

Spoznaje o antimikrobnoj djelotvornosti azitromicina sukladno prvomu hrvatskom istraživanju antibiotske osjetljivosti klamidijskih izolata iz mokraćno-spolnog sustava

Insights on the Antimicrobial Efficacy of Azithromycin According to the First Croatian Antibiotic Susceptibility Study of Chlamydia trachomatis Isolates from Genitourinary Tract

TOMISLAV MEŠTROVIĆ^{1,2}, SUNČANICA LJUBIN-STERNAK^{3,4}

¹Poliklinika „Dr. Zora Profozić“, Zagreb; ²Sveučilište Sjever, Sveučilišni centar Varaždin;

³Nastavni zavod za javno zdravstvo „Dr. Andrija Štampar“, Zagreb;

⁴Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

SAŽETAK — Bez obzira na to što je rezistencija bakterija na antibiotike (antimikrobna otpornost) jedan od glavnih izazova moderne medicine, klamidijska je infekcija dosad pokazivala dobar klinički odgovor na lijek prvog izbora – azitromicin. Ipak, u literaturi postoje ponovljeni opisi laboratorijski dokazane rezistencije spolno prenosive bakterije *Chlamydia trachomatis* (*C. trachomatis*) koja uzrokuje ovu infekciju. Osim toga, Hrvatska je zemlja s visokom stopom propisivanja azitromicina i drugih antimikrobnih lijekova, što može utjecati na pojavu otpornosti ili slabijeg odgovora na terapiju. U skladu s time cilj prvoga hrvatskog istraživanja antimikrobnog profila *C. trachomatis* bio je utvrditi djelotvornost azitromicina i drugih antibiotika prema urogenitalnim kliničkim izolatima *C. trachomatis* u laboratorijskim uvjetima. U staničnome modelu McCoyevih stanica određivane su minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) i minimalna klamidicidna koncentracija (MCC), a svi ispitivani sojevi bili su osjetljivi na azitromicin (MIC < 4 µg/ml). Premda rezistentni sojevi bakterije nisu nađeni, kod određenih izolata uočene su znatno više vrijednosti MCC-a za azitromicin, što pokazuje trend moguće smanjene osjetljivosti. Bez obzira na zahtjevnju metodologiju, potrebno je nastaviti s ovakvim istraživanjima, poglavito u zemljama s velikim opterećenjem propisivanja antibiotika.

KLJUČNE RIJEČI: *Chlamydia trachomatis*, spolno prenosive infekcije, antibiotici, azitromicin, antimikrobna otpornost

SUMMARY — Regardless of the fact that antimicrobial resistance represents one of the most pressing issues of modern medicine, thus far chlamydial infection responded well to the first-line therapy i.e. azithromycin. Nonetheless, laboratory-confirmed resistance of sexually-transmitted pathogen *Chlamydia trachomatis* (*C. trachomatis*) causing this infection has been repeatedly described in the literature; furthermore, Croatia belongs to the group of countries that exhibit high prescribing rates of azithromycin and other antimicrobial drugs, which can, in turn, give rise to frank resistance or decreased susceptibility. Accordingly, the first Croatian antibiotic susceptibility study of *C. trachomatis* aimed to assess *in vitro* effectiveness of azithromycin and other antibiotics against clinical chlamydial isolates from genitourinary tract. McCoy cell culture model was used to assess minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal chlamydicidal concentration (MCC), and all the tested isolates were susceptible to azithromycin (MIC < 4 µg/ml). Although no resistant strains have been found, certain isolates showed significantly higher values of MCC for azithromycin, pointing towards the trend of possible decreased susceptibility. Regardless of the complex methodology, it is pivotal to continue with this kind of resistance surveillance, especially in countries with high antibiotic prescribing rate.

KEY WORDS: *Chlamydia trachomatis*, sexually transmitted infections, antibiotics, azithromycin, antimicrobial resistance



Uvod

Rezistencija ili otpornost bakterija na antimikrobne lijekove nesumnjivo je jedan od glavnih izazova današnje medicine koji dovodi u pitanje ne samo uspješno liječenje zaraznih bolesti već i daljnji znanstveni i medicinski napredak (1). Uvođenje penicilina u redovitu kliničku praksu

ranih četrdesetih godina prošlog stoljeća (2) te posljedični razvoj brojnih novih antibiotika (3) rezultirali su visokim stupnjem zdravstvene zaštite kakva nam je danas poznata. S druge strane, širenje rezistencije zbog brzog evolucijskog prilagođavanja različitih bakterijskih vrsta te povećane potrošnje lijekova postali su svakodnevica – i u bolničkim sre-

dinamika i izvan njih (4). Uzevši u obzir da je 80% kliničkih izolata bakterije *Neisseria gonorrhoeae* (uzročnika gonoreje) danas otporno na neki od antimikrobnih lijekova, kao i godišnju pojavnost od 440.000 slučajeva multirezistentne tuberkuloze (što su samo dva eklatantna primjera fakultativno unutarstaničnih bakterija), velik broj stručnjaka slaže se da smo već duboko zagazili u tzv. postantibiotsku eru (5).

Klamidijaza je najčešća bakterijska spolno prenosiva zarazna bolest na svijetu uzrokovana bakterijom *Chlamydia trachomatis* (*C. trachomatis*) (6). Premda se kod muškaraca i žena infekcija može manifestirati upalom mokraćne cijevi, a kod žena još i upalom vrata maternice, u velikom postotku slučajeva infekcija je asimptomatska, što posljedično povisuje rizik od razvoja komplikacija (poput zdjelične upalne bolesti) (7). U skladu s time nužna je pravodobna i pouzdana laboratorijska dijagnostika ove infekcije kako bi se u slučaju pozitivnog nalaza što prije provelo liječenje (6, 7). Terapija prvog izbora već je dulje vrijeme azitromicin (1 g oralno jednokratno), a može se primijeniti i doksiciklin (2 × 100 mg na dan tijekom 7 dana) (6).

Dosad se rezistenciji *C. trachomatis* u ljudi nije pridavala velika pozornost, ponajviše s obzirom na činjenicu da se ovaj mikroorganizam razmnožava samo u citoplazmi stanice osjetljivog domaćina, zbog čega je stjecanje rezistencije rijedak moment u vrlo specifičnom životnom ciklusu bakterije (8). Ipak, kontinuirana i ponavljana primjena antibiotika može za posljedicu imati razvoj tzv. kompenzatornih mutacija u određenim klamidijskim izolatima, bez obzira na eventualno žrtvovanje nekih drugih kolonizatorskih sposobnosti organizma zbog takvih mutacija (tzv. *fitness cost*) (9). Osim toga, mogućnost selektiranja antimikrobne rezistencije kod izlaganja subinhibitornim koncentracijama antibiotika u laboratorijskim uvjetima sugerira da bi sličan mehanizam mogao biti potencijalan izvor rezistentne *C. trachomatis* kod ljudi ili životinja izloženih antimikrobnoj terapiji (10).

Među članicama projekta *The European Surveillance of Antimicrobial Consumption* (ESAC), koji je kao cilj imao praćenje uporabe antimikrobnih lijekova u pojedinim europskim zemljama, Hrvatska s 23,37 DDD na 1000 stanovnika spada među države s velikom izvanbolničkom potrošnjom antibiotika (11). Stanje je još izraženije u gradu Zagrebu, gdje je 2010. godine potrošnja bila 33,28 DDD na 1000 stanovnika (12). Osim toga, prema istraživanju iz 2010. godine, stope propisivanja azitromicina i sulfonamida u našoj zemlji bile su najviše u Europi (13). Takva pretjerana potrošnja antimikrobnih lijekova nesumnjivo je znatan rezervoar stvaranja i daljnjeg širenja antimikrobne rezistencije.

Sve su to razlozi zbog kojih je prvi put u Hrvatskoj provedena studija radi definiranja antimikrobnog profila kliničkih izolata *C. trachomatis* kako bi se dobio uvid u koncentracije

antibiotika potrebne da zaustave infekciju u laboratorijskom modelu (14 – 16). Nit vodilja istraživanja bila je preciznija procjena učinkovitosti standardno propisivane terapije, moguće otkrivanje rezistentnih ili slabije osjetljivih klamidijskih izolata, stvaranje baze antimikrobnog profila kliničkih sojeva te (prema potrebi) revizija terapijskih smjernica (14). Na antibiotik azitromicin (kao prvi izbor u liječenju ove infekcije) stavljen je poseban naglasak.

Materijal i metode

Pri testiranju antimikrobne osjetljivosti klamidijskih sojeva posebnu pozornost valja obratiti na uvjete koji utječu na sposobnost *C. trachomatis* da inficira stanice u kulturi, kao i na aktivnost izabranog antimikrobnog lijeka u laboratorijskom modelu (10). Radi smanjenja potencijalne varijabilnosti rezultata, valja se odlučiti za staničnu liniju s malim brojem pasaža uz obvezatnu kontrolu kvalitete. Iako je stanična kultura uniformnog (tj. polariziranog) rasta generalno konzistentnija u prihvatu antibiotika, ona je tehnički znatno zahtjevnija te se stoga rijetko rabi. Nadalje, razrjeđenja antibiotika potrebno je prirediti tako da se osigura njihova prikladna potencija, što znači da se pripremaju neposredno prije dodavanja u netom inficirane stanice (14).

U prvome hrvatskom istraživanju antimikrobne osjetljivosti urogenitalnih klamidijskih sojeva rabljene su McCoyeve stanice, što je kontinuirana stanična kultura fibroblasta adherentnog rasta iz domaćeg miša (*Mus musculus*) (14). Suspenzija stanica pripremljena je u čistom Eaglovu minimalnom esencijalnom mediju (MEM-u) s desetopostotnim fetalnim serumom (bez dodatka antibiotika i cikloheksimida), a zatim je rastočena u mikrotitarsku pločicu po 100 µl u mikrotitarsku pločicu s 96 jažica. Četrdeset kliničkih izolata *C. trachomatis* (izoliranih iz obrisaka vrata maternice, obrisaka mokraćne cijevi i ekprimata prostate) te dva referentna soja umnoženi su do veličine inokuluma (5000 – 10.000 inkluzijskih jedinica po jažici mikrotitarske pločice), što znači da su inficirali stanice u znatnom broju kako bi se mogao prikladno ispitati njihov antimikrobni profil.

Za svaki umnoženi soj upotrijebljeno je razrjeđenje antibiotika u rasponu od 0,008 do 8 µg/ml, s planiranim povišenjem koncentracije u slučaju detekcije rezistentnih, tj. slabije osjetljivih sojeva. Pri testiranju istodobno su upotrijebljene dvije mikrotitarske pločice: jedna u kojoj se određivala minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) i druga u kojoj se određivala minimalna klamidijska koncentracija (MCC) lijeka. Za detekciju klamidijskih inkluzija upotrijebljena su monoklonska protutijela obilježena fluoresceinom.

Vizualizacija inkluzija obavljena je s pomoću invertirnog fluorescentnog mikroskopa, uz precizno definiranje MIC-a i MCC-a. Sukladno drugim istraživanjima u ovom području (10, 17 – 19) MIC je tako mikroskopski definiran kao najniža

koncentracija antimikrobnog lijeka kod koje nema vidljivih klamidijjskih inkluzija, a označava jedno razrjeđenje više od MIC_{TP}-a (što je koncentracija antibiotika kod koje dolazi do znatne promjene u broju i morfologiji inkluzija). S druge strane, MCC je mikroskopski definiran kao koncentracija antimikrobnog lijeka kod koje nije bilo vidljivih inkluzija nakon pasaže soja iz stanične kulture gdje je bio dodan antibiotik na staničnu kulturu bez antibiotika.

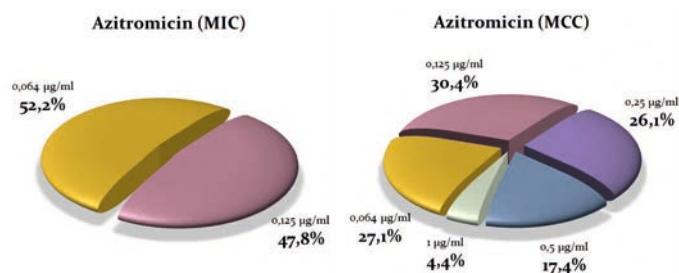
Rezultati

Prvo istraživanje osjetljivosti urogenitalnih klamidijjskih sojeva u Hrvatskoj pokazalo je potpunu osjetljivost svih ispitivanih izolata (dakle iz obrisaka vrata maternice, obrisaka mokraćne cijevi te iz eksprimata prostate) na antibiotik azitromicin. Drugim riječima, obrazac „homotipne“ ili „heterotipne“ rezistencije nije nađen ni kod jednoga klamidijjskog izolata podvrgnutog testiranju.

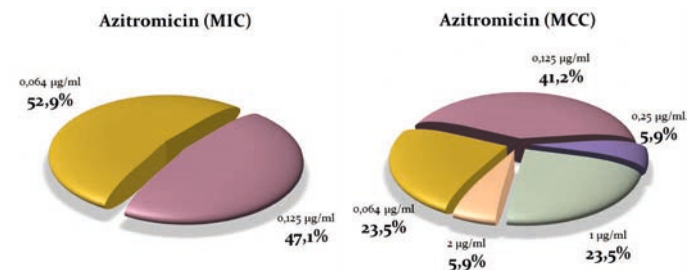
Ipak, specifična analiza bila je potrebna da bi se dobio uvid u konkretne vrijednosti MIC-ova i MCC-ova azitromicina za izolate iz različitih anatomskih sijela. Postotni udio MIC-ova i MCC-ova azitromicina za klamidijjske sojeve izolirane iz obrisaka vrata maternice prikazan je na slikama 1. i 2., za sojeve iz obrisaka mokraćne cijevi kod muškaraca i eksprimata prostate na slikama 3. i 4., a grupno za sve izolate na slikama 5. i 6. Medijan MIC-a azitromicina iznosio je 0,64 µg/ml, a medijan MCC-a 0,125 µg/ml, no u navedenim prikazima vidljiv je uski koncentracijski raspon kod MIC-ova, a širi koncentracijski raspon kod MCC-ova.

Usporedbom koncentracijskih medijana izolata iz različitih sijela nije nađena statistički značajna razlika između obrisaka vrata maternice, obrisaka muške uretre zajedno s eksprimatom prostate te referentnih sojeva ($p > 0,05$), što je potvrđeno *post-hoc* analizom višestruke usporedbe u odnosu prema jednoj prilagođenoj *p*-vrijednosti ($p = 0,05$) (tablica 1.). Dakle, bez obzira na anatomsko sijelo kliničkog izolata *C. trachomatis*, azitromicin se u laboratorijskim (*in vitro*) uvjetima pokazao jednako učinkovitim.

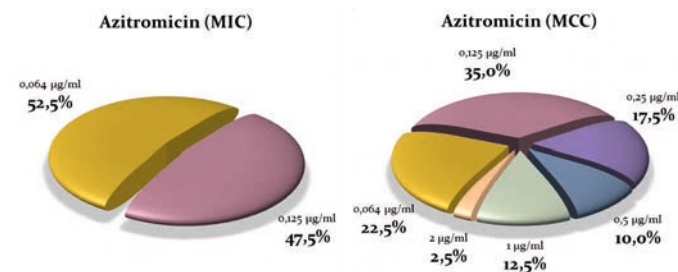
SLIKE 1. I 2. Postotni udio minimalnih inhibitornih koncentracija (MIC) i minimalnih klamicidnih koncentracija (MCC) klamidijjskih izolata iz obrisaka vrata maternice (N = 23) (14)



SLIKE 3. I 4. Postotni udio minimalnih inhibitornih koncentracija (MIC) i minimalnih klamicidnih koncentracija (MCC) klamidijjskih izolata iz obrisaka muške uretre i eksprimata prostate (N = 17) (14)



SLIKE 5. I 6. Postotni udio minimalnih inhibitornih koncentracija (MIC) i minimalnih klamicidnih koncentracija (MCC) klamidijjskih izolata iz svih vrsta kliničkih uzoraka (N = 40) (14)



TABLICA 1. *Post-hoc* analiza višestruke usporedbe minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) i minimalne klamicidne koncentracije (MCC) različitih kliničkih uzoraka za azitromicin u odnosu prema jednoj prilagođenoj *p*-vrijednosti ($p = 0,05$) pokazuje da nema statistički značajnih razlika u odnosu prema anatomskom sijelu uzorka (14)

Uspoređeni par	Uočena razlika	Kritična vrijednost	Razlika
Vrat maternice – Mokraćna cijev (Azitromicin MIC)	0,1611253	9,393563	NEMA
Vrat maternice – Mokraćna cijev (Azitromicin MCC)	0,1086957	9,393563	NEMA
Vrat maternice – Referentni sojevi (Azitromicin MIC)	0,4565217	21,651093	NEMA
Vrat maternice – Referentni sojevi (Azitromicin MCC)	1,3586957	21,651093	NEMA
Mokraćna cijev – Referentni sojevi (Azitromicin MIC)	0,6176471	21,954628	NEMA
Mokraćna cijev – Referentni sojevi (Azitromicin MCC)	1,2500000	21,954628	NEMA

Rasprava

Profil antimikrobne osjetljivosti *C. trachomatis* ne ovisi samo o antibiotskom opterećenju nego i o okolišnim uvjetima te čimbenicima specifičnim za stanice domaćina (20). U ovome prvom hrvatskom istraživanju antibiotske osjetljivosti klamidijских izolata iz mokraćno-spolnog trakta azitromicin se pokazao kao lijek koji i dalje pokazuje izvrsnu antimikrobnu djelotvornost u uvjetima *in vitro* (14 – 16), što se potvrđuje i kliničkim odgovorom pacijenata na propisani lijek. Isto tako ovi se rezultati podudaraju s obrascem laboratorijske osjetljivosti klamidijских sojeva u drugim sličnim istraživanjima u medicinsko-znanstvenoj literaturi (10, 17 – 19).

No iako se u novim studijama *in vitro* potvrđuje dobra osjetljivost klamidijских izolata na antimikrobne lijekove iz standardno propisanih skupina, čini se da je rezistencija urogenitalnih klamidijских sojeva na makrolide (ali i tetracikline i fluorokinolone) itekako moguća (20). Više istraživača objavilo je opise rezistentnih klamidijских sojeva uz prikladnu kliničko-laboratorijsku korelaciju (21 – 26). Svi takvi rezistentni izolati pokazivali su obrazac „heterotipne rezistencije“, tj. fenomen gdje samo malen broj mikroorganizama (tek 1% bakterijske populacije) preživljava vrlo visoke koncentracije antibiotika (10). Kao glavni pokretač u razvoju rezistencije klamidijских sojeva sve se više implicira lateralni prijenos gena, što je proces prepoznat u evoluciji tog uzročnika (27, 28). Takav prijenos genskog materijala u slučajevima miješanih infekcija s različitim klamidijским sojevima lako se može detektirati u laboratorijskim uvjetima (29). Neka istraživanja ističu da je barem nekoliko postotaka infekcija u ljudi uzrokovano višestrukim sojevima *C. trachomatis*, što otvara vrata za njihovu rekombinaciju (30). Premda se smatra da je prijenos gena rezistencije ovim mehanizmom rijedak moment, svakako su potrebna dodatna istraživanja na kliničkim izolatima (i to ponajprije rezistentnim) te primjena funkcionalne i komparativne genomike kako bi se odredili stupanj i raznolikost rekombinacije (31).

Pojava klamidijских izolata rezistentnih na antibiotike generalno se može očekivati tek nakon višestruko provedenih kura liječenja. Ako povučemo paralele s bakterijom *Streptococcus pneumoniae* (važan uzročnik upale pluća), kod nje se rezistencija na azitromicin očituje tek nakon uzastopnih godišnjih terapijskih režima radi liječenja klamidijске infekcije poznate kao trahom (32). Dakle, selektivni pritisak ponavljane distribucije azitromicina mogao bi omogućiti brzo širenje rezistentnih klonova (33). Upravo je zbog toga opravdano pitanje ima li široka potrošnja antimikrobnih lijekova i u kojoj mjeri utjecaj na profil osjetljivosti sojeva *C. trachomatis*. Odgovore na takva pitanja treba tražiti ovom vrstom probira antimikrobne osjetljivosti kliničkih klamidijских izolata u zemljama s visokom stopom propisivanja antibiotika.

Iako rezistencije na azitromicin u istraživanju nije bilo te su vrijednosti MIC-a bile i više nego zadovoljavajuće, MCC za azi-

tromicin dosegnuo je 2 µg/ml, što je uz samu granicu rezistencije koja (sukladno konsenzusu stručnjaka u ovom području) iznosi 4,0 µg/ml. Premda je samo jedan klinički izolat iz hrvatskih pacijenata dosegao tu koncentraciju (slika 4.), MCC za azitromicin iznosio je 1,0 µg/ml kod čak 23,5% izolata iz obrisaka muške uretre i eksprimata prostate (slika 4.) te kod 12,5% svih testiranih izolata (slika 6.). Dakako, navedeno je daleko od bilo kakve laboratorijske (a napose klinički) važne otpornosti, ali svakako pokazuje trend moguće smanjene osjetljivosti koji bi trebalo nastaviti nadzirati.

S obzirom na to treba naglasiti i rezultate hrvatskog istraživanja na uzorku od 150 pacijenata s akutnim uretralnim klamidijским sindromom (34). Naime, u skupini žena kod kojih su kliničke tegobe prije početka terapije trajale tri tjedna ili više, puno bolje izlječenje uz eradikaciju postignuto je nakon administracije azitromicina u dozi od 500 mg na dan tijekom šest dana nego nakon jednokratne doze od jednoga grama (34). Osim toga, neki autori savjetuju kombiniranu terapiju makrolidima i fluorokinolonima radi bolje sigurnosti u eradikaciji *C. trachomatis*, napose u muških pacijenata sa simptomima kroničnog prostatitisa (35). Upravo je to populacija kod koje bi trebalo provesti ovakvu vrstu probira kako bi se vidjelo radi li se možda o klamidijским sojevima s višim vrijednostima MIC-a ili MCC-a. S druge strane, iskustva iz drugih grana mikrobiologije uče nas koliko je zapravo dug put do standardizacije određenih metoda za određivanje antimikrobne osjetljivosti; primjerice, ni danas još ne možemo prikladno interpretirati MIC-ove za velik broj gljivičnih izolata (36, 37). Za klamidijске izolate možemo reći da smo na dobrom putu, premda je još potrebno raditi na standardizaciji metodologije, čemu će pridonijeti i ovakva istraživanja. Problematični su zahtjevnost, vremensko opterećenje i skupoća izrade antibiograma u staničnoj kulturi, zbog čega se ona još provodi samo u specijaliziranim laboratorijima i ponajviše u znanstvene svrhe (8). Zadovoljavajuća molekularna metoda, koja bi polako ušla u rutinsku primjenu, vjerojatno bi olakšala i ubrzala čitav proces, a i tu se već naziru određeni pomaci (38).

Sa sigurnošću možemo reći da je izrada antimikrobnog profila klamidijских izolata u zemljama s visokom stopom propisivanja antibiotika te nakon neuspjeha liječenja ključan zadatak u daljnjem razumijevanju rezistencije ovog mikroorganizma, kao i korelacije laboratorijskog nalaza / antibiograma s kliničkim ishodom. Ovo hrvatsko istraživanje jedan je od doprinosa prema ostvarenju tog cilja. U budućnosti će daljnji razvoj brzih molekularnih metoda (38, 39) olakšati određivanje čimbenika koji mogu dovesti do razvoja klinički važne rezistencije, a samim time i unaprijediti naše razumijevanje ove složene problematike. Unutarstanični život i druge značajke *C. trachomatis* (7, 40) daju nam rijetku priliku da budemo korak ispred malo vjerojatnog, ali ipak mogućega globalnog i klinički važnog širenja antimikrobne otpornosti.

LITERATURA

1. Sw LO, Kumar N, Wheeler NE. Breaking the code of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol* 2018;16:262. DOI: 10.1038/nrmicro.2018.33.
2. Porritt AE. The discovery and development of penicillin. *Med Press* 1951;225:460–2.
3. Brown ED, Wright GD. Antibacterial drug discovery in the resistance era. *Nature* 2016;529:336–43. DOI: 10.1038/nature17042.
4. Allcock S, Young EH, Holmes M i sur. Antimicrobial resistance in human populations: challenges and opportunities. *Glob Health Epidemiol Genom* 2017;2:e4. DOI: 10.1017/ghg.2017.4.
5. Kåhrström CT. Entering a post-antibiotic era? *Nat Rev Microbiol* 2013;11:146. DOI: 10.1038/nrmicro2983.
6. O'Connell CM, Ferone ME. *Chlamydia trachomatis* Genital Infections. *Microb Cell* 2016;3:390–403. DOI: 10.15698/mic2016.09.525.
7. Ljubin-Sternak S, Meštrović T. *Chlamydia trachomatis* and Genital Mycoplasmas: Pathogens with an Impact on Human Reproductive Health. *J Pathog* 2014;2014:183167. DOI: 10.1155/2014/183167.
8. Meštrović T, Ljubin-Sternak S, Bedenić B. Technical aspects of *Chlamydia trachomatis* antimicrobial susceptibility testing in cell culture system. *Tehnički Glasnik* 2015;9:136–41.
9. 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. DOI: 10.1128/AAC.01321–09.
10. 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. DOI: 10.1128/AAC.47.2.636-642.2003.
11. ESAC European Map. Outpatient antibiotic use (ESAC: 2001–2010); Country overview of antimicrobial consumption. Dostupno na: <https://ecdc.europa.eu/en/antimicrobial-consumption/database/country-overview>. Datum pristupa: 19. 8. 2018.
12. Golub A, Štimac D. Outpatient consumption of antibiotics in the City of Zagreb (2006–2010). *Med Glas (Zenica)* 2014;11:216–20.
13. 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. DOI: 10.3325/cmj.2010.51.524.
14. Meštrović T. Učinkovitost azitromicina, doksiciklina i levofloksacina *in vitro* na urogenitalne sojeve *Chlamydia trachomatis*. Disertacija. Središnja medicinska knjižnica Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu; 2014.
15. Ljubin-Sternak S, Meštrović T, Vilibić-Čavlek T i sur. *In vitro* susceptibility of urogenital *Chlamydia trachomatis* strains in a country with high azithromycin consumption rate. *Folia Microbiol (Praha)* 2013;58:361–5. DOI: 10.1007/s12223-012-0218-2.
16. Meštrović T, Ljubin-Sternak S, Sviben M i sur. Antimicrobial Sensitivity Profile of *Chlamydia trachomatis* isolates from Croatia in McCoy Cell Culture System and Comparison with the Literature. *Clin Lab* 2016;62:357–64. DOI: 10.7754/Clin.Lab.2015.150624.
17. Donati M, Di Francesco A, D'Antuono A i sur. *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. DOI: 10.1128/AAC.00553-10.
18. 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. DOI: 10.1016/S0732-8893(01)00221-8.
19. Takahashi S, Hamasuna R, Yasuda M i sur. Nationwide surveillance of the antimicrobial susceptibility of *Chlamydia trachomatis* from male urethritis in Japan. *J Infect Chemother* 2016;22:581–6. DOI: 10.1016/j.jiac.2016.06.010.
20. Meštrović T, Ljubin-Sternak S. Molecular mechanisms of *Chlamydia trachomatis* resistance to antimicrobial drugs. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2018;23:656–670. DOI: 10.2741/4611.
21. 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. DOI: 10.1093/infdis/162.6.1309.
22. Lefèvre JC, Lépargneur JP, Guion D, Bei S. Tetracycline-resistant *Chlamydia trachomatis* in Toulouse, France. *Pathol Biol (Paris)* 1997;45:376–8.
23. 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. DOI: 10.1097/00007435-199808000-00005.
24. 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. DOI: 10.1086/315372.
25. Misiurina OIU, Shipitsina EV, Finashutina IUP i sur. Analysis of point mutations in the *yjeD*, *gyrA* and *parC* genes in fluoroquinolones resistant clinical isolates of *Chlamydia trachomatis*. *Mol Gen Mikrobiol Virusol* 2004;3:3–7.
26. 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. DOI: 10.1159/000314998.
27. 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. DOI: 10.1128/JB.00845-06.
28. 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. DOI: 10.1186/1745-6150-6-28.
29. Demars R, Weinfurter J. Interstrain gene transfer in *Chlamydia trachomatis in vitro*: mechanism and significance. *J Bacteriol* 2008;190:1605–14. DOI: 10.1128/JB.01592-07.

30. 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. DOI: 10.1099/00222615-43-1-14.
31. 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. DOI: 10.1128/JB.06268-11.
32. Fry AM, Jha HC, Lietman TM i sur. 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. DOI: 10.1086/341414.
33. Leach AJ, Shelby-James TM, Mayo M i sur. 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. DOI: 10.1093/clinids/24.3.356.
34. Škerk V, Schönwald S, Strapac Z i sur. 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. DOI: 10.1179/joc.2001.13.2.176.
35. Magri V, Marras E, Škerk V i sur. Eradication of *Chlamydia trachomatis* parallels symptom regression in chronic bacterial prostatitis patients treated with a fluoroquinolone-macrolide combination. *Andrologia* 2010;42:366–75. DOI: 10.1111/j.1439-0272.2009.01033.x.
36. 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. DOI: 10.1586/14787210.7.1.107.
37. Lass-Flörl C, Perkhof S, Mayr A. *In vitro* susceptibility testing in fungi: a global perspective on a variety of methods. *Mycoses* 2010;53:1–11. DOI: 10.1111/j.1439-0507.2009.01813.x.
38. Eszik I, Lantos I, Önder K i sur. High dynamic range detection of *Chlamydia trachomatis* growth by direct quantitative PCR of the infected cells. *J Microbiol Methods* 2016;120:15–22. DOI: 10.1016/j.mimet.2015.11.010.
39. Zhang Y, Xian Y, Gao L i sur. Novel Detection Strategy To Rapidly Evaluate the Efficacy of Antichlamydial Agents. *Antimicrob Agents Chemother* 2017;61:pii:e02202–16.
40. 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. DOI: 10.1556/AMi-cr.54.2007.1.2.



ADRESA ZA DOPISIVANJE:

Doc. dr. sc. Tomislav Meštrović, dr. med.
 Poliklinika „Dr. Zora Profozić“
 Bosutska 19, 10000 Zagreb
 e-mail: tomislav.mestrovic@gmail.com

PRIMLJENO/RECEIVED:

20. 8. 2018./August 20, 2018

PRIHVAĆENO/ACCEPTED:

30. 8. 2018./August 30, 2018

