 dana) na uzorku od 89 pacijenata, u skupini liječenoj azitromicinom došlo je do statistički značajno veće stope kliničkog izlječenja i eradikacije infekta nego u skupini liječenoj ciprofloksacinom (187).

I drugi radovi ukazali su na blago reduciranu učinkovitost fluorokinolona u usporedbi s terapijom prvog izbora u liječenju klamidijskih infekcija (188-190). Zbog toga se u pacijenata s klamidijskim prostatitisom te u pacijenata s upalnim ili neupalnim oblikom sindroma zdjelice boli (uz *C. trachomatis* u podlozi) ne preporučuje uvođenje ciprofloksacina u terapiju (81,190). Nadalje, neki autori savjetuju kombiniranu terapiju makrolidima i fluorokinolonima kako bi se postigla eradikacija *C. trachomatis*, napose u pacijenata sa simptomima kroničnog prostatitisa (191).

Levofloksacin je u Republici Hrvatskoj registriran 2011. godine kao jedini fluorirani kinolon treće generacije (192), a već se dulje vrijeme nalazi u preporukama CDC-ja kao jedan od alternativnih režima liječenja klamidijskih infekcija (75) (Tablica 2). Osim brzog baktericidnog djelovanja i posjedovanja postantibiotičkog učinka, prednosti njegove primjene su izvrsna biološka valjanost, niska toksičnost, dobra tkivna distribucija i postizanje visokih koncentracija u prostati (193). Nedavna istraživanja učinkovitosti levofloksacina u terapiji

kroničnog bakterijskog prostatitisa ističu prednost primjene jednom dnevno, što osigurava bolju suradljivost bolesnika (194-196). Najnovija studija Zhanga i suradnika iz Kine ukazuje na određene prednosti pred ciprofloksacinom u pogledu kliničke učinkovitosti i sprječavanja rekurentnih infekcija, te manjeg broja nuspojava (197).

S obzirom na tek nedavnu registraciju lijeka, u našoj zemlji još nema kliničkih istraživanja o učinkovitosti levofloksacina u liječenju klamidijских infekcija. U tu problematiku detaljno su proniknuli japanski istraživači (198-201). Chimura i koautori opisali su značajno nakupljanje lijeka u cervikalnoj sluzi te 100%-tnu učinkovitost u terapiji klamidijского cervicitisa bez subjektivnih ili objektivnih nuspojava kod ispitanika (198). Druga studija je pokazala kako uzimanje levofloksacina jednom dnevno dovodi do smanjenja razine proupalnih citokina u cervikalnoj sluzi; konkretno IL-6 i IL-8 (199). Mikamo i suradnici zaključili su kako je sedmodnevno liječenje levofloksacinom adekvatno i učinkovito kod upale vrata maternice uzrokovane *C. trachomatis* (200,201).

Studija Takahashija i suradnika iz 2011. godine koncentrirala se na mikrobiološku i kliničku učinkovitost oralnog liječenja levofloksacinom tijekom sedam dana u muškaraca s negonokoknim uretritisom (202). Ishod u bolesnika s dokazanom klamidijском infekcijom bio je usporediv s jednokratnom primjenom azitromicina u dozi od 1000 mg. Treba naglasiti i kako su faringealne klamidijске infekcije danas u porastu, a studija provedena na pacijenticama iz opće populacije i pružateljicama seksualnih usluga u Japanu potvrdila je bolju učinkovitost levofloksacina za tu indikaciju u usporedbi s azitromicinom i klaritromicinom (203). Stopa eradikacije nakon sedam dana terapije iznosila je 86,2%, a nakon deset i četrnaest dana čak 100%.

Unatoč tome što su rezultati našeg istraživanja ukazali na slabiju djelotvornost levofloksacina *in vitro* u usporedbi s antibioticima prvog izbora, dosadašnja istraživanja pokazuju da bi njegova klinička učinkovitost (uslijed povoljnijeg farmakokinetškog i farmakodinamskog profila) mogla biti bolja od ciprofloksacina i drugih fluorokinolona koji se trenutno primjenjuju. Zajedno s metronidazolom već pokazuje veliki potencijal u liječenju zdjelice upalne bolesti (204), a u laboratoriju se također teže izaziva rezistencija klamidijskih sojeva uslijed izlaganja subinhibitornim koncentracijama levofloksacina (118) u usporedbi s drugim fluorokinolonima (116). Osim toga, rezistentni sojevi u ovom istraživanju nisu pronađeni, a MIC-ovi i MCC-ovi levofloksacina usporedivi su s istraživanjem Donati i suradnika (MIC₅₀ je za jedno razrjeđenje manji kod hrvatskih sojeva).

Uz tako dobar klinički odgovor na terapiju, važno je pokušati dokučiti zbog čega se rekurentna ili perzistentna infekcija *C. trachomatis* javlja u čak 10-15% pravilno liječenih žena (205). Pozitivan bi nalaz mogao biti posljedica reinfekcije uslijed nezaštićenog spolnog odnosa s neliječenim zaraženim partnerom, zatim neuspjeha liječenja zbog slabe suradljivosti pacijenta, neadekvatne apsorpcije lijeka ili antimikrobne rezistencije, a u obzir dolazi i reaktivacija perzistentne infekcije uzrokovane čimbenicima vezanim uz domaćina (imunološki odgovor) ili opet zbog antimikrobne rezistencije. Teško je sa sigurnošću razlikovati reinfekciju od neuspjeha liječenja budući da ponovno izlaganje ponekad nije moguće pouzdano isključiti, a jasna korelacija između nalaza *in vitro* i ishoda liječenja nije dokazana (92).

Na antimikrobnu rezistenciju *C. trachomatis* može se posumnjati kada imamo laboratorijski potvrđenu perzistentnu infekciju nakon provedenog liječenja u osobe koja nije imala spolne odnose nakon završenog liječenja, koja je imala spolne odnose samo s liječenim partnerom te

koja je koristila prezervative pri svakom spolnom odnosu nakon provedenog liječenja (206). Stroža definicija moguće antimikrobne rezistencije u obzir bi uzela samo prvu mogućnost, dakle apstinenciju od spolnih odnosa po završetku liječenja. Nalaz istog serovara *C. trachomatis* prije i poslije liječenja također ukazuje na perzistentnu infekciju, premda nije apsolutni dokaz iste (207).

Potrebno je odrediti optimalan vremenski okvir tzv. postterapijskog intervala u kojem bi se perzistentna klamidijska infekcija mogla pripisati antimikrobnoj rezistenciji. Početak postterapijskog intervala realno varira između 7 i 14 dana po završetku liječenja, ovisno o primjenjenom dijagnostičkom testu (206). Kraj bi se mogao odrediti 1-3 mjeseca nakon završetka liječenja, s tim da treba imati na umu kako nije svejedno koji se od antimikrobnih lijekova koristi u terapiji (208). Ako za postterapijski interval uzmemo dulji vremenski period, automatski osiguravamo veću osjetljivost za detekciju neuspjeha liječenja; s druge pak strane, kraći postterapijski interval smanjuje vjerojatnost da se radi o reinfekciji, što povećava specifičnost.

Kod procjene neuspjeha liječenja u obzir treba uzeti značajke dijagnostičkih testova za detekciju *C. trachomatis*. Uzgoj u staničnoj kulturi smanjuje broj lažno pozitivnih rezultata koji se mogu javiti korištenjem drugih metoda – posebice u slučaju kratkog postterapijskog intervala te prisutnosti mrtvih mikroorganizama (209). Ipak, važno je naglasiti inherentno slabiju osjetljivost kultivacije u usporedbi s molekularnim metodama. NAA testovi imaju izvanrednu osjetljivost i mogu se koristiti s transportnim medijem koji u slučaju pozitivnog nalaza dozvoljava izolaciju i u kulturi (206). S njihovom primjenom se savjetuje pričekati barem 14 dana (a optimalno tri tjedna) nakon završetka liječenja kako bi se izbjegla detekcija rezidualne nukleinske kiseline (210,211).

Ono što se također htjelo postići našim istraživanjem jest uspostava metodologije te stvaranje baze antimikrobnog profila kliničkih klamidijskih izolata za daljnja uspoređivanja. Sustavno nadziranje slučajeva neuspješnog liječenja klamidijskih infekcija u jednom ili više centara moglo bi omogućiti kliničko i epidemiološko praćenje trendova terapijskog neuspjeha, povezati takve slučajeve s antimikrobnom otpornošću te mikrobiološki evaluirati karakteristike i mehanizme rezistencije ako se ista dokaže. Navedeno bi se moglo postići pasivnim nadzorom gdje bi se ustanovio registar neuspješnog liječenja te skupljali izolati tih pacijenata za potrebe testiranja antimikrobne osjetljivosti, ali i aktivnim nadzorom pomoću prospektivnog protokola uz uvođenje obvezatnog testiranja nakon provedene terapije (206).

No premda su Suchland i suradnici dali enorman doprinos prema standardizaciji određivanja antimikrobne osjetljivosti *C. trachomatis* (92), priča je daleko od završene. Za početak je nužno postići konsenzus oko granične vrijednosti kojom ćemo definirati osjetljive i rezistentne klamidijske sojeve. S obzirom da su u prethodnim studijama izolati povezani s neuspješnim liječenjem pokazivali MIC veći od 4 µg/ml (85-90), ta je vrijednost uzeta kao granica i u hipotezi ovog istraživanja. Nadalje, bez obzira na prednost korištenja McCoy stanica, potrebno je definirati koje su sve stanične linije prikladne u testiranju antimikrobne osjetljivosti te rasvijetliti čimbenike što doprinose razlikama u koncentracijskim vrijednostima ovisno o korištenoj staničnoj liniji.

Iskustva iz mikologije uče nas kako je dug put do standardizacije određenih metoda za određivanje antimikrobne osjetljivosti, pa tako do dan danas nismo u mogućnosti adekvatno interpretirati MIC-ove za velik broj gljivičnih izolata (212,213). S obzirom da se većina istraživača danas pridržava Suchlandovih kriterija, za klamidijske izolate možemo reći da smo

na dobrom putu. Ipak, izrada antibiograma u staničnoj kulturi je zahtjevna i skupa, a za testiranje samo jednog soja potrebno je nekoliko tjedana, zbog čega se ona još uvijek provodi samo u specijaliziranim laboratorijima i mahom u znanstvene svrhe. Ono što bi vjerojatno olakšalo situaciju i ubrzalo čitav proces jest dobra molekularna metoda koja bi polako ušla u rutinsku primjenu. Nažalost, daljnji razvoj u tom pravcu praktički je stao nakon prikaza mogućnosti RT-PCR-a u kombinaciji sa staničnom kulturom 1999. godine (140).

Pri testiranju osjetljivosti klamidijskih sojeva posebnu pažnju valja obratiti na uvjete koji bi mogli utjecati na sposobnost *C. trachomatis* da inficira stanice u kulturi, ali i na aktivnost određenog antimikrobnog lijeka u istraživanom laboratorijskom modelu (92). Savjetuje se koristiti staničnu liniju s malim brojem pasaža uz obaveznu kontrolu kvalitete kako bi se smanjila varijabilnost rezultata. Stanična kultura uniformnog, tj. polariziranog rasta bi mogla biti konzistentnija u prihvatu antibiotika, no tehnički je mnogo zahtjevnija te se stoga rijetko koristi. Razrjeđenja antimikrobnih lijekova potrebno je pripremiti na način da se osigura njihova adekvatna potencija; dakle, pripremaju se neposredno prije dodavanja u netom inficirane stanice.

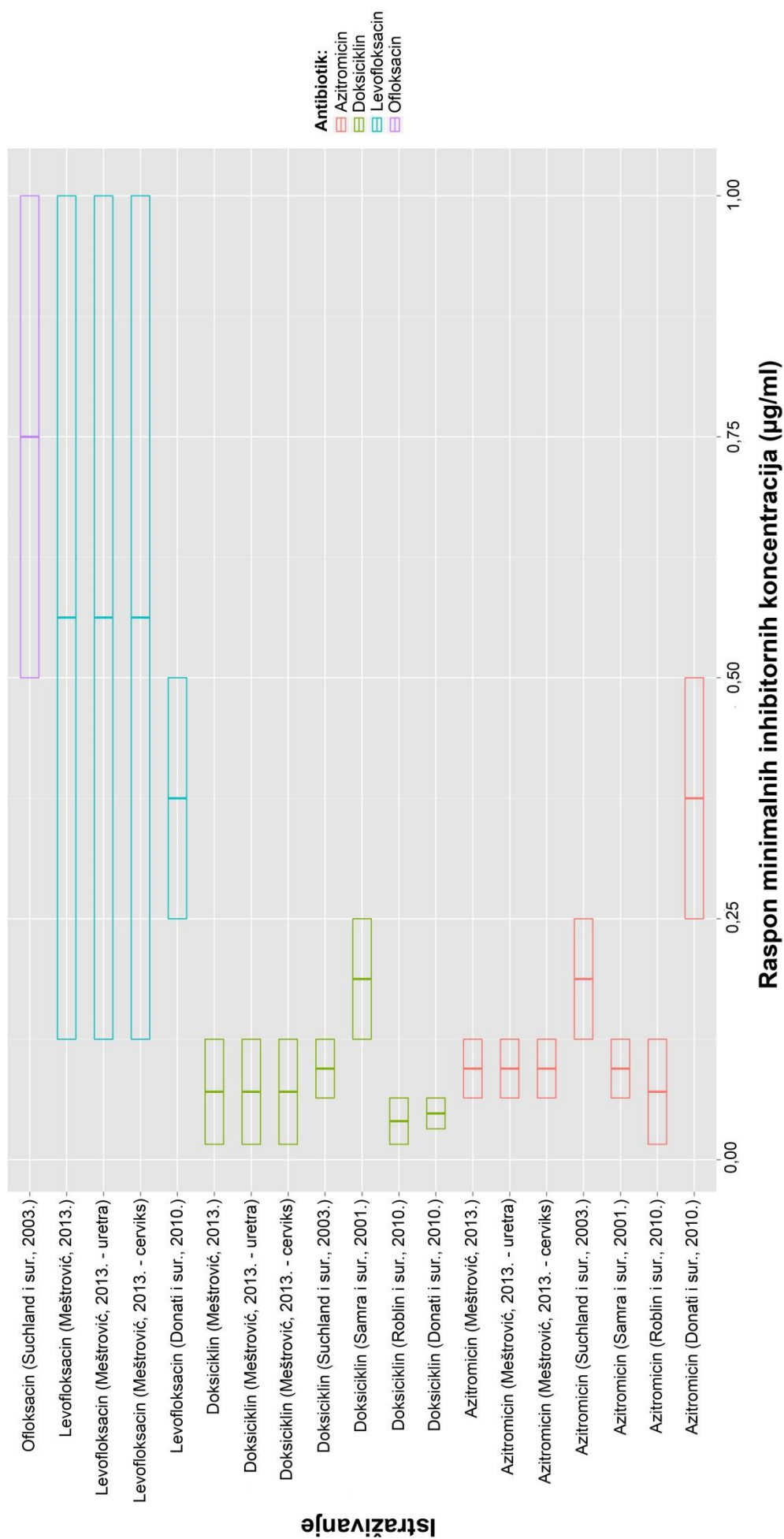
Ovo istraživanje provedeno je uz pridržavanje metodoloških principa Suchlanda i suradnika te drugih preporuka kojima se osigurava kvaliteta i reproducibilnost rezultata. Iako nije moguće sa sigurnošću isključiti scenarij da su neki izolati u našem istraživanju bili genetički povezani te tako utjecali na dobivenu distribuciju MIC-ova i MCC-ova, raspon od tri godine u prikupljanju uzoraka smanjuje tu mogućnost. Nadalje, premda je pokazano kako MCC-ovi određenih sojeva inkliniraju prema višim vrijednostima, zbog nedostupnosti genomskih tehnika nije moguće reći jesu li kod njih prisutne određene karakteristične genske mutacije.

Također bi za dobivanje potpunije slike rastu li koncentracijski medijani zbog visoke stope propisivanja antibiotika istraživanje trebalo ponoviti nakon izvjesnog vremenskog perioda.

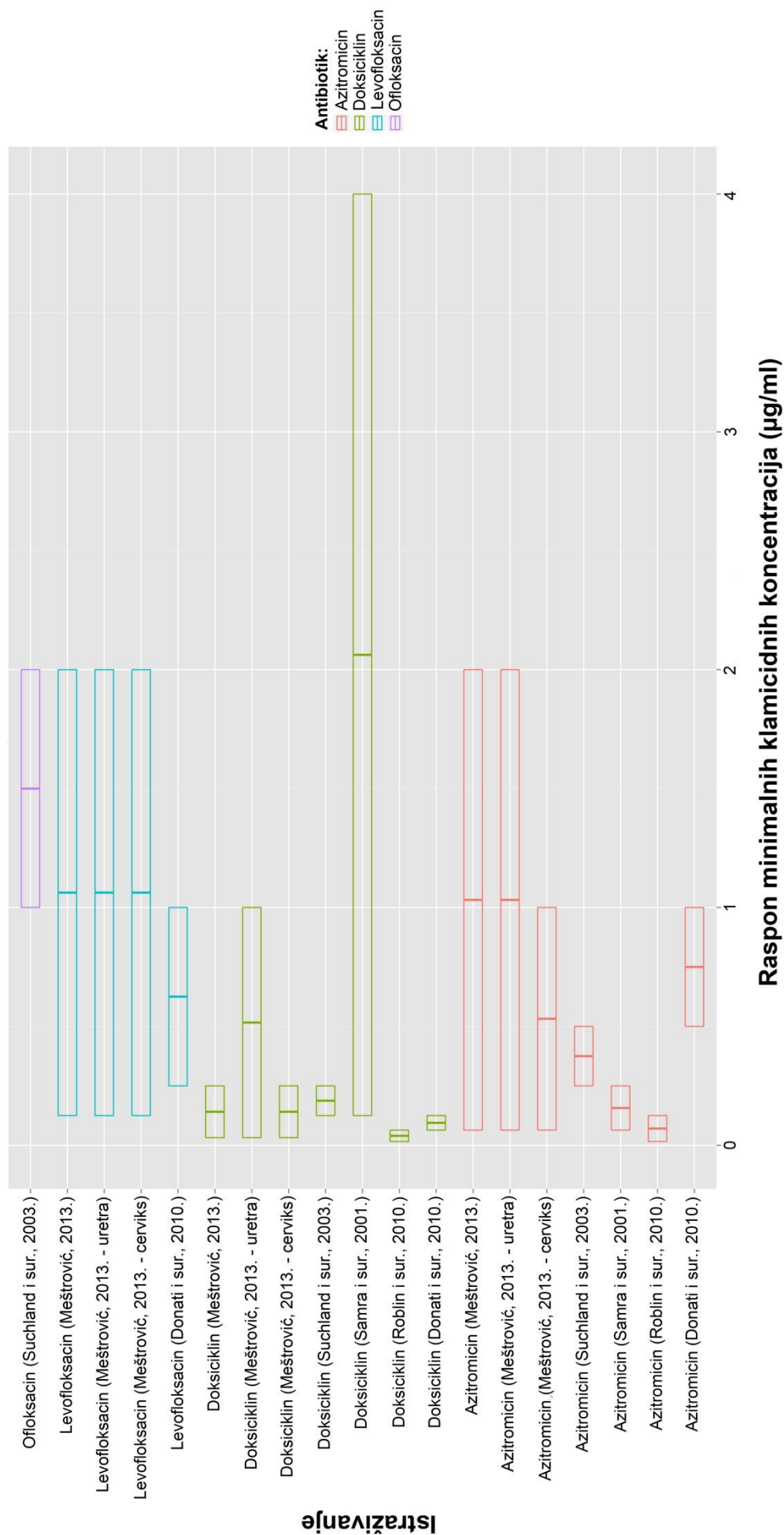
U našem istraživanju također nedostaju informacije o tome je li neki od testiranih izolata oduzet od pacijenta koji je prethodno proveo antibiotsko liječenje. Brojni dokazi ukazuju na činjenicu da neuspjeh liječenja nije rijedak događaj u kliničkoj svakodnevici, bez obzira na suradljivost, korištenje prezervativa, liječenje partnera ili ulasku u spolni odnos s novim partnerom (206). Važno je razlučiti je li antimikrobna rezistencija jedan od mogućih uzroka, stoga bi svaku neuspješno tretiranu infekciju spolno-mokraćnog sustava uzrokovanu *C. trachomatis* trebalo potvrditi (ili isključiti) metodom izolacije na staničnoj kulturi, a tako izolirane sojeve prosljediti u specijalizirani laboratorij radi određivanja antimikrobne osjetljivosti.

Izrada antibiograma klamidijских sojeva u zemljama s visokom stopom propisivanja antibiotika te kliničkih izolata nakon neuspjeha liječenja sigurno su ključni zadaci u daljnjem razumijevanju rezistencije ovog mikroorganizma, kao i korelacije nalaza *in vitro* s kliničkim ishodom. Ovo hrvatsko istraživanje predstavlja jedan od doprinosa prema ostvarenju tog cilja. Daljnjim razvojem brzih molekularnih metoda od kojih su neke već pred vratima (215) olakšat će se određivanje čimbenika koji mogu dovesti do razvoja rezistencije, a samim time unaprijediti naše razumijevanje ove složene problematike. Unutarstaničan život i druge osobitosti mikroorganizma *C. trachomatis* daju nam rijetku priliku biti korak ispred potencijalnog globalnog i klinički značajnog širenja rezistencije.

Slika 51. Međusobna usporedba raspona MIC-ova odabranih istraživanja antimikrobne osjetljivosti klamiđijskih izolata



Slika 52. Međusobna usporedba raspona MCC-ova odabranih istraživanja antimikrobne osjetljivosti kliničkih klamidijjskih izolata





6. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata provedenog istraživanja mogu se donijeti sljedeći zaključci:

1. Svi ispitivani sojevi bili su osjetljivi na azitromicin, doksiciklin i levofloksacin u uvjetima *in vitro* (MIC < 4 µg/ml). Obrazac „homotipne“ ili „heterotipne rezistencije“ nije pronađen kod niti jednog testiranog izolata.
2. Antimikrobna osjetljivost sojeva izoliranih iz obrisaka vrata maternice pokazuje najmanji koncentracijski raspon u slučaju MIC-ova za azitromicin (0,064 – 0,125 µg/ml), dok su najvećeg raspona MCC-ovi za azitromicin (0,064 – 1,0 µg/ml) i levofloksacin (0,125 – 2,0 µg/ml).
3. Antimikrobna osjetljivost sojeva izoliranih iz obrisaka uretre i eksprimata prostate pokazuje najmanji koncentracijski raspon u slučaju MIC-ova za azitromicin (0,064 – 0,125 µg/ml), dok su najvećeg raspona MCC-ovi za azitromicin (0,064 – 2,0 µg/ml) i doksiciklin (0,032 – 1,0 µg/ml).
4. Za sve izolate raspon MIC-a azitromicina je iznosio 0,064 – 0,125 µg/ml, doksiciklina 0,016 – 0,125 µg/ml, a levofloksacina 0,125 – 1,0 µg/ml. Raspon MCC-a azitromicina je iznosio 0,064 – 2,0 µg/ml, doksiciklina 0,032 – 1,0 µg/ml, a levofloksacina 0,125 – 2,0 µg/ml.
5. Vrijednosti MCC-ova bile su jednake vrijednostima MIC-ova, ili su bile više u rasponu od jednog do pet razrjeđenja.
6. Koncentracijske vrijednosti testiranih referentnih sojeva (serovar E Bour i serovar F ICCal) podudaraju se s medijanima (MIC₅₀) ili su za jedno razrjeđenje viši od medijana (MIC₅₀) urogenitalnih klamidijskih izolata iz hrvatskih pacijenata.
7. Uspoređivanjem vrijednosti MIC-ova i MCC-ova antimikrobnih lijekova pronađene su statistički značajne razlike u njihovoj učinkovitosti *in vitro*. Najjači antimikrobni učinak na testirane sojeve pokazuje doksiciklin (MIC₅₀ – 0,032 µg/ml, MCC₅₀ – 0,064

µg/ml), slijedi ga azitromicin (MIC₅₀ – 0,064 µg/ml, MCC₅₀ – 0,125 µg/ml), dok je najslabiju aktivnost iskazao levofloksacin (MIC₅₀ – 0,25 µg/ml, MCC₅₀ – 0,5 µg/ml).

8. Rezultati dobiveni *in vitro* podudaraju se s rezultatima kliničkih istraživanja u Hrvatskoj i svijetu, premda nedostaju studije koje bi direktno usporedile učinkovitost levofloksacina s učinkovitošću azitromicina i doksiciklina u terapiji klamidijskih infekcija *in vivo*.
9. Statistički značajna korelacija pronađena je u slučaju dva antimikrobna para za MCC-ove: azitromicina i levofloksacina, te doksiciklina i levofloksacina. U oba navedena slučaja sojevi kojima je potrebna veća koncentracija azitromicina ili doksiciklina za postizanje klamiciidnog efekta trebaju i veću koncentraciju levofloksacina.
10. Usporedba koncentracijskih medijana ovisno o vrsti kliničkog uzorka ne ukazuje na statistički značajnu razliku između briseva vrata maternice, briseva muške uretre zajedno s eksprimatom prostate te referentnih sojeva.
11. Vrijednost MCC-a azitromicina bila je ≥ 1 µg/ml kod 29,4% izolata iz obrisaka muške uretre i eksprimata prostate, tj. kod 15% svih testiranih izolata. U usporedbi s literaturnim podacima to ukazuje na mogući trend smanjene osjetljivosti klamidijskih sojeva na ovaj učestalo propisivani antibiotik, što je potrebno potkrijepiti dodatnim istraživanjima.



7. SAŽETAK

7.1. Sažetak na hrvatskom jeziku

Iako se dosad rezistenciji spolno-prenosive bakterije *Chlamydia trachomatis* nije pridavala velika pažnja zbog dobrog kliničkog odgovora na standardnu antibiotsku terapiju, neuspjesi liječenja povezani s laboratorijski dokazanom rezistencijom opisani su u literaturi. Hrvatska je zemlja s visokom stopom propisivanja antimikrobnih lijekova što može utjecati na pojavu rezistentnih ili slabije osjetljivih klamidijskih izolata. Zbog zahtjevne metodologije dosad u našoj zemlji nije provedeno testiranje njihove antimikrobne osjetljivosti.

Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi učinkovitost azitromicina, doksiciklina i levofloksacina *in vitro* za 40 urogenitalnih klamidijskih izolata iz hrvatskih pacijenata izoliranih u razdoblju od tri godine. 23 izolata iz obrisaka vrata maternice, 16 izolata iz obrisaka muške uretre, 1 izolat iz eksprimata prostate te 2 referentna soja podvrgnuta su testiranju antimikrobne osjetljivosti na McCoy stanicama. Za svaki izolat određena je minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) kao najmanja koncentracija antibiotika bez mikroskopski vidljivih inkluzija, te minimalna klamicidna koncentracija (MCC) kao ona koncentracija antibiotika kod koje nije bilo vidljivih inkluzija nakon pasaže soja na staničnu kulturu bez antibiotika.

Svi ispitivani sojevi bili su osjetljivi na azitromicin, doksiciklin i levofloksacin u uvjetima *in vitro* (MIC < 4 µg/ml), a obrazac „homotipne“ ili „heterotipne rezistencije“ nije pronađen kod niti jednog testiranog izolata. Vrijednosti MCC-ova bile su jednake vrijednostima MIC-ova, ili su bile više u rasponu od jednog do pet razrijeđenja. Za sve izolate raspon MIC-a azitromicina iznosio je 0,064 – 0,125 µg/ml, doksiciklina 0,016 – 0,125 µg/ml, a

levofloksacina 0,125 – 1,0 µg/ml; raspon MCC-a azitromicina iznosio je 0,064 – 2,0 µg/ml, doksiciklina 0,032 – 1,0 µg/ml, a levofloksacina 0,125 – 2,0 µg/ml. Koncentracije testiranih referentnih sojeva (serovar E Bour i serovar F ICCal) bile su podudarne s medijanima ili za jedno razrjeđenje više od medijana urogenitalnih klamidijskih izolata iz hrvatskih pacijenata.

Uspoređivanjem vrijednosti MIC-ova i MCC-ova antimikrobnih lijekova pronađene su statistički značajne razlike u njihovoj učinkovitosti *in vitro*. Najjači antimikrobni učinak na testirane sojeve pokazao je doksiciklin, slijedi ga azitromicin, dok je najslabiju aktivnost iskazao levofloksacin. Rezultati dobiveni *in vitro* podudaraju se s rezultatima kliničkih istraživanja u Hrvatskoj i svijetu, premda nedostaju studije koje bi direktno usporedile učinkovitost levofloksacina s učinkovitošću azitromicina i doksiciklina u terapiji klamidijskih infekcija *in vivo*. Statistički značajna korelacija pronađena je u slučaju dva antimikrobna para za MCC-ove: azitromicina i levofloksacina, te doksiciklina i levofloksacina. U oba slučaja sojevi kojima je potrebna veća koncentracija azitromicina ili doksiciklina za postizanje klamicidnog efekta trebaju i veću koncentraciju levofloksacina. Usporedba medijana za različite kliničke uzorke nije ukazala na statistički značajnu razliku.

Premda rezistentni sojevi nisu pronađeni, određeni izolati pokazuju značajno više koncentracijske vrijednosti. Tako je vrijednost MCC-a azitromicina iznosila 1 µg/ml ili bila veća kod 29,4% izolata iz obrisaka muške uretre i eksprimata prostate, tj. kod 15% svih testiranih izolata, što je relevantno u usporedbi s dostupnom literaturom. Kako još uvijek nije jasno može li *C. trachomatis* razviti rezistenciju *in vivo* uslijed selekcijskog pritiska antimikrobnog liječenja, nužno je nastaviti s ovakvom vrstom istraživanja – poglavito u zemljama s velikom potrošnjom antibiotika.

7.2. Sažetak na engleskom jeziku (Summary)

Dissertation Title: *In vitro* efficacy of azithromycin, doxycycline and levofloxacin against urogenital *Chlamydia trachomatis* strains; **Author: Tomislav Meštrović;** **Year: 2013**

Although the resistance of sexually transmitted bacterium *Chlamydia trachomatis* was not of great concern due to its excellent sensitivity to standard antibiotic therapy, treatment failures associated with laboratory-confirmed resistance have been described in the literature. Croatia is a country with a high rate of antimicrobial drug prescriptions which can give rise to resistant or less sensitive chlamydial strains. Due to the laborious methodology, chlamydial isolates so far have not been subjected to antimicrobial susceptibility testing in our country.

The aim of this study was to evaluate *in vitro* efficacy of azithromycin, doxycycline and levofloxacin for 40 urogenital chlamydial strains isolated from Croatian patients over a period of three years. 23 isolates from cervical swabs, 16 isolates from male urethral swabs, 1 isolate from expressed prostatic secretions and 2 reference strains were subjected to antimicrobial susceptibility testing on McCoy cells. Minimal inhibitory concentration (MIC) as the lowest concentration of antibiotic without microscopically visible inclusions and minimal chlamydicidal concentration (MCC) as the concentration without visible inclusions after one passage in antibiotic-free cell culture have been determined for each strain.

All strains were susceptible to azithromycin, doxycycline and levofloxacin *in vitro* (MIC < 4 µg/ml), hence “homotypic” or “heterotypic” resistance pattern has not been found in any of the tested isolates. MCC values were equal to MIC values, or were one to five dilutions higher. For all strains together MIC ranged from 0.064 to 0.125 µg/ml for azithromycin, from 0.016 to 0.125 µg/ml for doxycycline, and from 0.125 to 1.0 µg/ml for levofloxacin;

MCC ranged from 0.064 to 2.0 µg/ml for azithromycin, from 0.032 to 1.0 µg/ml for doxycycline, and from 0.125 to 2.0 µg/ml for levofloxacin. Concentrations of tested reference strains (serovar E Bour and serovar F ICCal) were in concordance with medians of urogenital chlamydial strains from Croatian patients, or were one dilution higher.

Comparison of MIC and MCC values of antimicrobial drugs revealed statistically significant difference in their *in vitro* efficacy. The strongest antimicrobial effect was shown by doxycycline, followed by azithromycin, whilst levofloxacin was the least effective. Our *in vitro* results are in accordance with the results of clinical research in our country and abroad, although we lack studies that directly compare the efficacy of levofloxacin with the effectiveness of azithromycin and doxycycline in the treatment of chlamydial infections *in vivo*. Statistically significant correlation was found for MCC in the case of two pairs of antimicrobials: azithromycin and levofloxacin, and doxycycline and levofloxacin. In both of those cases strains that require higher concentrations of azithromycin or doxycycline for chlamydicidal effect also necessitate a higher concentration of levofloxacin. Comparison of medians for different clinical samples did not show any statistically significant difference.

Although resistant strains have not been found, certain isolates exhibited a significantly higher concentration values. The value of MCC for azithromycin was 1 µg/ml or higher in 29.4% of isolates from male urethral swabs and expressed prostatic secretions, i.e. in 15% of all the tested isolates, which is relevant when compared to the available literature. Since we still lack information on whether *C. trachomatis* is evolving *in vivo* in response to selection pressure of antimicrobial treatment, it is essential to continue with this kind of resistance surveillance – particularly in countries with high antibiotic consumption.



8. LITERATURA

- 1) Budai I. *Chlamydia trachomatis*: milestones in clinical and microbiological diagnostics in the last hundred years: a review. *Acta Microbiol Immunol Hung* 2007; 54: 5-22.
- 2) Darougar S, Jones BR, Kinnison JR, Vaughan-Jackson JD, Dunlop EM. Chlamydial infection. Advances in the diagnostic isolation of *Chlamydia*, including TRIC agent, from the eye, genital tract, and rectum. *Br J Vener Dis* 1972; 48: 416-20.
- 3) Tang FF, Huang YT, Chang HL, Wong KC. Isolation of trachoma virus in chick embryo. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol* 1957; 1: 109-20.
- 4) Horn M. Phylum XXIV. "Chlamydiae". U: Whitman WB, ur. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. New York: Bergey's Manual Trust; 2010, str. 843-864.
- 5) Kumar S, Saigal SR, Sethi GR. Detection of IgM and IgG antibodies to *Chlamydophila pneumoniae* in pediatric community-acquired lower respiratory tract infections. *Indian J Pathol Microbiol* 2011; 54: 782-5.
- 6) Chen Z, Ji W, Wang Y, Yan Y, Zhu H, Shao X, Xu J. Epidemiology and associations with climatic conditions of *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydophila pneumoniae* infections among Chinese children hospitalized with acute respiratory infections. *Ital J Pediatr* 2013; 39: 34.
- 7) Shewen PE. Chlamydial infection in animals: a review. *Can Vet J* 1980; 21: 2-11.
- 8) Fritsche TR, Horn M, Wagner M, Herwig RP, Schleifer KH, Gautam RK. Phylogenetic diversity among geographically dispersed *Chlamydiales* endosymbionts recovered from clinical and environmental isolates of *Acanthamoeba* spp. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66: 2613-9.
- 9) Stamm WE, Batteiger BE. *Chlamydia trachomatis* (trachoma, perinatal infections, lymphogranuloma venereum, and other genital infections). U: Mandell GL, Bennett JE,

- Dolin R, ur. Principles and Practice of Infectious Diseases. 7. izdanje. Philadelphia, Pa: Elsevier Churchill Livingstone; 2009, poglavlje 180.
- 10) Stephens RS, Kalman S, Lammel C, Fan J, Marathe R, Aravind L, Mitchell W, Olinger L, Tatusov RL, Zhao Q, Koonin EV, Davis RW. Genome sequence of an obligate intracellular pathogen of humans: *Chlamydia trachomatis*. Science 1998; 282: 754-9.
 - 11) Carlson JH, Whitmire WM, Crane DD, Wicke L, Virtaneva K, Sturdevant DE, Kupko JJ 3rd, Porcella SF, Martinez-Orengo N, Heinzen RA, Kari L, Caldwell HD. The *Chlamydia trachomatis* plasmid is a transcriptional regulator of chromosomal genes and a virulence factor. Infect Immun 2008; 76: 2273-83.
 - 12) Chlamydiae. Sekcija III, poglavlje 27. U: Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, Mietzner TA, ur. Jawetz, Melnick, & Adelbrg's Medical Microbiology. 25. izdanje. Mc Graw Hill Medical; 2010, str. 327-336.
 - 13) Brade H, Brade L, Nano FE. Chemical and serological investigations on the genus-specific lipopolysaccharide epitope of *Chlamydia*. Proc Natl Acad Sci USA 1987; 84: 2508-12.
 - 14) Essig A. *Chlamydia* and *Chlamydophila*. U: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, ur. Manual of clinical microbiology, I dio. 9. izdanje. Washington, DC: American Society for Microbiology; 2007, str. 1021-1035.
 - 15) Skilton RJ, Cutcliffen LT, Barlow D, Wang Y, Salim O, Lambden PR, Clarke IN. Penicillin induced persistence in *Chlamydia trachomatis*: high quality time lapse video analysis of the developmental cycle. PLoS One 2009; 4: e7723.
 - 16) Wyrick PB. *Chlamydia trachomatis* persistence *in vitro*: an overview. J Infect Dis 2010; 201: Suppl 2: S88-95.

- 17) Morré SA, Rozendaal L, van Valkengoed IG, Boeke AJ, van Voorst Vader PC, Schirm J, de Blok S, van Den Hoek JA, van Doornum GJ, Meijer CJ, van Den Brule AJ. Urogenital *Chlamydia trachomatis* serovars in men and women with a symptomatic or asymptomatic infection: an association with clinical manifestations? J Clin Microbiol 2000; 38: 2292-6.
- 18) Burton MJ, Mabey DC. The global burden of trachoma: a review. PLoS Negl Trop Dis 2009; 3: e460.
- 19) Solomon AW, Peeling RW, Foster A, Mabey DC. Diagnosis and assessment of trachoma. Clin Microbiol Rev 2004; 17: 982-1011.
- 20) el-Asrar AM, Van den Oord JJ, Geboes K, Missotten L, Emarah MH, Desmet V. Immunopathology of trachomatous conjunctivitis. Br J Ophthalmol 1989; 73: 276-82.
- 21) Ketema K, Tiruneh M, Woldeyohannes D, Muluye D. Active trachoma and associated risk factors among children in Baso Liben District of East Gojjam, Ethiopia. BMC Public Health 2012; 12: 1105.
- 22) Hsu MC, Tsai PY, Chen KT, Li LH, Chiang CC, Tsai JJ, Ke LY, Chen HY, Li SH. Genotyping of *Chlamydia trachomatis* from specimens in Taiwan. J Clin Microbiol 2006; 55: 301-308.
- 23) Stock I, Henrichfreise B. Infections with *Chlamydia trachomatis*. Med Monatsschr Pharm 2012; 35: 209-22.
- 24) Haggerty CL, Gottlieb SL, Taylor BD, Low N, Xu F, Ness RB. Risk of sequelae after *Chlamydia trachomatis* genital infection in women. J Infect Dis 2010; 201: S134-55.
- 25) Carter JD, Inman RD. *Chlamydia*-induced reactive arthritis: hidden in plain sight? Best Pract Res Clin Rheumatol 2011; 25: 359-74.
- 26) STD Trends in the United States: 2010 National Data for Gonorrhea, Chlamydia, and Syphilis. Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention (CDC); 2010.

- Dostupno na: <http://www.cdc.gov/std/stats10/tables/trends-table.htm> (posljednji put pristupljeno 10-11-2013).
- 27) Marcone V, Recine N, Gallinelli C, Nicosia R, Lichtner M, Degener AM, Chiarini F, Calzolari E, Vullo V. Epidemiology of *Chlamydia trachomatis* endocervical infection in a previously unscreened population in Rome, Italy, 2000 to 2009. *Euro Surveill* 2012; 17: pii 20203.
 - 28) van de Laar MJ, Morr  SA. *Chlamydia*: a major challenge for public health. *Euro Surveill* 2007; 12: E1-2.
 - 29) Wilson JS, Honey E, Templeton A, Paavonen J, Mardh PA, Stray-Pedersen B, et al. A systematic review of the prevalence of *Chlamydia trachomatis* among European women. *Hum Reprod Update* 2002; 8: 385-94.
 - 30) European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). *Chlamydia control in Europe*. ECDC Guidance. Stockholm: ECDC; 2009. Dostupno na: http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/0906_GUI_Chlamydia_Control_in_Europe.pdf (posljednji put pristupljeno 10-11-2013).
 - 31) European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). *Sexually transmitted infections in Europe, 1990–2009*. Stockholm: ECDC; 2011. Dostupno na: http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/110526_SUR_STI_in_Europe_1990-2009.pdf (posljednji put pristupljeno 10-11-2013).
 - 32) Centralized information system for infectious diseases (CISID) database. Copenhagen: World Health Organization Regional Office for Europe; 2013. Dostupno na: <http://data.euro.who.int/CISID/> (posljednji put pristupljeno 10-11-2013).
 - 33) Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Hrvatski zdravstveno-statistički ljetopis za 2012. godinu. Poljićanin T, Benjak T, ur. Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Zagreb; 2013,

- str. 188. Dostupno na: http://www.hzjz.hr/publikacije/00_2012_WEB.pdf (posljednji put pristupljeno 10-11-2013).
- 34) Ljubin-Sternak S, Kružić V, Vilibić-Čavlek T, Škerk V. *Chlamydia trachomatis* infection in Croatian symptomatic and asymptomatic men. *The Journal of Men's Health & Gender* 2006; 3: 80-1.
 - 35) Škerk V, Markovinović L, Zekan S, Jakšić J, Židovec-Lepej S, Markotić A, Škerk V, Radošević V, Cvitković L, Begovac J. The significance of *Chlamydia trachomatis* in urethritis and prostatitis – differences in therapeutic approach – Croatian experience. *J Chemother* 2009; 21: 63-7.
 - 36) Hiršl-Hećej V, Pustiček N, Sikanić-Dugić N, Domljan LM, Kani D. Prevalence of chlamydial genital infection and associated risk factors in adolescent females at an urban reproductive health care center in Croatia. *Coll Antropol* 2006; 30: 131-7.
 - 37) Bošnjak Z, Džijan S, Pavlinić D, Perić M, Ružman N, Križan IR, Lauc G, Antolović-Požgain A, Burazin J, Vuković D. Distribution of *Chlamydia trachomatis* Serotypes in Clinical Urogenital Samples from North-Eastern Croatia. *Curr Microbiol* 2012; 64: 552-60.
 - 38) Cabral T, Jolly AM, Wylie JL. *Chlamydia trachomatis* omp1 genotypic diversity and concordance with sexual network data. *J Infect Dis* 2003; 187: 279-86
 - 39) Falk L, Fredlund H, Jensen JS. Symptomatic urethritis is more prevalent in men infected with *Mycoplasma genitalium* than with *Chlamydia trachomatis*. *Sex Transm Infect* 2004; 80: 289–93.
 - 40) Jurstrand M, Falk L, Fredlund H, Lindberg M, Olcén P, Andersson S, Persson K, Albert J, Bäckman A. Characterization of *Chlamydia trachomatis* omp1 genotypes among sexually transmitted disease patients in Sweden. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 3915-9.

- 41) Geisler WM, Suchland RJ, Whittington WLH, Stamm WE. The relationship of serovar to clinical manifestations of urogenital *Chlamydia trachomatis* infection. *Sex Transm Dis* 2003; 30: 160–5.
- 42) Guerra-Infante FM, López-Hurtado M, Villagrana-Zesati R. New genovariantes of *Chlamydia trachomatis* serovar L2 proctitis causing. *Ginecol Obstet Mex* 2012; 80: 208-17.
- 43) Mabey D, Peeling RW. Lymphogranuloma venereum. *Sex Transm Infect* 2002; 78: 90-2.
- 44) Savage EJ, van de Laar MJ, Gallay A, van der Sande M, Hamouda O, Sasse A, Hoffmann S, Diez M, Borrego MJ, Lowndes CM, Ison C; European Surveillance of Sexually Transmitted Infections (ESSTI) network. Lymphogranuloma venereum in Europe, 2003-2008. *Euro Surveill* 2009; 14: pii=19428.
- 45) Buus DR, Pflugfelder SC, Schachter J, Miller D, Forster RK. Lymphogranuloma venereum conjunctivitis with a marginal corneal perforation. *Ophthalmology* 1988; 95: 799-802.
- 46) Blank S, Schillinger JA, Harbatkin D. Lymphogranuloma venereum in the industrialised world. *Lancet* 2005; 365: 1607-8.
- 47) Herida M, de Barbeyrac B, Sednaoui P, Scieux C, Lemarchand N, Kreplak G, Clerc M, Timsit J, Goulet V, Desenclos JC, Semaille C. Rectal lymphogranuloma venereum surveillance in France 2004-2005. *Euro Surveill* 2006; 11: pii=647.
- 48) Nieuwenhuis RF, Ossewaarde JM, Götz HM, Dees J, Thio HB, Thomeer MG, den Hollander JC, Neumann MH, van der Meijden WI. Resurgence of lymphogranuloma venereum in Western Europe: an outbreak of *Chlamydia trachomatis* serovar L2 proctitis in The Netherlands among men who have sex with men. *Clin Infect Dis* 2004; 39: 996-1003.

- 49) Kropp RY, Wong T; Canadian LGV Working Group. Emergence of lymphogranuloma venereum in Canada. *CMAJ* 2005; 172: 1674-6.
- 50) Sethi G, Allason-Jones E, Richens J, Annan NT, Hawkins D, Ekbote A, Alexander S, White J. Lymphogranuloma venereum presenting as genital ulceration and inguinal syndrome in men who have sex with men in London, United Kingdom. *Sex Transm Infect* 2009; 85: 165-70.
- 51) Vanousova D, Zakoucka H, Jilich D, Rozsypal H, Stankova M, Zufanova S, Vojackova N, Hercogova J, Marvan J, Machala L. First detection of *Chlamydia trachomatis* LGV biovar in the Czech Republic, 2010-2011. *Euro Surveill* 2012; 17: pii=20055.
- 52) Aarnaes SL, Peterson EM, De La Maza LM. The effect of media and temperature on the storage of *Chlamydia trachomatis*. *Am J Clin Pathol* 1984; 81: 237-9.
- 53) Madhavan HN, Malathi J, Bagyalakshmi R. Insights into the Biology, Infections and Laboratory Diagnosis of *Chlamydia*. U: Mares M, ur. *Chlamydia*. Intech Europe; 2012, str. 116-123.
- 54) Scidmore MA. Cultivation and Laboratory Maintenance of *Chlamydia trachomatis*. *Curr Protoc Microbiol* 2005; Chapter 11: Unit 11A.1.
- 55) Poppert S, Essig A, Marre R, Wagner M, Horn M. Detection and differentiation of chlamydiae by fluorescence in situ hybridization. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68: 4081-9.
- 56) Dowell SF, Peeling RW, Boman J, Carlone GM, Fields BS, Guarner J, Hammerschlag MR, Jackson LA, Kuo CC, Maass M, Messmer TO, Talkington DF, Tondella ML, Zaki SR; *C. pneumoniae* Workshop Participants. Standardizing *Chlamydia pneumoniae* assays: recommendations from the Centers for Disease Control and

- Prevention (USA) and the Laboratory Centre for Disease Control (Canada). Clin Infect Dis 2001; 33: 492-503.
- 57) Huniche BS, Jensen LT, Birkelund S, Christiansen G. *Mycoplasma* contamination of *Chlamydia pneumoniae* isolates. Scand J Infect Dis 1998; 30: 181-7.
- 58) Johnson RE, Newhall WJ, Papp JR, Knapp JS, Black CM, Gift TL, Steece R, Markowitz LE, Devine OJ, Walsh CM, Wang S, Gunter DC, Irwin KL, DeLisle S, Berman SM. Screening tests to detect *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* infections – 2002. MMWR Recomm Rep 2002; 51 (RR-15): 1-38.
- 59) Ljubin-Sternak S, Škerk V. Determining antimicrobial resistance to *Chlamydia trachomatis* and applying present findings in daily practice. Med Glas (Zenica) 2010; 7: 26-31.
- 60) Newhall WJ, Johnson RE, DeLisle S, Fine D, Hadgu A, Matsuda B, Osmond D, Campbell J, Stamm WE. Head-to-head evaluation of five chlamydia tests relative to a quality-assured culture standard. J Clin Microbiol 1999; 37: 681-5.
- 61) Boyadzhyan B, Yashina T, Yatabe JH, Patnaik M, Hill CS. Comparison of the APTIMA CT and GC assays with the APTIMA combo 2 assay, the Abbott LCx assay, and direct fluorescent-antibody and culture assays for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*. J Clin Microbiol 2004; 42: 3089-93.
- 62) Ozüberk OÖ, Gökahmetoglu S, Ozçelik B, Ekmekçioglu O. Investigation of *Chlamydia trachomatis* with Cell Culture, DFA and PCR Methods in the Genital Swab Samples of Symptomatic Patients. Mikrobiyol Bul 2013; 47: 79-86.
- 63) Taylor-Robinson D, Thomas BJ, Osborn MF. Evaluation of enzyme immunoassay (Chlamydiazyme) for detecting *Chlamydia trachomatis* in genital tract specimens. J Clin Pathol 1987; 40: 194-9.

- 64) Peeling RW, Holmes KK, Mabey D, Ronald A. Rapid tests for sexually transmitted infections (STIs): the way forward. *Sex Transm Infect* 2006; 82 Suppl 5: v1-6.
- 65) van Dommelen L, van Tiel FH, Ouburg S, Brouwers EE, Terporten PH, Savelkoul PH, Morré SA, Bruggeman CA, Hoebe CJ. Alarmingly poor performance in *Chlamydia trachomatis* point-of-care testing. *Sex Transm Infect* 2010; 86: 355-9.
- 66) van der Helm JJ, Sabajo LO, Grunberg AW, Morré SA, Speksnijder AG, de Vries HJ. Point-of-care test for detection of urogenital chlamydia in women shows low sensitivity. A performance evaluation study in two clinics in Suriname. *PLoS One* 2012; 7: e32122.
- 67) Chernesky MA. The laboratory diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections. *Can J Infect Dis Med Microbiol* 2005; 16: 39-44.
- 68) Clarke LM, Sierra MF, Daidone BJ, Lopez N, Covino JM, McCormack WM. Comparison of the Syva MicroTrak enzyme immunoassay and Gen-Probe PACE 2 with cell culture for diagnosis of cervical *Chlamydia trachomatis* infection in a high-prevalence female population. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 968-71.
- 69) Black CM, Marrazzo J, Johnson RE, Hook EW 3rd, Jones RB, Green TA, Schachter J, Stamm WE, Bolan G, St Louis ME, Martin DH. Head-to-head multicenter comparison of DNA probe and nucleic acid amplification tests for *Chlamydia trachomatis* infection in women performed with an improved reference standard. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 3757-63.
- 70) Girdner JL, Cullen AP, Salama TG, He L, Lorincz A, Quinn TC. Evaluation of the digene hybrid capture II CT-ID test for detection of *Chlamydia trachomatis* in endocervical specimens. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 1579-81.
- 71) Mahony J, Chong S, Jang D, Luinstra K, Faught M, Dalby D, Sellors J, Chernesky M. 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.
- 72) Kluytmans JA, Goessens WH, Mouton JW, van Rijsoort-Vos JH, Niesters HG, Quint WG, Habbema L, Stolz E, Wagenvoort JH. Evaluation of Clearview and Magic Lite tests, polymerase chain reaction, and cell culture for detection of *Chlamydia trachomatis* in urogenital specimens. J Clin Microbiol 1993; 31: 3204-10.
- 73) Van Dyck E, Ieven M, Pattyn S, Van Damme L, Laga M. Detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* by enzyme immunoassay, culture, and three nucleic acid amplification tests. J Clin Microbiol 2001; 39: 1751-6.
- 74) Wang SP, Grayston JT. Human serology in *Chlamydia trachomatis* infection with microimmunofluorescence. J Infect Dis 1974; 130: 388-97.
- 75) Centers for Disease Control and Prevention. Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines, 2010. MMWR 2010; 59 (No. RR-12) : 44-49.
- 76) 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.
- 77) Kacmar J, Cheh E, Montagno 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.
- 78) Rahangdale L, Guerry S, Bauer HM, et al. An observational cohort study of *Chlamydia trachomatis* treatment in pregnancy. Sex Transm Dis 2006; 33: 106-110.
- 79) Mahon BE, Rosenman MB, Kleiman MB. Maternal and infant use of erythromycin and other macrolide antibiotics as risk factors for infantile hypertrophic pyloric stenosis. J Pediatr 2001; 139: 380-4.

- 80) Cooper WO, Griffin MR, Arbogast P, Hickson GB, Gautam S, Ray WA. Very early exposure to erythromycin and infantile hypertrophic pyloric stenosis. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2002; 156: 647-50.
- 81) Škerk V, Krhen I, Kalenić S, Francetić I, Baršić B, Cvitković Kuzmić A, Derežić D, Jeren T, Kes P, Kraus O, Kuvačić I, Tambić Andrašević A, Tešović G, Vrčić H. Smjernice antimikrobnog liječenja i prevencije infekcija mokraćnog sustava. Hrvatsko društvo za nefrologiju, dijalizu i transplantaciju Hrvatskog liječničkog zbora, 2004. Dostupno na: <http://www.hdndt.org/smjernicuti.htm> (posljednji put pristupljeno 11-10-2013).
- 82) Giannopoulos A, Koratzanis G, Giamarellos-Bourboulis EJ, Panou C, Adamakis I, Giamarellou H. Pharmacokinetics of clarithromycin in the prostate: implications for the treatment of chronic abacterial prostatitis. *J Urol* 2001; 165: 97-9.
- 83) Škerk V, Krhen I, Schönwald S, Mareković I, Markovinović L, Roglić S, Zeljko Ž, Kružić V. Klaritromicin u liječenju kroničnog prostatitisa izazvanog bakterijom *Chlamydia trachomatis* – probno ispitivanje. *Pharmaca* 2001; 39: 193-201.
- 84) Škerk V, Schönwald S, Krhen I, Markovinović L, Baršić B, Mareković I, Roglić S, Zeljko Ž, Vince A, Cajić V. Comparative analysis of azithromycin and clarithromycin efficacy and tolerability in the treatment of chronic prostatitis caused by *Chlamydia trachomatis*. *J Chemother* 2002; 14: 384-9.
- 85) Jones RB, Van der Pol B, Martin DH, Shepard MK. Partial characterization of *Chlamydia trachomatis* isolates resistant to multiple antibiotics. *J Infect Dis* 1990; 162: 1309-15.
- 86) Lefèvre JC, Lépargneur JP, Guion D, Bei S. Tetracycline-resistant *Chlamydia trachomatis* in Toulouse, France. *Pathol Biol (Paris)* 1997; 45: 376-8.

- 87) Lefèvre JC, Lépargneur JP. Comparative *in vitro* susceptibility of a tetracycline-resistant *Chlamydia trachomatis* strain isolated in Toulouse (France). *Sex Transm Dis* 1998; 25: 350-2.
- 88) Somani J, Bhullar VB, Workowski KA, Farshy CE, Black CM. Multiple drug-resistant *Chlamydia trachomatis* associated with clinical treatment failure. *J Infect Dis* 2000; 181: 1421-7.
- 89) Misiurina OIu, Shipitsina EV, Finashutina IuP, Lazarev VN, Akopian TA, Savicheva AM, Govorun VM. Analysis of point mutations in the *ygeD*, *gyrA* and *parC* genes in fluoroquinolones resistant clinical isolates of *Chlamydia trachomatis*. *Mol Gen Mikrobiol Virusol* 2004; 3: 3-7.
- 90) Bhengraj AR, Vardhan H, Srivastava P, Salhan S, Mittal A. 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.
- 91) Bhengraj AR, Srivastava P, Mittal A. Lack of mutation in macrolide resistance genes in *Chlamydia trachomatis* clinical isolates with decreased susceptibility to azithromycin. *Int J Antimicrob Agents* 2011; 38: 178-9.
- 92) Suchland RJ, Geisler WM, Stamm WE. Methodologies and cell lines used for antimicrobial susceptibility testing of *Chlamydia* spp. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 636-42.
- 93) Dickinson TM, Archer GL. Phenotypic expression of oxacillin resistance in *Staphylococcus epidermidis*: roles of *mecA* transcriptional regulation and resistant-subpopulation selection. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 1616-23.
- 94) Andersen, AA, Rogers KG. Resistance to tetracycline and sulfadiazine in swine *C. trachomatis* isolates. U: Stephens S, Byrne GI, Christiansen G, Clarke IN, Grayston

- JT, Rank RG, Ridgeway GL, Saikku P, Schachter J, Stamm WE, ur. Chlamydial infections. Proceedings of the 9th International Symposium on Human Chlamydial Infection, Napa, California, Berkeley University Press, California; 1998, str. 313-6.
- 95) Somani J, Bhullar VB, Workowski KA, Farshy CE, Black CM. Multiple drug-resistant *Chlamydia trachomatis* associated with clinical treatment failure. J Infect Dis 2000; 181: 1421-7.
- 96) Bhengraj AR, Srivastava P, Vardhan H, Yadav SS, Singh LC, Mittal A. Study on survival of *Chlamydia trachomatis* in the presence of antichlamydial drugs. Am J Infect Dis 2012; 8: 5-12.
- 97) Binet R, Maurelli AT. Frequency of development and associated physiological cost of azithromycin resistance in *Chlamydia psittaci* 6BC and *C. trachomatis* L2. Antimicrob Agents Chemother 2007; 51: 4267-75.
- 98) Leontiadou F, Xaplanteri MA, Papadopoulos G, Gerassimou C, Kalpaxis DL, Choli-Papadopoulou T. On the structural and functional importance of the highly conserved Glu56 of *Thermus thermophilus* L4 ribosomal protein. J Mol Biol 2003; 332: 73-84.
- 99) O'Connor M, Gregory ST, Dahlberg AE. Multiple defects in translation associated with altered ribosomal protein L4. Nucleic Acids Res 2004; 32: 5750-6.
- 100) Misyurina OY, Chipitsyna EV, Finashutina YP, Lazarev VN, Akopian TA, Savicheva AM, Govorun VM. Mutations in a 23S rRNA gene of *Chlamydia trachomatis* associated with resistance to macrolides. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48: 1347-9.
- 101) Clark C, Bozdogan B, Peric M, Dewasse B, Jacobs MR, Appelbaum PC. *In vitro* selection of resistance in *Haemophilus influenzae* by amoxicillin-clavulanate, cefpodoxime, cefprozil, azithromycin, and clarithromycin. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46: 2956-62.

- 102) Pereyre S, Guyot C, Renaudin H, Charron A, Bébéar C, Bébéar CM. *In vitro* selection and characterization of resistance to macrolides and related antibiotics in *Mycoplasma pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 460-5.
- 103) Sidhu AB, Sun Q, Nkrumah LJ, Dunne MW, Sacchetti JC, Fidock DA. *In vitro* efficacy, resistance selection, and structural modeling studies implicate the malarial parasite apicoplast as the target of azithromycin. *J Biol Chem* 2007; 282: 2494-504.
- 104) Reinert RR, Wild A, Appelbaum P, Lütticken R, Cil MY, Al-Lahham A. Ribosomal mutations conferring resistance to macrolides in *Streptococcus pneumoniae* clinical strains isolated in Germany. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 2319-22.
- 105) Perić M, Bozdogan B, Jacobs MR, Appelbaum PC. Effects of an efflux mechanism and ribosomal mutations on macrolide susceptibility of *Haemophilus influenzae* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 1017-22.
- 106) Wolter N, Smith AM, Farrell DJ, Schaffner W, Moore M, Whitney CG, Jorgensen JH, Klugman KP. Novel mechanism of resistance to oxazolidinones, macrolides, and chloramphenicol in ribosomal protein L4 of the pneumococcus. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 3554-7.
- 107) Dugan J, Rockey DD, Jones L, Andersen AA. Tetracycline resistance in *Chlamydia suis* mediated by genomic islands inserted into the chlamydial *inv*-like gene. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 3989-95.
- 108) Dugan J, Andersen AA, Rockey DD. Functional characterization of IScs605, an insertion element carried by tetracycline-resistant *Chlamydia suis*. *Microbiology* 2007; 153: 71-9.
- 109) Borel N, Regenscheit N, Di Francesco A, Donati M, Markov J, Masserey Y, Pospischil A. Selection for tetracycline-resistant *Chlamydia suis* in treated pigs. *Vet Microbiol* 2012; 156: 143-6.

- 110) Suchland RJ, Sandoz KM, Jeffrey BM, Stamm WE, Rockey DD. Horizontal transfer of tetracycline resistance among *Chlamydia* spp. *in vitro*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 4604-11.
- 111) Lau SK, Wong GK, Li MW, Woo PC, Yuen KY. Distribution and molecular characterization of tetracycline resistance in *Laribacter hongkongensis*. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61: 488-97.
- 112) Sandoz KM, Rockey DD. Antibiotic resistance in Chlamydiae. *Future Microbiol* 2010; 5: 1427-42.
- 113) Chae C, Cheon DS, Kwon D, Kim O, Kim B, Suh J, Rogers DG, Everett KD, Andersen AA. In situ hybridization for the detection and localization of swine *Chlamydia trachomatis*. *Vet Pathol* 1999; 36: 133-7.
- 114) Di Francesco A, Donati M, Rossi M, Pignanelli S, Shurdhi A, Baldelli R, Cevenini R. Tetracycline-resistant *Chlamydia suis* isolates in Italy. *Vet Rec* 2008; 163: 251-2.
- 115) Höök-Nikanne J, Berg DE, Peek RM Jr, Kersulyte D, Tummuru MK, Blaser MJ. DNA sequence conservation and diversity in transposable element IS605 of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 1998; 3: 79-85.
- 116) Dessus-Babus S, Bébéar CM, Charron A, Bébéar C, de Barbeyrac B. Sequencing of gyrase and topoisomerase IV quinolone-resistance-determining regions of *Chlamydia trachomatis* and characterization of quinolone-resistant mutants obtained *in vitro*. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 2474-81.
- 117) Morrissey I, Salman H, Bakker S, Farrell D, Bébéar CM, Ridgway G. Serial passage of *Chlamydia* spp. in sub-inhibitory fluoroquinolone concentrations. *J Antimicrob Chemother* 2002; 49: 757-61.

- 118) Takahashi S, Hagiwara T, Shiga S, Takaoki Hirose T, Tsukamoto T. *In vitro* analysis of the change in resistance of *Chlamydia trachomatis* under exposure to sub-MIC levofloxacin for a therapeutic term. *Chemotherapy* 2000; 46: 402-7.
- 119) Ruiz J, Pons MJ, Gomes C. Transferable mechanisms of quinolone resistance. *Int J Antimicrob Agents* 2012; 40: 196-203.
- 120) DeMars R, Weinfurter J. Interstrain gene transfer in *Chlamydia trachomatis in vitro*: mechanism and significance. *J Bacteriol* 2008; 190: 1605-14.
- 121) Binet R, Maurelli AT. Frequency of spontaneous mutations that confer antibiotic resistance in *Chlamydia* spp. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 2865-73.
- 122) Kutlin A, Kohlhoff S, Roblin P, Hammerschlag MR, Riska P. Emergence of resistance to rifampin and rifalazil in *Chlamydophila pneumoniae* and *Chlamydia trachomatis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 903-7.
- 123) Dreses-Werringloer U, Padubrin I, Köhler L, Hudson AP. Detection of nucleotide variability in *rpoB* in both rifampin-sensitive and rifampin-resistant strains of *Chlamydia trachomatis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 2316-8.
- 124) Suchland RJ, Bourillon A, Denamur E, Stamm WE, Rothstein DM. Rifampin-resistant RNA polymerase mutants of *Chlamydia trachomatis* remain susceptible to the ansamycin rifalazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 1120-6.
- 125) Demars R, Weinfurter J, Guex E, Lin J, Potucek Y. Lateral gene transfer *in vitro* in the intracellular pathogen *Chlamydia trachomatis*. *J Bacteriol* 2007; 189: 991-1003.
- 126) Binet R, Maurelli AT. The chlamydial functional homolog of KsgA confers kasugamycin sensitivity to *Chlamydia trachomatis* and impacts bacterial fitness. *BMC Microbiol* 2009; 9: 279.

- 127) Ridgway GL, Owen JM, Oriel JD. A method for testing the antibiotic susceptibility of *Chlamydia trachomatis* in a cell culture system. J Antimicrob Chemother 1976; 2: 71-6.
- 128) Lee CK, Bowie WR, Alexander ER. *In vitro* assays of the efficacy of antimicrobial agents in controlling *Chlamydia trachomatis* propagation. Antimicrob Agents Chemother 1978; 13: 441-5.
- 129) Stirling P, Richmond S. The developmental cycle of *Chlamydia trachomatis* in McCoy cells treated with cytochalasin B. J Gen Microbiol 1977; 100: 31-42.
- 130) Ehret JM, Judson FN. Susceptibility testing of *Chlamydia trachomatis*: from eggs to monoclonal antibodies. Antimicrob Agents Chemother 1988; 32: 1295-9.
- 131) Wyrick PB, Davis CH, Raulston JE, Knight ST, Choong J. Effect of clinically relevant culture conditions on antimicrobial susceptibility of *Chlamydia trachomatis*. Clin Infect Dis 1994; 19: 931-6.
- 132) Rota TR. Techniques for culturing and determining antimicrobial susceptibility of *Chlamydia trachomatis*. Arch Androl 1980; 4: 63-9.
- 133) Wyrick PB, Davis CH, Knight ST, Choong J. *In-vitro* activity of azithromycin on *Chlamydia trachomatis* infected, polarized human endometrial epithelial cells. J Antimicrob Chemother 1993; 31: 139-50.
- 134) Notomi T, Ikeda Y, Nagayama A. Minimum inhibitory and minimal lethal concentration against *Chlamydia trachomatis* dependent on the time of addition and the duration of the presence of antibiotics. Chemotherapy 1999; 45:242-8.
- 135) Catalan F, Milovanović A, Prouteau C, Soullignac M. Evaluation of *in vitro* activity of ofloxacin against 73 strains of *Chlamydia trachomatis* isolated from gynecologic infections. Pathol Biol (Paris) 1998; 46 :144-6.

- 136) Donati M, Rodriguez Fermepin M, Olmo A, D'Apote L, Cevenini R. Comparative *in vitro* activity of moxifloxacin, minocycline and azithromycin against *Chlamydia* spp. *J Antimicrob Chemother* 1999; 43: 825-7.
- 137) Donati M, Di Francesco A, D'Antuono A, Delucca F, Shurdhi A, Moroni A, Baldelli R, Cevenini R. *In vitro* activities of several antimicrobial agents against recently isolated and genotyped *Chlamydia trachomatis* urogenital serovars D through K. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 5379-80.
- 138) Ljubin-Sternak S, Meštrović T, Vilibić-Čavlek T, Mlinarić-Galinović G, Sviben M, Markotić A, Škerk V. *In vitro* susceptibility of urogenital *Chlamydia trachomatis* strains in a country with high azithromycin consumption rate. *Folia Microbiol (Praha)* 2013; 58: 361-5.
- 139) Khan MA, Potter CW, Sharrard RM. A reverse transcriptase-PCR based assay for *in vitro* antibiotic susceptibility testing of *Chlamydia pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* 1996; 37: 677-85.
- 140) Cross NA, Kellock DJ, Kinghorn GR, Taraktchoglou M, Bataki E, Oxley KM, Hawkey PM, Eley A. Antimicrobial susceptibility testing of *Chlamydia trachomatis* using a reverse transcriptase PCR-based method. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 2311-3.
- 141) Holland SM, Hudson AP, Bobo L, Whittum-Hudson JA, Viscidi RP, Quinn TC, Taylor HR. Demonstration of chlamydial RNA and DNA during a culture-negative state. *Infect Immun* 1992; 60: 2040-7.
- 142) Levitt D, Zable B, Bard J. Binding, ingestion and growth of *Chlamydia trachomatis* (L2 Serovar) analyzed by flow cytometry. *Cytometry* 1986; 7: 378-83.

- 143) Grün M, Liebisch M, Sauerwein H, Jahreis G, Sachse K. Flow cytometric quantification of chlamydial infection in cell culture. *J Microbiol Methods* 2009; 78: 360-2.
- 144) El Feky MA, Hassan EA, El Din AM, Hofny ER, Afifi NA, Eldin SS, Baker MO. *Chlamydia trachomatis*: methods of identification and impact on semen quality. *Egypt J Immunol* 2009; 16: 49-59.
- 145) Mason DJ, Mortimer FC, Gant VA. Antibiotic susceptibility testing by flow cytometry. *Curr Protoc Cytom* 2001; Chapter 11: Unit 11.8.
- 146) Bouquet O, Kocsis B, Kilar F, Kustos I. Application of chip-based flow cytometry for amphotericin B and fluconazole susceptibility testing on *Candida* strains. *Methods Mol Biol* 2013; 968: 149-54.
- 147) Faria-Ramos I, Espinar MJ, Rocha R, Santos-Antunes J, Rodrigues AG, Cantón R, Pina-Vaz C. A novel flow cytometric assay for rapid detection of extended-spectrum beta-lactamases. *Clin Microbiol Infect* 2013; 19: E8-E15.
- 148) Garcia-Rivera JA, Lin K, Hopkins S, Gregory MA, Wilkinson B, Gallay PA. Development of a flow cytometry live cell assay for the screening of inhibitors of hepatitis C virus (HCV) replication. *Open Virol J* 2012; 6: 97-102.
- 149) Dessus-Babus S, Belloc F, Bébéar CM, Poutiers F, Lacombe F, Bébéar C, de Barbeyrac B. Antibiotic susceptibility testing for *Chlamydia trachomatis* using flow cytometry. *Cytometry* 1998; 31: 37-44.
- 150) Dailloux M, Kohler C, Laurain C, Le Faou A, Grignon G. Electron microscopic studies of the action of erythromycin, doxycycline and ofloxacin on the growth cycle of *Chlamydia trachomatis*. *Pathol Biol (Paris)* 1994; 42: 399-405.
- 151) Siegel, S, Castellan, NJ. Nonparametric statistics for the behavioral sciences (2. izdanje). New York, NY: McGraw-Hill; 1988, str. 213-4.

- 152) Porritt AE. The discovery and development of penicillin. *Med Press* 1951; 225: 460-2.
- 153) Kahrström CT. Entering a post-antibiotic era? *Nature Reviews Microbiolog.* 2013; 11: 146
- 154) Binet R, Bowlin AK, Maurelli AT, Rank RG. Impact of azithromycin resistance mutations on the virulence and fitness of *Chlamydia caviae* in guinea pigs. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 1094-101.
- 155) Wyrick PB, Knight ST. Pre-exposure of infected human endometrial epithelial cells to penicillin *in vitro* renders *Chlamydia trachomatis* refractory to azithromycin. *J Antimicrob Chemother* 2004; 54: 79-85.
- 156) Clark RB, Schatzki PF, Dalton HP. Ultrastructural analysis of the effects of erythromycin on the morphology and developmental cycle of *Chlamydia trachomatis* HAR-13. *Arch Microbiol* 1982; 133: 278-82.
- 157) Joseph SJ, Didelot X, Gandhi K, Dean D, Read TD. Interplay of recombination and selection in the genomes of *Chlamydia trachomatis*. *Biol Direct* 2011; 6: 28.
- 158) Sayada C, Denamur E, Grandchamp B, Orfila J, Elion J. Denaturing gradient gel electrophoresis analysis for the detection of point mutations in the *Chlamydia trachomatis* major outer-membrane protein gene. *J Med Microbiol* 1995; 43: 14-25.
- 159) Srinivasan T, Bruno WJ, Wan R, Yen A, Duong J, Dean D. *In vitro* recombinants of antibiotic-resistant *Chlamydia trachomatis* strains have statistically more breakpoints than clinical recombinants for the same sequenced loci and exhibit selection at unexpected loci. *J Bacteriol* 2012; 194: 617-26.
- 160) ESAC European Map. Outpatient antibiotic use (ESAC: 2001-2010). Country sheet Croatia, 2008. Dostupno na: http://www.esac.ua.ac.be/main.aspx?c=*ESAC2&n=50267 (posljednji put pristupljeno 10-11-2013).

- 161) Vojvodić Ž. Antimicrobial use and indication-based prescribing among general practitioners in Eastern Croatia: comparison with data from the European Surveillance of Antimicrobial Consumption project. *Croat Med J* 2010; 51: 524-33.
- 162) Hong KC, Schachter J, Moncada J, Zhou Z, House J, Lietman TM. Lack of macrolide resistance in *Chlamydia trachomatis* after mass azithromycin distributions for trachoma. *Emerg Infect Dis* 2009; 15: 1088-90.
- 163) Solomon AW, Mohammed Z, Massae PA, Shao JF, Foster A, Mabey DC, Peeling RW. Impact of mass distribution of azithromycin on the antibiotic susceptibilities of ocular *Chlamydia trachomatis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 4804-6.
- 164) Lakew T, House J, Hong KC, Yi E, Alemayehu W, Melese M, Zhou Z, Ray K, Chin S, Romero E, Keenan J, Whitcher JP, Gaynor BD, Lietman TM. Reduction and return of infectious trachoma in severely affected communities in Ethiopia. *PLoS Negl Trop Dis* 2009; 3: e376.
- 165) Fry AM, Jha HC, Lietman TM, Chaudhary JS, Bhatta RC, Elliott J, et al. Adverse and beneficial secondary effects of mass treatment with azithromycin to eliminate blindness due to trachoma in Nepal. *Clin Infect Dis* 2002; 35: 395–402.
- 166) Leach AJ, Shelby-James TM, Mayo M, Gratten M, Laming AC, Currie BJ, et al. A prospective study of the impact of community-based azithromycin treatment of trachoma on carriage and resistance of *Streptococcus pneumoniae*. *Clin Infect Dis* 1997; 24: 356–62.
- 167) Samra Z, Rosenberg S, Soffer Y, Dan M. *In vitro* susceptibility of recent clinical isolates of *Chlamydia trachomatis* to macrolides and tetracyclines. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2001; 39: 177-9.

- 168) Cooper MA, Baldwin D, Matthews RS, Andrews JM, Wise R. *In vitro* susceptibility of *Chlamydia pneumoniae* (TWAR) to seven antibiotics. J Antimicrob Chemother 1991; 28: 407-13.
- 169) Segreti J, Kapell KS. *In vitro* activity of dirithromycin against *Chlamydia trachomatis*. Antimicrob Agents Chemother 1994; 38: 2213-4.
- 170) Jones RB, Van der Pol B, Johnson RB. Susceptibility of *Chlamydia trachomatis* to trovafloxacin. J Antimicrob Chemother 1997; 39 Suppl B: 63-5.
- 171) Roblin PM, Hammerschlag MR. *In vitro* activity of gatifloxacin against *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydia pneumoniae*. J Antimicrob Chemother 1999; 44: 549-51.
- 172) Roblin PM, Hammerschlag MR. *In vitro* activity of GAR-936 against *Chlamydia pneumoniae* and *Chlamydia trachomatis*. Int J Antimicrob Agents 2000; 16: 61-3.
- 173) Malay S, Roblin PM, Reznik T, Kutlin A, Hammerschlag MR. *In vitro* activities of BMS-284756 against *Chlamydia trachomatis* and recent clinical isolates of *Chlamydia pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46: 517-8.
- 174) Kohlhoff SA, Roblin PM, Reznik T, Hawser S, Islam K, Hammerschlag MR. *In vitro* activity of a novel diaminopyrimidine compound, iclaprim, against *Chlamydia trachomatis* and *C. pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48: 1885-6.
- 175) Roblin PM, Kohlhoff SA, Parker C, Hammerschlag MR. *In vitro* activity of CEM-101, a new fluoroketolide antibiotic, against *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydia (Chlamydophila) pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother 2010; 54: 1358-9.
- 176) Shima K, Szaszák M, Solbach W, Gieffers J, Rupp J. Impact of a low-oxygen environment on the efficacy of antimicrobials against intracellular *Chlamydia trachomatis*. Antimicrob Agents Chemother 2011; 55: 2319-24.
- 177) Roth A, König P, van Zandbergen G, Klinger M, Hellwig-Bürgel T, Däubener W, Bohlmann MK, Rupp J. Hypoxia abrogates antichlamydial properties of IFN- γ in

- human fallopian tube cells *in vitro* and *ex vivo*. Proc Natl Acad Sci USA 2010; 107: 19502-7.
- 178) Rottner K, Stradal TE, Wehland J. Bacteria-host-cell interactions at the plasma membrane: stories on actin cytoskeleton subversion. Dev Cell 2005; 9: 3-17.
- 179) Kumar Y, Valdivia RH. Actin and intermediate filaments stabilize the *Chlamydia trachomatis* vacuole by forming dynamic structural scaffolds. Cell Host Microbe 2008; 4: 159-69.
- 180) Ossewaarde JM, Plantema FH, Rieffe M, Nawrocki RP, de Vries A, van Loon AM. Efficacy of single-dose azithromycin versus doxycycline in the treatment of cervical infections caused by *Chlamydia trachomatis*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1992; 11: 693-7.
- 181) Škerk V, Schönwald S, Strapac Z, Beus A, Francetić I, Krhen I, Lesko V, Vuković J. Duration of clinical symptoms in female patients with acute urethral syndrome caused by *Chlamydia trachomatis* treated with azithromycin or doxycycline. J Chemother 2001; 13: 176-81.
- 182) Lauharanta J, Saarinen K, Mustonen MT, Happonen HP. Single-dose oral azithromycin versus seven-day doxycycline in the treatment of non-gonococcal urethritis in males. J Antimicrob Chemother 1993; 31 Suppl E: 177-83.
- 183) Lister PJ, Balechandran T, Ridgway GL, Robinson AJ. Comparison of azithromycin and doxycycline in the treatment of non-gonococcal urethritis in men. J Antimicrob Chemother 1993; 31 Suppl E: 185-92.
- 184) Khosropour CM, Dombrowski JC, Barbee LA, Manhart LE, Golden MR. Comparing azithromycin and doxycycline for the treatment of rectal chlamydial infection: a retrospective cohort study. Sex Transm Dis 2014; 41: 79-85.

- 185) Whatley JD, Thin RN, Mumtaz G, Ridgway GL. Azithromycin vs doxycycline in the treatment of non-gonococcal urethritis. *Int J STD AIDS* 1991; 2: 248-51.
- 186) Škerk V, Krhen I, Lisić M, Begovac J, Roglić S, Škerk V, Ljubin-Sternak S, Banaszak A, Strugar-Šuica J, Vuković J. Comparative randomized pilot study of azithromycin and doxycycline efficacy in the treatment of prostate infection caused by *Chlamydia trachomatis*. *Int J Antimicrob Agents* 2004; 24: 188-91.
- 187) Škerk V, Schönwald S, Krhen I, Banaszak A, Begovac J, Strugar J, Strapac Z, Vrsalović R, Vuković J, Tomas M. Comparative analysis of azithromycin and ciprofloxacin in the treatment of chronic prostatitis caused by *Chlamydia trachomatis*. *Int J Antimicrob Agents* 2003; 21: 457-62.
- 188) Meyer T. Diagnosis and treatment of *Chlamydia trachomatis* infections. *Hautarzt* 2012; 63: 16-23.
- 189) McCormack WM, Dalu ZA, Martin DH, Hook EW 3rd, Laisi R, Kell P, Pluck ND, Johnson RB. Double-blind comparison of trovafloxacin and doxycycline in the treatment of uncomplicated Chlamydial urethritis and cervicitis. Trovafloxacin Chlamydial Urethritis/Cervicitis Study Group. *Sex Transm Dis* 1999; 26: 531-6.
- 190) Škerk V, Krhen I, Cajić V, Markovinović L, Puntarić A, Roglić S, Zekan S, Ljubin-Sternak S, Židovec Lepej S, Vince A. The role of *Chlamydia trachomatis* in prostatitis syndrome – our experience in diagnosis and treatment. *Acta Dermatovenerol Croat* 2007; 15: 135-40.
- 191) Magri V, Marras E, Škerk V, Markotić A, Restelli A, Garlaschi MC, Perletti G. Eradication of *Chlamydia trachomatis* parallels symptom regression in chronic bacterial prostatitis patients treated with a fluoroquinolone-macrolide combination. *Andrologia* 2010; 42: 366-75.

- 192) Škerk V. Flexid® u liječenju prostatitisa. U: Knjiga sažetaka: 4. hrvatski kongres o urogenitalnim i spolno prenosivim infekcijama s međunarodnim sudjelovanjem, Opatija. Hrvatsko društvo za urogenitalne i spolno prenosive infekcije HLZ-a, Klinika za infektivne bolesti "Dr. Fran Mihaljević", Zagreb; 2012: str. 29.
- 193) Anderson VR, Perry CM. Levofloxacin: a review of its use as a high-dose, short-course treatment for bacterial infection. *Drugs* 2008; 68: 535-65.
- 194) Bundrick W, Heron SP, Ray P, Schiff WM, Tennenberg AM, Wiesinger BA, Wright PA, Wu SC, Zadeikis N, Kahn JB. Levofloxacin versus ciprofloxacin in the treatment of chronic bacterial prostatitis: a randomized double-blind multicenter study. *Urology* 2003; 62: 537-41.
- 195) Naber KG, Roscher K, Botto H, Schaefer V. Oral levofloxacin 500 mg once daily in the treatment of chronic bacterial prostatitis. *Int J Antimicrob Agents* 2008; 32: 145-53.
- 196) Wagenlehner F, Roscher K, Naber KG. Practice management of chronic bacterial prostatitis with levofloxacin. *Aktuelle Urol* 2011; 42: 184-9.
- 197) Zhang ZC, Jin FS, Liu DM, Shen ZJ, Sun YH, Guo YL. Safety and efficacy of levofloxacin versus ciprofloxacin for the treatment of chronic bacterial prostatitis in Chinese patients. *Asian J Androl* 2012; 14: 870-4.
- 198) Chimura T, Arai M, Onuma Y, Oda T, Kawagoe S, Kunii K, Saito T, Saito N, Sato F, Numazaki M, Matsuo M, Murayama K, Morizaki N. Concentration of levofloxacin in cervical mucus and its clinical effects on cervicitis. *Jpn J Antibiot* 1997; 50: 871-7.
- 199) Mikamo H, Sato Y, Hayasaki Y, Tamaya T, Yamada Y, Ito K, Izumi K, Kawazoe K. Effects of levofloxacin once-a-day therapy on uterine cervicitis. *Jpn J Antibiot* 1999; 52: 511-6.

- 200) Mikamo H, Sato Y, Hayasaki Y, Hua YX, Tamaya T. Adequate levofloxacin treatment schedules for uterine cervicitis caused by *Chlamydia trachomatis*. *Chemotherapy* 2000; 46: 150-2.
- 201) Mikamo H, Yamagishi Y, Takahashi K, Izumi K, Hoshina S, Nakabe K, Fujiwara M, Yoshimura M, Ando Y, Kurashima M, Kinoshita C, Yoshioka M. Clinical study of levofloxacin 500 mg qd in the treatment of cervicitis and intrauterine infections caused by *Chlamydia trachomatis*. *Jpn J Antibiot* 2011; 64: 217-29.
- 202) Takahashi S, Ichihara K, Hashimoto J, Kurimura Y, Iwasawa A, Hayashi K, Sunaoshi K, Takeda K, Suzuki N, Satoh T, Tsukamoto T. Clinical efficacy of levofloxacin 500 mg once daily for 7 days for patients with non-gonococcal urethritis. *J Infect Chemother* 2011; 17: 392-6.
- 203) Mikamo H, Tamaya T, Tanaka K, Watanabe K. Prevalence and treatment of pharyngeal *Chlamydia trachomatis* infections. *Jpn J Antibiot* 2006; 59: 35-40.
- 204) Judlin P, Thiebaugeorges O. Levofloxacin plus metronidazole in uncomplicated pelvic inflammatory disease: a preliminary study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2009; 145: 177-9.
- 205) Whittington WL, Kent C, Kissinger P, Oh MK, Fortenberry JD, Hillis SE, Litchfield B, Bolan GA, St Louis ME, Farley TA, Handsfield HH. Determinants of persistent and recurrent *Chlamydia trachomatis* infection in young women: results of a multicenter cohort study. *Sex Transm Dis* 2001; 28: 117-23.
- 206) Wang SA, Papp JR, Stamm WE, Peeling RW, Martin DH, Holmes KK. Evaluation of antimicrobial resistance and treatment failures for *Chlamydia trachomatis*: a meeting report. *J Infect Dis* 2005; 191: 917-23.
- 207) Hogan RJ, Mathews SA, Mukhopadhyay S, Summersgill JT, Timms P. Chlamydial persistence: beyond the biphasic paradigm. *Infect Immun* 2004; 72: 1843-55.

- 208) Bowring AL, Goller JL, Gouillou M, Harvey C, Bateson D, McNamee K, Read C, Boyle D, Jordan L, Wardle R, Stephens A, Donovan B, Guy R, Hellard M. *Chlamydia* testing and retesting patterns at family planning clinics in Australia. *Sex Health* 2013; 10: 74-81.
- 209) Stańczak JJ, Majchrzak MJ, Stańczak GP. Modern diagnostics of *Chlamydia trachomatis* infections. *Med Wieku Rozwoj* 2005; 9: 9-20.
- 210) Mikamo H, Ninomiya M, Tamaya T. Clinical efficacy of clarithromycin against uterine cervical and pharyngeal *Chlamydia trachomatis* and the sensitivity of polymerase chain reaction to detect *C. trachomatis* at various time points after treatment. *J Infect Chemother* 2003; 9: 282-3.
- 211) Mikamo H, Ninomiya M, Tamaya T. Sensitivity of polymerase chain reaction to determine *Chlamydia trachomatis* eradication rate with levofloxacin therapy in patients with chlamydial cervicitis. *Curr Therap Research* 2003; 64: 375-7.
- 212) Cantón E, Espinel-Ingroff A, Pemán J. Trends in antifungal susceptibility testing using CLSI reference and commercial methods. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2009; 7:107-19.
- 213) Lass-Flörl C, Perkhofer S, Mayr A. *In vitro* susceptibility testing in fungi: a global perspective on a variety of methods. *Mycoses* 2010; 53: 1-11.
- 214) Krölov K, Frolova J, Tudoran O, Suhorutsenko J, Lehto T, Sibul H, Mäger I, Laanpere M, Tulp I, Langel U. Sensitive and Rapid Detection of *Chlamydia trachomatis* by Recombinase Polymerase Amplification Directly from Urine Samples. *J Mol Diagn* 2014; 16: 127-35.



9. PRILOZI

9.1. Popis kratica korištenih u tekstu (abecednim redom)

| | | |
|--------------|---|--|
| 2SP | - | 2-saharoza fosfat (transportni medij) |
| ADP | - | adenozin difosfat |
| ATCC | - | American Type Culture Collection |
| ATP | - | adenozin trifosfat |
| BGMK | - | kontinuirana stanična linija bubrega zelenog majmuna (od engl. <i>buffalo green monkey kidney cells</i>) |
| BSL-2 | - | biosigurnosni stupanj druge razine (od engl. <i>biosafety level 2</i>) |
| CDC | - | Američki Centar za kontrolu i nadzor bolesti (od engl. <i>Centers for Disease Control and Prevention</i>) |
| CLSI | - | Clinical and Laboratory Standards Institute |
| DDD | - | definirana dnevna doza |
| DEAE | - | dietilaminoetil |
| DFA | - | izravna imunofluorescenca (od engl. <i>direct immunofluorescence assay</i>) |
| DNA | - | deoksiribonukleinska kiselina (od engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>) |
| ECDC | - | Europski centar za prevenciju i nadzor bolesti (od engl. <i>European Centre for Disease Prevention and Control</i>) |
| EIA | - | imunoenzimni test (od engl. <i>enzyme immunoassay</i>) |
| ET | - | elementarno tjelešce |
| FISH | - | fluorescentna in-situ hibridizacija |
| FITC | - | fluorescein izotiocijanat |
| HeLa | - | kontinuirana stanična linija adenokarcinoma vrata maternice (prema početnim slovima Henriette Lacks) |
| Hep-2 | - | kontinuirana stanična linija ljudskog epidermoidnog karcinoma larinksa |

| | | |
|--------------|---|---|
| HEPES | - | 2-(4-(2 hidroksietil)-1-piperazinil)-etansulfonska kiselina (pufer) |
| HL | - | ljudska epitelna stanična linija |
| HZJZ | - | Hrvatski zavod za javno zdravstvo |
| IFU | - | inkluzijske jedinice (od engl. <i>inclusion forming units</i>) |
| IL-6 | - | interleukin 6 |
| IL-8 | - | interleukin 8 |
| kb | - | kilobaza |
| LGV | - | lymphogranuloma venereum |
| LPS | - | lipopolisaharid |
| MCC | - | minimalna klamicidna koncentracija (od engl. <i>minimal chlamydicidal concentration</i>) |
| MEM | - | minimalni esencijalni medij (od engl. <i>minimum essential medium</i>) |
| MFI | - | srednji intenzitet fluorescencije (od engl. <i>mean fluorescence intensity</i>) |
| MIC | - | minimalna inhibitorna koncentracija (od engl. <i>minimal inhibitory concentration</i>) |
| MIF | - | mikroimunofluorescentni test |
| MOMP | - | glavni protein vanjske membrane (od engl. <i>major outer membrane protein</i>) |
| NAA | - | umnažanje nukleinskih kiselina (od engl. <i>nucleic acid amplification</i>) |
| NAH | - | hibridizacija nukleinskih kiselina (od engl. <i>nucleic acid hybridization</i>) |
| OMP | - | vanjski membranski protein (od engl. <i>outer membrane protein</i>) |
| PCR | - | lančana reakcija polimerazom (od engl. <i>polymerase chain reaction</i>) |
| PID | - | zdjelična upalna bolest (od engl. <i>pelvic inflammatory disease</i>) |
| PT | - | perzistentno tjelešce |

| | | |
|---------------|---|--|
| QRDR | - | determinirajuće regije za rezistenciju na kinolone (od engl. <i>Quinolone Resistance-Determining Regions</i>) |
| RH | - | Republika Hrvatska |
| RNA | - | ribonukleinska kiselina (od engl. <i>ribonucleic acid</i>) |
| rpm | - | broj okretaja u minuti (od engl. <i>revolutions per minute</i>) |
| RT | - | retikularno tjelešće |
| RT-PCR | - | lančana reakcija polimerazom pomoću reverzne transkriptaze (od engl. <i>reverse transcriptase polymerase chain reaction</i>) |
| SAD | - | Sjedinjene Američke Države |
| VD | - | varijabilna domena |
| Vero | - | kontinuirana stanična linija bubrega afričkog zelenog majmuna (<i>Cercopithecus aethiops</i>) nazvana prema akronimu od „Verda Reno“ |

9.2. Popis slika

Slika 1. Tipične inkluzije *C. trachomatis* (EB - elementarno tjelešce; RB - retikularno tjelešce) prikazane elektronskim mikroskopom 48 sati nakon infekcije (Izvor: Beatty WL, Morrison RP, Byrne GI. Persistent chlamydiae: from cell culture to a paradigm for chlamydial pathogenesis. *Microbiol Rev* 1994; 58: 686-99.) (stranica 5)

Slika 2. Životni ciklus *C. trachomatis* (Izvor: Meštrović Tomislav, izvorni rad) (stranica 5)

Slika 3. Učestalost klamidijske infekcije prema spolu u SAD-u, u periodu od 1990. do 2010. godine (Izvor: <http://www.cdc.gov>) (stranica 10)

Slika 4. Trend u broju prijavljenih slučajeva klamidijske infekcije na 100 tisuća stanovnika, EU/EEA, u periodu od 1995. do 2009. godine (Izvor: <http://ecdc.europa.eu>) (stranica 10)

Slika 5. Histološki prikaz limfadenitisa u sklopu lymphogranuloma venereum. Vidljivo je nekrotičko žarište s neutrofilima koji su u središtu okruženi epiteloidnim histiocitima (Izvor: <http://www.webpathology.com>) (stranica 12)

Slika 6. Sekvencijska fotomikrografija koja pokazuje određivanje MIC-ova doksiciklina za *C. trachomatis* serovar D (A) i *C. suis* soj R-19 (B). MIC_{TP} iznosi 0,032 µg/ml za *C. trachomatis* te 0,5 µg/ml za *C. suis* (Izvor: Suchland RJ, Geisler WM, Stamm WE. Methodologies and cell lines used for antimicrobial susceptibility testing of *Chlamydia* spp. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 636-42.) (stranica 34)

Slika 7. Fluorescentni histogrami dobiveni protočnom citometrijom. Prisutnost zaraženih stanica karakterizirana ljevostranim i desnostranim „peakom“ detektirana je u slučajevima (a), (b) i (c), dok je nalaz negativan u slučajevima (d), (e) i (f) gdje je vidljiv samo ljevostrani „peak“. Dakle, nalaz MIC-a doksiciklina za testirani izolat iznosi 0,05 µg/ml (Izvor: Dessus-Babus S, Belloc F, Bébéar CM, Poutiers F, Lacombe F, Bébéar C, de Barbeyrac B. Antibiotic

susceptibility testing for *Chlamydia trachomatis* using flow cytometry. Cytometry 1998; 31: 37-44.) (stranica 39)

Slika 8. Inkluzije *C. trachomatis* u staničnoj kulturi McCoy stanica prikazane pomoću monoklonskih protutijela uz povećanje od 100x (Izvor: Odsjek za klamidije, Služba za mikrobiologiju, HZJZ) (stranica 51)

Slika 9. Inkluzije *C. trachomatis* u staničnoj kulturi McCoy stanica prikazane pomoću monoklonskih protutijela uz povećanje od 400x (Izvor: Odsjek za klamidije, Služba za mikrobiologiju, HZJZ) (stranica 52)

Slika 10. Uvećani prikaz odabrane inkluzije *C. trachomatis* u staničnoj kulturi McCoy stanica obojane monoklonskim protutijelima (Izvor: Odsjek za klamidije, Služba za mikrobiologiju, HZJZ) (stranica 52)

Slika 11. Mikrotitarska pločica za testiranje antimikrobne osjetljivosti klamidijskih sojeva sa suspenzijom McCoy stanica (Izvor: Odsjek za klamidije, Služba za mikrobiologiju, HZJZ) (stranica 57)

Slika 12. Invertni fluorescentni mikroskop Olympus IX51[®] (Izvor: Odjel za znanstvena istraživanja, Klinika za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“) (stranica 61)

Slika 13. Sekvencijska fotomikrografija koja pokazuje obrazac rasta i određivanje MIC-a za soj *C. trachomatis* izoliran iz obriska muške uretre (Tablica 8, Izolat broj 1) u prisustvu rastućih koncentracija azitromicina. Na koncentraciji 0,064 µg/ml vidljiv je MIC_{TP}, prijelazna točka gdje koncentracija antimikrobnog lijeka prvi puta značajno utječe na klamidijske inkluzije; MIC je stoga određen kao jedno dvostruko razrjeđenje više (0,125 µg/ml) kao najniža koncentracija bez vidljivih inkluzija (Izvor: Odsjek za klamidije, Služba za mikrobiologiju, HZJZ. Objavljeno u: Ljubin-Sternak S, Meštrović T, Vilibić-Čavlek T, Mlinarić-Galinović G, Sviben M, Markotić A, Škerk V. *In vitro* susceptibility of urogenital

Chlamydia trachomatis strains in a country with high azithromycin consumption rate. Folia Microbiol (Praha) 2013; 58: 361-5.) (stranica 62)

Slika 14-19. Postotni udio minimalnih inhibitornih i minimalnih klamicidnih koncentracija klamidijskih sojeva izoliranih iz obrisaka vrata maternice (stranica 69)

Slika 20-25. Postotni udio minimalnih inhibitornih i minimalnih klamicidnih koncentracija klamidijskih sojeva izoliranih iz obrisaka muške uretre i eksprimata prostate (stranica 72)

Slika 26-31. Postotni udio minimalnih inhibitornih i minimalnih klamicidnih koncentracija klamidijskih sojeva izoliranih iz svih vrsta kliničkih uzoraka (stranica 73)

Slika 32. Histogram minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) u odnosu prema antimikrobnom lijeku (stranica 76)

Slika 33. Točkasti piktogram minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) u odnosu prema antimikrobnom lijeku (stranica 76)

Slika 34. Histogram minimalne klamicidne koncentracije (MCC) u odnosu prema antimikrobnom lijeku (stranica 77)

Slika 35. Točkasti piktogram minimalne klamicidne koncentracije (MCC) u odnosu prema antimikrobnom lijeku (stranica 77)

Slika 36. Dijagram rasipanja (stranica 78)

Slika 37. Prikaz medijana minimalnih inhibitornih i minimalnih klamicidnih koncentracija za azitromicin, doksiciklin i levofloksacin (stranica 79)

Slika 38. Histogram minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) za azitromicin u odnosu prema vrsti kliničkog uzorka (stranica 85)

Slika 39. Violinski dijagram minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) za azitromicin u odnosu prema vrsti kliničkog uzorka (stranica 85)

Slika 40. Histogram minimalne klamicidne koncentracije (MCC) za azitromicin u odnosu prema vrsti kliničkog uzorka (stranica 86)

Slika 41. Violinski dijagram minimalne klamicidne koncentracije (MCC) za azitromicin u odnosu prema vrsti kliničkog uzorka (stranica 86)

Slika 42. Histogram minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) za doksiciklin u odnosu prema vrsti kliničkog uzorka (stranica 87)

Slika 43. Violinski dijagram minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) za doksiciklin u odnosu prema vrsti kliničkog uzorka (stranica 87)

Slika 44. Histogram minimalne klamicidne koncentracije (MCC) za doksiciklin u odnosu prema vrsti kliničkog uzorka (stranica 88)

Slika 45. Violinski dijagram minimalne klamicidne koncentracije (MCC) za doksiciklin u odnosu prema vrsti kliničkog uzorka (stranica 88)

Slika 46. Histogram minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) za levofloksacin u odnosu prema vrsti kliničkog uzorka (stranica 89)

Slika 47. Violinski dijagram minimalne minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) za levofloksacin u odnosu prema vrsti kliničkog uzorka (stranica 89)

Slika 48. Histogram minimalne klamicidne koncentracije (MCC) za levofloksacin u odnosu prema vrsti kliničkog uzorka (stranica 90)

Slika 49. Violinski dijagram minimalne klamicidne koncentracije (MCC) za levofloksacin u odnosu prema vrsti kliničkog uzorka (stranica 90)

Slika 50. Dijagram paralelnih koordinata (stranica 91)

Slika 51. Međusobna usporedba raspona MIC-ova odabranih istraživanja antimikrobne osjetljivosti kliničkih klamidijjskih izolata (stranica 114)

Slika 52. Međusobna usporedba raspona MCC-ova odabranih istraživanja antimikrobne osjetljivosti kliničkih klamidijjskih izolata (stranica 115)

9.3. Popis tablica i izračuna

Tablica 1. Podjela serovara *C. trachomatis* sukladno kliničkoj prezentaciji (Izvor: Brunham RC, Rey-Ladino J. Immunology of *Chlamydia* infection: implications for a *Chlamydia trachomatis* vaccine. Nat Rev Immunol 2005; 5: 149-61.) (stranica 6)

Tablica 2. Preporučeni i alternativni režim antimikrobnog liječenja uretritisa/cervicitisa uzrokovanog *C. trachomatis* (Izvor: <http://www.cdc.gov>) (stranica 21)

Tablica 3. Sastav osnovnog Eaglovog minimalnog esencijalnog medija (MEM) korištenog u izolaciji klamidija i testiranju antimikrobne osjetljivosti (stranica 47)

Tablica 4. Specifikacija za prašak azitromicina u obliku azitromicin dihidrata - šifra materijala: 8000192, 80009220, 80009740, SDIR000767/6 (Izvor: PLIVA HRVATSKA d.o.o., Zagreb) (stranica 55-56)

Tablica 5. Sastav onečišćenja za prašak azitromicina u obliku azitromicin dihidrata: dio prateće specifikacije ustupljenog lijeka (Izvor: PLIVA HRVATSKA d.o.o., Zagreb) (stranica 57)

Tablica 6. Minimalne inhibitorne i minimalne klamicidne koncentracije klamidijskih sojeva izoliranih iz obrisaka vrata maternice (stranica 67-68)

Tablica 7. Deskriptivna statistička analiza antimikrobne osjetljivosti sojeva izoliranih iz obrisaka vrata maternice (ukupno 23 uzorka) (stranica 68)

Tablica 8. Minimalne inhibitorne i minimalne klamicidne koncentracije klamidijskih sojeva izoliranih iz obrisaka muške uretre (stranica 70)

Tablica 9. Minimalna inhibitorna i minimalna klamicidna koncentracija klamidijskog soja izoliranog iz eksprimata prostate (stranica 71)

Tablica 10. Zajednička deskriptivna statistička analiza antimikrobne osjetljivosti sojeva izoliranih iz obrisaka muške uretre i eksprimata prostate (ukupno 17 uzoraka) (stranica 71)

Tablica 11. Deskriptivna statistička analiza antimikrobne osjetljivosti sojeva izoliranih iz svih vrsta kliničkih uzoraka (ukupno 40 uzoraka) (stranica 73)

Tablica 12. Minimalne inhibitorne i minimalne klamicidne koncentracije referentnih klamidijskih sojeva (serovar E i serovar F) (stranica 73)

Tablica 13. Kruskal-Wallisov test za analizu distribucijske razlike minimalnih inhibitornih i minimalnih klamicidnih koncentracija između testiranih antimikrobnih lijekova (stranica 80)

Tablica 14. Post-hoc analiza višestruke usporedbe minimalnih inhibitornih koncentracija antimikrobnih lijekova u odnosu na jednu prilagođenu p-vrijednost ($p = 0,05$) (stranica 81)

Tablica 15. Post-hoc analiza višestruke usporedbe minimalnih klamicidnih koncentracija antimikrobnih lijekova u odnosu na jednu prilagođenu p-vrijednost ($p = 0,05$) (stranica 81)

Tablica 16. Spearmanov korelacijski test za utvrđivanje odnosa minimalnih inhibitornih koncentracija između različitih antimikrobnih lijekova (stranica 82)

Tablica 17. Spearmanov korelacijski test za utvrđivanje odnosa minimalnih klamicidnih koncentracija između različitih antimikrobnih lijekova (stranica 82)

Tablica 18. Kruskal-Wallisov test za analizu distribucijske razlike minimalnih inhibitornih koncentracija za sva tri antibiotika među različitim kliničkim uzorcima (stranica 92)

Tablica 19. Kruskal-Wallisov test za analizu distribucijske razlike minimalnih klamicidnih koncentracija za sva tri antibiotika među različitim kliničkim uzorcima (stranica 92)

Tablica 20. Post-hoc analiza višestruke usporedbe minimalne inhibitorne i minimalne klamicidne koncentracije različitih kliničkih uzoraka za sva tri antibiotika u odnosu na jednu prilagođenu p-vrijednost ($p = 0,05$) (stranica 93-94)

Tablica 21. Mann-Whitneyev U-test za analizu distribucijske razlike minimalnih inhibitornih koncentracija za sva tri antibiotika među izolatima cerviksa i muške uretre zajedno s eksprimatom prostate (stranica 94)

Tablica 22. Mann-Whitneyev U-test za analizu distribucijske razlike minimalnih klamicidnih koncentracija za sva tri antibiotika među izolatima cerviksa i muške uretre zajedno s eksprimatom prostate (stranica 95)

Izračun 1. Izračun potencije antimikrobnog lijeka za potrebe pripravljanja izvorne otopine na primjeru azitromicina (Izvor formula: CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard - Ninth Edition. CLSI document M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.) (stranica 58)

Životopis

Tomislav Meštrović rođen je 1983. godine u Zagrebu. 2001. godine je završio Klasičnu gimnaziju u Zagrebu, a 2003. godine srednju glazbenu školu „Ferdo Livadić“ u Samoboru (smjer teorija glazbe i kompozicija). Na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu diplomirao je 2007. godine. Bio je jedan od urednika studentskog časopisa „Medicinar“. Obavezni pripravnički staž obavio je u periodu 2007.-2008. godine kao stažist psihijatrijske bolnice „Sveti Ivan“ u Zagrebu, a u studenom 2008. godine polaže državni ispit. Od 2009. godine zaposlen je u Poliklinici za medicinsku mikrobiologiju s parazitologijom, ginekologiju, internu medicinu, urologiju i medicinu rada „Dr. Zora Profozić“ u Zagrebu, kada započinje i sa specijalizacijom iz medicinske mikrobiologije s parazitologijom. Tijekom specijalističkog usavršavanja završio je specijalistički poslijediplomski studij „Medicinska mikrobiologija s parazitologijom“. Specijalistički ispit polaže u prosincu 2013. godine. Iste godine završava doktorski poslijediplomski studij „Biomedicina i zdravstvo“, a u sklopu izrade disertacije sudjelovao je na znanstveno-istraživačkom projektu voditeljice prof. dr. sc. Višnje Škerk pod nazivom „Istraživanje etiologije, epidemiologije, dijagnostike i liječenja bolesnika sa sindromom prostatitisa“. Od travnja 2006. godine do ožujka 2013. godine bio je vanjski suradnik hrvatskog izdanja časopisa „Reader's Digest“, a od lipnja 2007. godine je suradnik i savjetnik za medicinska pitanja na internetskim portalima tvrtke PLIVA Hrvatska d.o.o. Autor je znanstvenih i stručnih članaka. Aktivno je sudjelovao na brojnim domaćim i međunarodnim skupovima. Član je Hrvatske liječničke komore, Hrvatskog liječničkog zbora, Hrvatskog društva za medicinsku mikrobiologiju i parazitologiju te Europskog društva za kliničku mikrobiologiju i zarazne bolesti.