

SEMMELWEIS EGYETEM
DOKTORI ISKOLA

Ph.D. értekezések

2163.

BRUNNER ALEXANDRA

Bőrgyógyászat és venerológia
című program

Programvezető: Dr. Sárdy Miklós, egyetemi tanár
Témavezető: Dr. Ostorházi Eszter, egyetemi docens

A gonorrhoea fertőzés: *Neisseria gonorrhoeae* törzsek antibiotikum-rezisztencia vizsgálata és molekuláris tipizálása

Doktori értekezés

dr. Brunner Alexandra

Semmelweis Egyetem
Klinikai orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Ostorházi Eszter, PhD, egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Sziller István, PhD, osztályvezető főorvos
Dr. Beke Artúr, PhD, egyetemi adjunktus

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Cseh Károly, DSc, egyetemi tanár
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Szalai Zsuzsanna, PhD, osztályvezető főorvos
Dr. Melczer Zsolt, PhD, egyetemi docens

Budapest
2017

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke	5
2. Bevezetés.....	7
2.1. Történelmi vonatkozások	8
2.2. A fertőzés epidemiológiája	8
2.2.1. A fertőzés megjelenése világszerte.....	8
2.2.2. A fertőzés megjelenése Európában.....	9
2.2.3. A fertőzés megjelenése Magyarországon	12
2.3. Patogenezis	13
2.4. Patogenitás.....	13
2.4.1. Klinikai kép férfiak esetén.....	13
2.4.2. Klinikai kép nők esetén	15
2.4.3. Extragenitális fertőzések klinikai képe.....	16
2.5. Diagnosztika	17
2.5.1. Mikroszkópos vizsgálat (1000x nagyítással, immerzióval)	17
2.5.2. Tenyésztés	18
2.5.3. Molekuláris eljárások	19
2.6. Terápiás ajánlások	20
2.6.1. Magyar terápiás ajánlások	20
2.6.2. Európai ajánlás	21
2.6.3. Terápiás irányelvek a világ többi részén	22
2.7. Terápiáról a múltban.....	24
2.8. Az antibiotikum-terápiáról a jelenben	29
2.8.1. Az azithromycinről.....	29
2.8.2. Cephalosporinokról	34
2.9. Az antibiotikum-terápiáról a jövőben.....	41
2.10. A tipizálási eljárások és az antibiotikum-rezisztencia kapcsolata	44
2.10.1. <i>Neisseria gonorrhoeae</i> multiantigén szekvencia tipizálás (NG-MAST) ...	44
2.10.2. Egyéb tipizáló eljárások összevetése az NG-MAST vizsgálattal.....	47
3. Célkitűzések	49
4. Módszerek	51
4.1. Adatgyűjtés.....	51

4.2. A <i>N. gonorrhoeae</i> baktériumok tenyésztése	51
4.3. A rezisztencia vizsgálata Epsilometer-tesztel	51
4.4. Multiplex PCR vizsgálat koinfekciók kimutatására	52
4.5. Az NG-MAST módszer lépései.....	52
4.5.1. <i>Neisseria gonorrhoeae</i> törzsek tenyésztése fagyasztást követően	53
4.5.2. DNS kivonása	53
4.5.3. <i>PorB</i> és <i>tbpB</i> szakaszok felsokszorozása PCR módszerrel	55
4.5.4. Az amplifikált szakaszok jelenlétének ellenőrzése gélelektroforézissel	56
4.5.5. Tisztítás exonukleázzal és alkalikus foszfáttal	57
4.5.6. Big dye, azaz szekvenáló PCR: a dinukleotidok jelölése	57
4.5.7. Oszlopos tisztítás nucleoseq kittel	58
4.5.8. Hozzáadás formamidhoz	58
4.5.9. Szekvencia-analízis ChromasLite programmal	58
4.6. Filogenetikai fa készítése.....	59
5. Eredmények	60
5.1. Epidemiológiai adatok 2010 és 2014 között a Mikrobiológiai Laboratórium vizsgálati anyaga alapján	60
5.1.1. A <i>N. gonorrhoeae</i> pozitív tenyésztések aránya	60
5.1.2. A tenyésztéssel igazolt gonorrhoeás nők és férfiak kor szerinti eloszlása ...	61
5.1.3. Pozitív tenyésztések eloszlása anatómiai lokalizáció és nem szerint	62
5.1.4. Antibiotikum-rezisztencia alakulása az elmúlt 5 évben	64
5.1.5. A 2014-ben megjelenő azithromycin-rezisztens törzsek elemzése	66
5.1.6. A <i>Chlamydia trachomatis</i> infekció megjelenése.....	66
5.2 Az NG-MAST módszerrel vizsgált törzsek eredményei.....	67
5.2.1. 2013-ban izolált, 52 NG-MAST módszerrel vizsgált törzs eredménye	67
5.2.2. 2014-ben izolált, 50 azithromycin-rezisztens törzs NG-MAST vizsgálat eredménye.....	69
5.2.3. Filogenetiki vizsgálatok.....	72
6. Megbeszélés	75
6.1. A gonorrhoeás nők és férfiak kor szerinti eloszlása	75
6.2. Az infekció megjelenése a különböző anatómiai lokalizációkban.....	75
6.3. Antibiotikum-rezisztencia alakulása az elmúlt 5 évben	76

6.4. A 2014-ben megjelenő, azithromycin-rezisztens törzsek elemzése	77
6.5. A <i>Chlamydia trachomatis</i> infekció megjelenése	78
6.6. NG-MAST vizsgálati eredmények kiértékelése	80
6.6.1. 2013-as 52 törzs szekvencia-tipizálása	80
6.6.2. A 2014-es, azithromycin-rezisztens szekvencia típusok eredményeinek megbeszélése	83
6.6.3. Filogenetikai vizsgálatok	83
7. Következtetések	85
8. Összefoglalás	86
8. Summary	87
9. Irodalomjegyzék	88
10. Saját publikációk jegyzéke	103
11. Köszönetnyilvánítás	104

1. Rövidítések jegyzéke

CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CRP	C-reactive protein
DNS	Dezoxiribonukleinsav
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control
EGASP	Enhanced Gonococcal Antimicrobial Surveillance Programme
ESBL	Extended-spectrum beta-lactamases
ESAC	European Surveillance of Antimicrobial Consumption
ESC	Extended Spectrum Cephalosporin
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
EURO-GASP	European Gonococcal Antimicrobial Surveillance Programme
GASP	Gonococcal Antimicrobial Surveillance Programme
GRASP	Gonococcal resistance to antimicrobials surveillance programme
GISP	Gonococcal Isolate Surveillance Project
HIV	Humán Immundeficiencia Virus
IM	Intramusculáris
IUSTI	International Union against Sexually Transmitted Infections
LGV	Lymphogranuloma venereum
MALDI TOF	Matrix-assisted laser desorption/ionization, Time-of-flight mass spectrometer
MDR	Multidrug-resistant
MEGA6	Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0
MIC	Minimum inhibitory concentration
MLST	Multilocus sequence typing
MPC	Mutant prevention concentration
MSM	Men who have sex with men
MSW	Men who have sex with women

NAD	Nikotinamid-adenin-dinukleotid
NAAT	Nucleic acid amplification test
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
NG-MAST	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> multi-antigen sequence typing
OEK	Országos Epidemiológiai Központ
PBP	Penicillin-binding protein
PCR	Polymerase chain reaction
PID	Pelvic inflammatory disease
PPNG	Penicillinase-producing <i>Neisseria gonorrhoeae</i>
ST	Sequence type
STD	Sexually transmitted diseases
TRNG	Tetracycline-Resistant <i>Neisseria gonorrhoeae</i>
XDR	Extensively-drug resistant
WGS	Whole genome sequencing
WHO	World Health Organization

2. Bevezetés

A gonorrhoea (tripper, kankó) a második leggyakoribb baktérium okozta nemi úton terjedő betegség (STD) a világon, melyet egy Gram-negatív, humánpatogén baktérium, a *Neisseria gonorrhoeae* okoz. Jelentős népegészségügyi problémát képvisel, befolyásolva az életminőséget, a fertilitást, a HIV transzmissziót, maga után vonva mindezek gazdasági hatásait [1]. Tekintettel a fertőzés gyakoriságának emelkedésére, a rezisztens baktériumok terjedésére, illetve az újabb antibiotikum-terápia hiányára, a probléma a jövőben fokozódni fog [2].

Az ezredforduló után a fertőzés incidenciája növekedésnek indult [2]. Kezelése kizárólag antibiotikum terápiával oldható meg, de az utóbbi évtizedekben egyre emelkedik az antibiotikum-rezisztens törzsek száma. Megjelentek a multirezisztens és kiterjedt rezisztenciával bíró (MDR, XDR) törzsek is, melyek az aktuális terápiás ajánlásban szereplő antibiotikumokra, a 3. generációs cephalosporinokra, az azithromycinre is rezisztensek. 2016-ban közölték az első terápiás kudarcot az elsővonalbeli kezelésként javasolt ceftriaxon és azithromycin kombináció adása után, az Egyesült Királyságban [3]. A WHO 2012-es kiadványa szerint elképzelhető, hogy a jövőben nem lesz rendelkezésre álló hatékony terápia az egyre terjedő rezisztens törzsek miatt, ezért is hangsúlyozza az antibiotikum-érzékenység folyamatos monitorozásának fontosságát. Mindez rávilágít arra a tényre, hogy milyen fontos és sürgető új terápiás tervek, új antibiotikumok bevezetése a gonorrhoea kezelésében [4]. A megfelelő terápiás terv létrehozásához az antibiotikum-rezisztencia viszonyok ismeretén túl, a DNS szekvencia-tipizáláson alapuló, NG-MAST (*Neisseria gonorrhoeae* multi-antigen sequence typing) módszer használható fel, mely módszerrel összefüggés mutatható ki az NG-MAST szekvencia típusok (ST-k) és a megfelelő rezisztencia fenotípusok között, és követhetővé válik a rezisztens törzsek terjedése. A *N. gonorrhoeae* izolátumok csoportosítására jelenleg ez a legelterjedtebb módszer világszerte, mely a törzsek között magas diszkriminációs lehetőséget kínál, jól reprodukálható, és az eredményei összevethetők a nemzetközi kutatások esetén is [5-7]. Az adott régióban leírt ST-k génein végzett filogenetikai vizsgálatokkal az ST-k közötti rokonsági kapcsolat, az evolúciós tendenciák írhatóak le.

Ennek megfelelően vizsgálatainkban nagy hangsúlyt fektettünk a magyarországi rezisztencia-viszonyok mérésére és alakulására az elmúlt évek alatt, különös tekintettel a terápia ajánlásban szereplő antibiotikumokra, a cephalosporinokra és az azithromycinre. NG-MAST módszerrel vizsgáltuk a törzsek szekvencia típusait. Ismereteink szerint ez volt az első magyarországi felmérés, mely a szekvencia típusok és a hozzájuk tartozó rezisztencia-adatok közötti összefüggést vizsgálta, megfelelő empirikus terápia létrehozása céljából. Így következtetéseket vontunk le a 2002-es magyar módszertani levéllel és a 2012-es európai terápia ajánlással kapcsolatban.

2.1. Történelmi vonatkozások

A gonorrhoea a legrégebb óta ismert fertőző betegségek egyike. Első leírása a Bibliában, a Leviták könyvében olvasható. Elnevezése Galenustól származik, aki tévesen feltételezte, hogy a folyás spermából áll: Gonos=sperma, Rheos=folyás [8]. A 18. században John Hunter, angol sebész próbálta bizonyítani, hogy a gonorrhoea és a syphilis két külön betegség, de sajnos egy olyan koinfekcióban szenvedő beteg húgycsőváladékával fertőzte saját bőrét, akiről ekkor nem tudta, hogy syphilis fertőzése is van. Később Hunter syphilisben hunyt el. A kísérlet következményeként levont téves következtetés, miszerint a gonorrhoea és a syphilis egy betegség, s ugyanaz a kórokozó felelős a kialakulásáért, még közel egy évszázadig meghatározta a venerológusok gondolkodását. Ennek megdöntésére Philippe Ricord, francia orvos, 1831-ben számos kísérletet végzett önkénteseken, akiket gonorrhoeás váladékkal fertőzött syphilis kialakulása nélkül. Albert Neisser 1879-ben fedezte fel a gonococcusokat mikroszkópos kenetben, s így adhatta a nevét a Neisseria genusnak. A kérdés végleg 1905-ben dőlt el, amikor Schaudin és Hoffman felfedezték a *Treponema pallidumot*, a syphilis kórokozóját [9].

2.2. A fertőzés epidemiológiája

2.2.1. A fertőzés megjelenése világszerte

A WHO felmérései szerint a gonorrhoea megjelenésében nagy különbségek vannak a fejlődő és fejlett országok között. A fejlődő országokban magasabb a

gonorrhoea előfordulása, ami magyarázható az alacsonyabb társadalmi rétegek kiszélesedésével, a homoszexualitás és a prostituizmus terjedésével. Leggyakoribb a fertőzés a Nyugati Pacifikus Régióban, Délkelet-Ázsiában, Szubszaharikus Afrikában és Latin-Amerikában [2].

A fejlett országokban a gonorrhoea incidenciája hullámzó lefolyást mutatott. A második világháború után emelkedett, majd az 50-es években hanyatlás következett be, majd növekedésnek indult a 70-es évekig, amit a 60-as évek szexuális forradalma, és az 50-es évek "baby boom-ja" magyaráz. Majd ezután újabb hanyatlás következett, amit a fejlettebb diagnosztikával, az adekvátabb antibiotikum-terápiával és az AIDS-től való félelemmel magyaráznak. A csökkenés egészen a 90-es évek elejéig tartott.

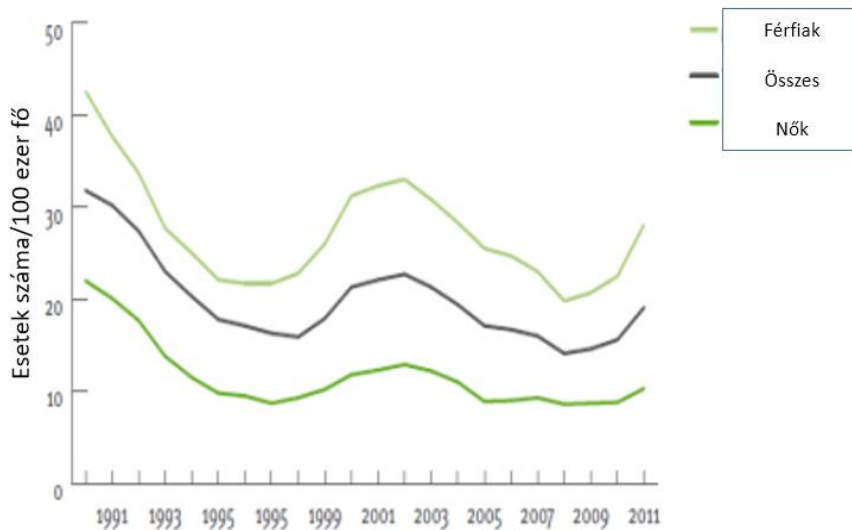
A WHO 1990-ben 25 millióra, 1995-ben 62 millióra becsülte az incidenciát a világon. Ugyanebben az évben Délkelet-Ázsiában 1%-ra, míg Észak-Amerikában 0,1%-ra tette a prevalenciát. A WHO által, 2008-ban készített felmérés szerint az évi 498,9 millió STD betegségből a gonorrhoea 106,1 milliót tett ki. Ez körülbelül egyenértékű a *Chlamydia trachomatis* okozta STD betegség 105,7 millióra becsült incidenciájával. A 2005-ös felmérésekhez képest 2008-ra 21%-ot emelkedett a gonorrhoea incidenciája. Leggyakoribbra becsülték a megjelenését a Nyugati Pacifikus Régióban (42 millió), Dél-kelet Ázsiában (25,4 millió) és Afrikában (21,1 millió) [10,11].

2012-ben a WHO újabb becsléseket végezve, az új gonorrhoeás esetek számát 78 millióra, míg az új chlamydiás esetek számát 128 millióra, míg a gyógyítható nemi betegségeket pedig összességében 357 millióra becsülte [12]. A gonorrhoeás esetek koinfekcióját *C. trachomatis*-szal 10-40% közé teszik [13,14]. Tekintettel azonban a becsléshez használt eltérő módszerekre, a 2008-as és 2012-es WHO-adatok nem hasonlíthatóak össze. Levonható, hogy az STI-k (sexual transmitted infection) incidenciája továbbra is magas értéket ér el, naponta 1 millió akvirált, gyógyítható STI-vel kell számolni. Tekintettel a növekvő antibiotikum-rezisztenciára, különösen a gonorrhoea esetében, a fertőzések incidenciájának nyomon követése továbbra is fontos [1, 12].

2.2.2. A fertőzés megjelenése Európában

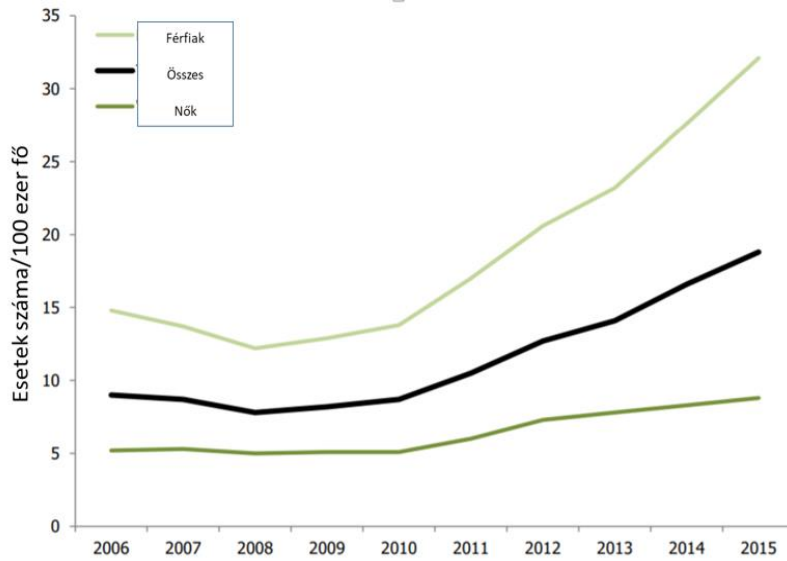
Az ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control) 1990 és 2010 között végzett felmérése, azt mutatta, hogy 15 és 30 fő között változott a 100 ezer főre

eső fertőzések incidenciája [15]. 2008-tól kezdődően pedig az incidencia emelkedést mutatott (1. ábra).



1. ábra: 100 ezer főre eső gonorrhoeás esetek száma 1990 és 2011 között Európában
 Forrás: European Centre for Disease Prevention and Control. Annual Epidemiological Report. 2013. Stockholm. ECDC; 2013.

Az ECDC újabb 20 évet felölelő vizsgálatában, 2006 és 2015 között a fertőzés további, jelentős emelkedését írta le. 2015-re a 100 ezer főre eső fertőzések száma elérte a 19 főt. 2008-as évhez képest a férfiak esetén 158%-kal, nők esetén 76%-kal nőtt a bejelentett fertőzések száma (2. ábra).



2. ábra: 100 ezer főre eső gonorrhoeás esetek száma 2006 és 2015 között Európában
 Forrás: European Centre for Disease Prevention and Control. Gonorrhoea. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2015. Stockholm. ECDC; 2017.

A fertőzés emelkedését a fertőzött férfiak növekvő számával magyarázzák, azon belül is leginkább az MSM-ek és a promiszkuitás növekedésével, az MSM-ek gyakoribb tesztelésével, főként az extragenitalis régiókban, ill. a diagnosztika fejlődésével (NAAT, nucleic acid amplification test).

Az ECDC 2015-ös évről szóló, legfrissebb adatai alapján az Európai Unió területén 70056 gonorrhoea esetet jelentettek, míg *C. trachomatis*ből 394163-at [16]. Tehát a bejelentések alapján a chlamydia fertőzés kb. 5,6-szorosan meghaladja a gonorrhoeát Európában. A legtöbb esetet Nagy-Britanniából jelentették. 2015-ben a bejelentett gonorrhoeás esetek száma 14%-kal növekedett a 2014-es évhez képest, különösen az MSM-ek körében, míg a chlamydiás esetek száma stagnált. A bejelentések alapján a gonorrhoeás fertőzöttek 11%-a volt HIV fertőzött is egyben [16].

A 2008-as WHO felmérésben megbecsülték a fertőzések előfordulását Európában is, melyet a gonorrhoea esetén 3,4 millióra, *C. trachomatis* esetén 20,6 millióra értékelték [10].

Ami a nemek szerinti megoszlást illeti, 3,6-szor gyakoribb férfiakban a fertőzés [16]. Ezt magyarázhatjuk a homoszexuális férfiak (MSM) növekvő arányával, akik 2015-ben 51 %-át adták a gonorrhoeás eseteknek, illetve azzal, hogy a férfiak fertőzése gyakrabban jár tünetekkel, mint nők esetén [15-17]. 2014-ben, az adatgyűjtés

történetében először lépte túl a fertőzött nők száma a heteroszexuális férfiakét, ami mindenképpen aggasztó a perinatalis komplikációk, ill. reprodukív szervek szövődményei miatt [18]. 35%-a a fertőzötteknek 15 és 24 év közötti, míg 36%-a 25 és 34 év közötti volt [16].

2.2.3. A fertőzés megjelenése Magyarországon

A fejlett országokban, beleértve Magyarországon, a fertőzés incidenciája a második világháborút követően jelentősen megemelkedett. Majd kisebb ingadozásokkal beállt egy egyenletes szintre. 1973-ban 13838, 1983-ban pedig 11526 fertőzést jelentettek be hazánkban. Az 1980-as évek közepétől a fertőzés előfordulása csökkenő tendenciába ment át. 1987-ben 5925 főre, 2000-ben pedig 1183 főre esett a megbetegedések száma [8]. Ehhez feltehetően, a világ más területeihez hasonlóan, az AIDS-től való félelem vezetett. A fertőzés megjelenése a 2000-es évektől növekedésnek indult. Ezt a promiszkuítással, illetve a tünetmentes fertőzések (például anorectum, pharynx és cervix) gyakori előfordulásával lehet magyarázni („néma járvány”) [19]. Az Epiinfo felmérései szerint 2010-ben 1170 gonorrhoeás fertőzést jelentettek, míg 2011-ben 1369-et, 2012-ben 1487-et és 2013-ban 1526-ot, 2014-ben 1620-at. 2015-ben azonban a gonorrhoeás fertőzések száma negyedével csökkent, 1246 esetet jelentettek. A csökkenés háttérében a bejelentések elmaradását vélik. A betegek háromnegyede férfi, egynegyede nő volt, és legmagasabb a 20-24 és a 25-29 éves korosztály átfertőzöttsége. Az OEK felmérései alapján, a bejelentések több, mint fele Budapestről érzik. Szembetűnően magas Borsod-Abaúj-Zemplén, Somogy, Heves megye érintettsége [20-33].

Mivel a kötelező bejelentés sokszor elmarad, ezért a prevalencia feltételezhetően alacsonyabb a valós értékeknél. A bejelentés elmaradásának több oka lehet. Az egyik, ha a folyásos panaszok terápiáját mikrobiológiai diagnózis nélkül, nem venerológus szakorvos végzi. Ilyenkor a kontaktuskutatás is elmarad. Előfordul, hogy a nemibeteg gondozókban sikertelen a kontaktusok felkutatása, ismeretlen kilétük miatt. Másik ok lehet, hogy az újfent gonorrhoeás beteg nem fordul orvoshoz, s öngyógyítással krónikus fertőzésre tesz szert, rezisztens törzsek szelektálódását kockáztatva [2,34]. A WHO felmérése szerint a fertőzések kevesebb, mint 5%-át jelentik be, és azt jósolják, hogy tovább fog csökkenni a bejelentések száma, így előbb-utóbb papíron nem is fog előfordulni gonorrhoeás megbetegedés [2].

2.3. Patogenezis

A *N. gonorrhoeae* baktérium egy Gram-negatív, 1 µm nagyságú, aerob diplococcus. Környezeti behatásokkal szemben érzékeny, így szervezeten kívül rövid időn belül elpusztul. A gonococcus a pharynx, rectum és az urogenitális szervek mucosáját kolonizálhatja a vagina kivételével. Pilusok biztosítják az adhéziót a hengerhámsejtekhez. Endotoxinjukkal gyulladást provokálnak, és az epithel pusztulását váltják ki. IgA proteázsal a szekretoros IgA-t bontják, ami a kolonizációt gátolná [34, 35]. A gonococcusok többségében intracaniculárisan terjednek, elvéve megfigyelhető haematogen szóródás. Terápia hiányában a macrophagok működésének eredményeként az akut, gennyes gyulladás helyébe tünetszegény, krónikus gyulladás lép [19,34].

A baktérium kontagiozitása magas. A kórokozóval való fertőződés függ a nemi váladék csíraszámától. Nőkben az egyszeri nemi érintkezésre számított fertőződés valószínűsége 80%, míg férfiakban 20%. Viszont ez a százalék az ismételt nemi érintkezések számától függően 100%-ra is emelkedhet [19]. A fertőződés genitovaginalis, oroanalis, orogenitalis és anogenitalis érintkezés útján, illetve autoinokulációval (pl.: conjunctivitis esetében) terjedhet, valamint vertikális úton a placentán át, ill. a szülőcsatornán keresztül [19,34].

2.4. Patogenitás

A gonorrhoea nagyrészt az urogenitalis traktus alsó részét fertőzi. Urethritist, cervicitist okoz. Kisebb arányban, a nemi érintkezés módja szerint, proctitis, pharyngitis is létrejöhet, illetve felszálló fertőzésként a felső urogenitalis traktust is megbetegítheti. Míg a fertőzés férfiaknál inkább akut, addig nőknél a krónikus ascendáló fertőzés a jellemzőbb [19,34]. Mivel férfi és női gonorrhoea eltér mind tünetek, mind szövődmények szempontjából, ezért érdemes a kettő leírását különválasztani.

2.4.1. Klinikai kép férfiak esetén

Férfiaknál az infekció legjellemzőbb megjelenése az akut anterior urethritis, ami 2-8 nap inkubációs idő után, dysuriás panaszokkal, nyákos, majd gennyes húgycsőfolyással, vizeléskor metsző fájdalommal jár. Ritkán a fertőzés járhat

balanitisszel is, ilyenkor a meatus urethrae erythemás. Tünetmentes fertőzés az esetek kevesebb, mint 10%-át teszi ki. Antibiotikus kezelés nélkül, 10-14. napra a fertőzés felszállva acut posterior urethritist okoz, ami már gyakori vizelési ingerrel és akár lázzal is járhat [19, 36].

A fertőzés komplikációja lehet a prostatitis, ami lázzal, vizelési és székelési fájdalommal jár, ritkán tályogképződéssel és akár sipolyképződéssel kísérve. Ilyenkor perianalisan és suprapubicusan is fájdalmat érez a beteg. Rectalis vizsgálattal a prostata egyik oldalon kemény, indurált és fájdalmas. Másik gyakori komplikáció az epididymitis, ami gyakran hirtelen, villámcsapásszerűen kezdődik, és szintén lázzal kísért ($> 40^{\circ}\text{C}$), scrotumba és combokba sugárzó fájdalommal. Kétoldali epididymitis esetén akár sterilitás is kialakulhat, mivel a folyamat fibroticus hegesedéssel gyógyul. Ezenkívül a *N. gonorrhoeae* fertőzés okozhat balanoposthitis, ami gyakran phimosishoz társul. Ilyenkor a glans erodált, erythemás. A leggyakoribb komplikáció a periurethritis, ami érinti a Littre-mirigyeket, és a perzisztáló infekció egyik forrása lehet. Ha a Littre-mirigyek beolvadnak periurethralis tályog alakul ki, ami fájdalmas erekciót eredményez. Emellett a genny betörhet az urethrába, s ennek következményeként multiplex fistulák képződhetnek a glanson. Ilyenkor vizeléskor több nyíláson is ürül a vizelet („locsolókanna” penis). Önmagában a littritis a mirigy elzáródásával jár, így az urethra mellett tömött csomókat lehet tapintani. Paraurethritis esetén fájdalmas a fossa navicularis, nyomásra genny préselhető. Tysonitis a frenulum két oldalán látható gyulladás. Kialakulhat cavernitis is. Súlyosbíthatja a folyamatot spermocystitis, a vesicula seminalis gyulladása. Ez utóbbi egy ritka szövődmény, ami prostatitishez társul, és keresztcsont irányába sugárzó fájdalom jellemzi. Egyéb szövődménye a fertőzésnek a cowperitis, a hasonló mirigy abscedáló gyulladása, ami szaggató perineális fájdalommal jár, fájdalmas a vizelés és a székelés is. A beteg lázas, gyakran visszatartja a vizeletét a fájdalom miatt [19, 34].

Kezelés nélkül a tünetek mérséklődnek és krónikussá válnak 4-6 hét leforgása alatt. A váladék mennyisége egyre kevesebb lesz, majd csaknem teljesen elmarad, és végül reggelente ún. „bonjour cseppek” formájában jelentkezik. A krónikus urethritis néha felerősödik, pl. nemi érintkezés után, felfázáskor. Az idült fertőzés szövődményei lehetnek az urethra körül tapintható csomók littritis következtében, az urethraszűkület a

bulbus urathrae területén, ill. a krónikus prostatitis, ami dysuriával, végbél viszkető, égő érzésével, gáti teltségérzéssel, ejaculatio praecox-szal jár [19,34].

2.4.2. Klinikai kép nők esetén

A **nők** felében az infekció tünetszegényen zajlik, a nők közel negyede pedig teljesen panaszmentes. Az urethritis és a cervicitis sokszor együtt jár, és néha proctitis is színezi a klinikai képet. Vaginitis gonorrhoeában nem alakul ki. Urethritisben dysuria és pollakisuria jellemző, amiket sokszor "felfázás" tüneteinek tulajdonítanak. Komplikációja lehet a cystitis, hasonló panaszokkal. A cervicitis az esetek több mint 50%-ában nem jár panasszal, esetleg keresztcsonti vagy alhasi fájdalom kíséri, de feltárási vizsgálattal látható a méhszáj gyulladt, gennyes nyálkahártyája. [19,34,36,37]. Antibiotikum-terápia hiányában tünetmentes, krónikus, felszálló fertőzés alakul ki.

A felszálló fertőzések az endometrium, a salpinx és az ovárium fertőzését okozhatják, melyek a szomszédos szövetek gyulladásával együtt a kismedence gyulladással megbetegedéseként (PID= pelvic inflammatory disease) foglalhatóak össze. Ez a fertőzések tizedében alakul ki. Az akut kezdet görcsös, egyoldali, és menstruáció után jelentkezik magas lázzal, leukocytosissal. Járhat alhasi fájdalommal, dyspareuniával, közti vérzésekkel és akár extrauterin graviditással, sterilitással és korai vetéléssel is, de lehet hosszabb ideig tünetmentes is. A reinfekciók számával a szövődmények kockázata nő. A PID komplikálódhat tuboovarialis tályoggal, pelveoperitonitissal. Az endometritis átmeneti kórkép, mivel menstruáció alatt a megtapadt baktériumok a méhnyálkahártyával együtt lelepködnek. Salpingitis szövődhet tályoggal, annak rupturájával, és heges összenövésekkel. Az oophoritis a peritoneumot is érinti. Lázat, hányást, alhasi fájdalmat okozhat. Krónikus szakaszban pedig már csak az adnexumtumor tapintható. Bartholinitis többnyire egyoldali folyamat, mely során a mirigy kivezető járata elzáródik, és a mirigy megduzzad, fájdalmas, erythemás. A cervix, az endometrium és a petevezeték krónikus gyulladása esetén a nők a menstruáció után fertőzőek, s a cervixkenet vizsgálata, illetve a tenyésztés egyéb időszakban gyakran negatív, annak ellenére, hogy a beteg fertőzőképes. Vulvovaginitis kialakulása gyermekkorban lehetséges, mivel a vagina átmeneti hámja érzékeny a kórokozóval szemben, így abúzus, közös törölközőhasználat során fertőződhet a gyermek [19,34].

2.4.3. Extragenitális fertőzések klinikai képe

Extragenitálisan megjelenő gyulladás orogenitális és anogenitális érintkezés után alakulhat ki. A gonorrhoea transzmissziójában jelentős szerepük van, mivel többségében panaszmentesen zajlik a fertőzés. Az **rectum** fertőzését homoszexuális férfiakban találjuk nagyobb számban, de nők esetén is kialakulhat, főként a hüvelyből kifolyó váladék okozza. Körülbelül 90%-ban tünetmentes. Kevesebb, mint 10%-ban pruritus, tenesmus kíséri, véres-nyákos székletürítés mellett. A tünetek hiánya nemcsak a rectum, de **pharynx** fertőzésére is igaz, hasonló százalékban. A **blepharoconjunctivitis** fénykerüléssel, gennyes váladékozással jár, miután a fertőzött váladék a szemhez kenődik. Újszülötteknél a szülőcsatornában való áthaladáskor történik meg a fertőződés, majd 1-3 nap után jelentkeznek a tünetek. Kezelés nélkül vaksághoz vezethet.

A *N. gonorrhoeae* fertőzés egyik **disszeminált** formája az arthritis, ami gyakran monarthritis, és jellemzően a térdet, ugróízületet érinti, ritkábban a kezet, könyököt, és elsősorban a nők betegsége. Előfordulhat polyarthritis formájában, ami nem migráló ízületi gyulladás. Fiatal, panaszmentes nők hirtelen kialakuló monarthritise esetén mindenképpen gondolni kell gonorrhoeára. Kialakulhat tendovaginitis, mely ugyancsak egyoldali; pericarditis, mely halálos kimenetellel is járhat, és perihepatitis acuta is. Ez utóbbi kórkép másik elnevezése a Fitz-Hugh-Curtis-szindróma, ami fiatal nők ritka megbetegedése, és különböző tünetekkel járhat, így:

- jobb bordaív alatti fájdalom, mely belégzésre és a törzs mozgására fokozódik,
- a máj nyomásérzékenysége,
- hőemelkedés,
- jobb váll fájdalma, amit a nervus phrenicus irritációja okoz,
- hányinger, hányás, fejfájás,
- gyorsult süllyedés, emelkedett fehérvérsejtszám, kóros májenzimek,
- laparoszkópiával a májtok és peritoneum között hegedűhúrszerű összenövéseket lehet megfigyelni,
- méhszájából végzett tenyésztés gonorrhoea-pozitív eredményt ad, láz esetén hemokultúra készítése kötelező [19,34].

Általában azoknál a nőknél jelentkezik, akikben a petevezeték és a petefészek is érintett. **Gonococcus bacteraemia** nagyon ritka komplikáció. 60-97%-ban nőkben

alakul ki, és gyakran kezdődik menstruáció, szülés vagy nőgyógyászati műtét után, hirtelen tünetekkel. Jellemző rá:

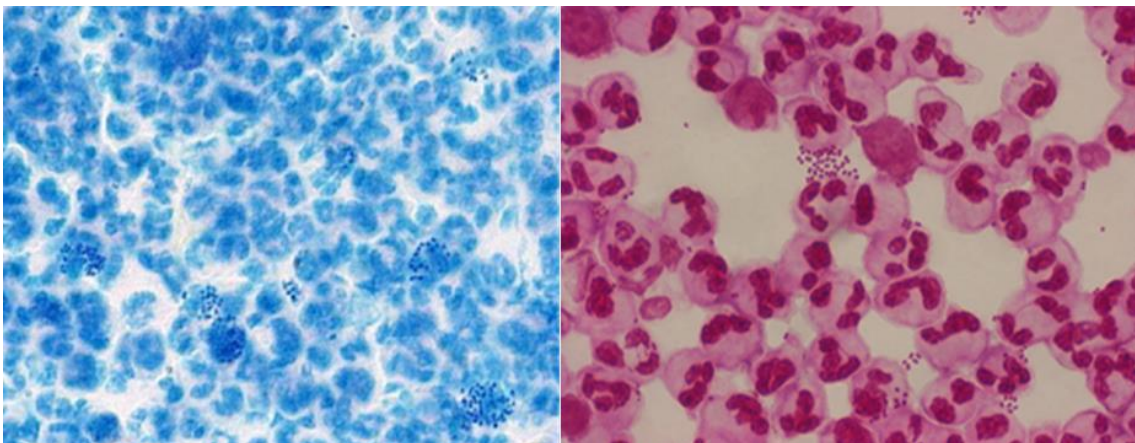
- a periodikus lázmenet (38-39 °C-os) hidegrázással, jó általános állapot mellett,
- ízületi gyulladás, tendosynovitis,
- acrális papulopustulák, haemorrhagiás vesiculák, bevérzett seropapulák az ízület körül,
- magas CRP és fehérvérsejtszám, gyorsult süllyedés [19,34].

2.5. Diagnosztika

A diagnosztikában háromféle módszer áll rendelkezésünkre. Ezek a következők: mikroszkópos kenet értékelése, tenyésztés táptalajon és molekuláris biológiai eljárások.

2.5.1. Mikroszkópos vizsgálat (1000x nagyítással, immerzióval)

Urethritis esetén a húgycsőváladék vizsgálatához 2-3 órán keresztül szükséges a vizeletet visszatartani. Cervicitis gyanúja esetén előbb steril vattapálcával letöröljük a gennyet a cervixről, és utána következhet csak a mintavétel. Diagnosztikus értékű a festett kenet, ha nagyszámú polymorphonukleáris granulocytá figyelhető meg, intracellulárisan elhelyezkedő diplococcusokkal együtt. A festés történhet metilénkéssel és Gram-festéssel is (3. , 4. ábra). Előbbi értékelése nehezebb, mivel egyéb baktériumok, pl. *Streptococcusok* jelenléte könnyen megtéveszti a vizsgálót. Gram-festéssel nagyobb eséllyel lehet a diagnózist felállítani.



3. és 4. ábra: Metilénkéssel festett kenet (forrás: <http://www.uni-giessen.de>) és Gram-festett kenet

Gram-festett kenetben a Gram-negatív gonococcusok piros színűre, Gram-pozitív baktériumok kék színűre festődnek. Az apatogén *Neisseriák* intracellulárisan nem jelennek meg. Ha tehát csak extracellulárisan vannak diplococcusok a kenetben, akkor az elkülönítésükre mindenképpen szükség van további vizsgálatokra.

A kenet készítésének leginkább férfiak szimptomás, akut urethritise esetén van diagnosztikus értéke, ilyenkor a vizsgálat szenzitivitása 95%. Hasonlóan magas a szenzitivitás nők tünetes urethritise esetén is. Azonban tünetmentes férfiak urethritise esetén a szenzitivitás csak 50-70%, rectum esetén szintén csak 40% [1,38], így ezekben az esetekben nem javasolható, ahogy cervicitis, proctitis és pharyngitis esetén sem [19,34,36-39]. Tehát fontos kiemelni, hogy a negatív vizsgálat nem zárja ki a fertőzést, és a kenet eredménye függ a vizsgáló tapasztaltságától.

2.5.2. Tenyésztés

Az egyik legmegbízhatóbb diagnosztikus eljárás, ami azonban sajnos sok rendelőintézetben nem elérhető. A gonococcusok specifikus körülményeket igényelnek: ún. Thayer-Martin-féle csokoládé agaron nőnek, ami tartalmazza azokat a faktorokat, a hemet és a nikotinamid-adenin-dinukleotidot (NAD-ot), ami nélkülözhetetlen a gonococcus számára, illetve vancomycin, colistin, trimethoprim antibiotikumokat és amphotericin B antimikotikumot, melyek akadályozzák a normál flóra párhuzamos növekedését. Annak érdekében, hogy ne veszítsük el a vancomycin-érzékeny törzseket, nem-szelektív táptalajon is elvégezzük a tenyésztést. Ahogy fentebb említésre került, a baktérium igényessége miatt a leoltást a mintavétel után azonnal el kell végezni, 35°C-on, 5-10%-os szén-dioxid atmoszférán kell elhelyezni a táptalajokat. Pozitív esetben színtelen, fényes telepek jelennek meg, melyek oxidáz-positívak, és a szénhidrátok közül csak a dextrózt bontják. Negatív eredményt csak 72 óra elteltével lehet kiadni.

A tenyésztés specifikus, olcsó, 85-95%-os szenzitivitással bír, de relatíve lassú, és fontos biztosítani a megfelelő körülményeket [1]. A mintavétel történhet cervixből, urethrából, pharynxből, rectumból, conjunctiváról, ill. ízületi punctatumból is. Amennyiben a megjelenő baktériumtelepek alapján szükséges további identifikáló eljárás, pl. a torokban apatogén *Neisseriák* miatt, MALDI TOF tömegspektrométer (Matrix-assisted laser desorption/ionization, Time-of-flight mass spectrometer)

vizsgálatra kerül sor, mely a baktérium riboszómális összetételét vizsgálja. A MALDI egy fotoionizációs ionforrásra, míg a TOF egy repülési idő tömeganalizátorra utal.

A tenyésztés legnagyobb előnye, hogy utána antibiotikum-érzékenység vizsgálat készíthető. Ez történhet korong-diffúziós, ill. epsilometer-teszttel. Korong-diffúziós módszer esetén a gyűrű alakú gátlási zóna méretéből következtethetünk indirekt módon az érzékenységre [35]. A módszer alkalmazását az USA-ban a NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) engedélyezi, azonban az EUCAST Európában (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) nem javasolja. Az epsilometer-teszt esetében a pontos minimális inhibitor koncentráció (MIC) kerül mérésre, ami az antibiotikum azon legkisebb koncentrációja (mg/l), mely megakadályozza az adott baktérium szaporodását. Ennek a határértékeit az EUCAST ajánlás határozza meg, mely összehasonlíthatóvá teszi a nemzetközi kutatásokban a rezisztencia-értékeket. Az antibiogram készítésnek mindenképpen fontos szerepe van a gonorrhoea diagnosztikájában, mivel csak ennek ismeretében adható hatékony kezelés, ill. így követhető nyomon a rezisztencia-viszonyok alakulása. Ezzel ellentétben mégis számtalan esetben tenyésztés és rezisztencia-vizsgálat nélkül kezelik az infekciót. Ez csak akkor elfogadható, ha ismert az adott régióban elterjedt gonococcusok szokásos rezisztenciája [19,34,36-40].

2.5.3. Molekuláris eljárások

A molekuláris eljárások használhatók a kórokozó azonosítására, illetve az antibiotikum-rezisztencia megítélésére. A DNS-amplifikációs, nukleinsav-hibridizációs módszerek tartoznak ide. Előnyük, hogy nem szükséges élő kórokozó a vizsgálathoz, nem igényel tenyésztőlaboratóriumot, és gyors vizsgálat. Érzékenyebb a tenyésztésnél, és nagy specificitású. Több mint 96%-os a szenzitivitása tünetes és tünetmentes betegek esetében is, így tünetmentes hordozóknál elsősorban ez javasolható. Férfiak esetén egyforma szenzitivitású húgycsőfolyásból és vizeletből. Nők esetében azonban vizeletből nem javasolt a teszt elvégzése. Hátránya, hogy a pontos antibiotikum-érzékenység nem ítéhető meg. Pharynx és rectum esetén a korlátolt értékelhetőség, alacsony pozitív prediktív érték miatt NAAT nem ajánlható. Ezekben az esetekben a rectumban, pharynxban, de ritkán még az urogenitális traktusban is jelen lévő kommenzális *Neisseria* speciesek is kimutatásra kerülnek, ha nem elég specifikus a teszt, és kiegészítő, verifikációs NAAT vizsgálatra van szükség [38, 41]. Előnye, hogy

a mintát akár 7 napig is lehet tárolni megfelelő körülmények között (2-25°C-on). Alkalmask egy vizsgálati mintából, egyszerre több kórokozó azonosítására, koinfekciók kimutatására. Ilyen például a multiplex PCR-vizsgálat (polimeráz láncreakció), ami a *N. gonorrhoeae* mellett a *C. trachomatis*, a *Mycoplasma hominis* és *genitalium*ot, az *Ureaplasma ureolyticum*ot és *parvum*ot, valamint a *Trichomonas vaginalis* tudja egyszerre azonosítani. [19, 34, 36].

A molekuláris eljárásokat (PCR, gén-, ill. genom-szekvenálás) alkalmazhatjuk az antibiotikum-rezisztencia, ill. MIC érték megítélésére is, főként surveillance programok keretében, ha a tenyésztés nem elérhető. Azonban a fenotípusos antibiotikum-rezisztencia mérést nem helyettesíthetik, mivel az ismeretlen, újabb rezisztencia-determinánsok nem detektálhatóak a módszerrel [42-44].

2.6. Terápiás ajánlások

2.6.1. Magyar terápiás ajánlások

A Bőr, -és Nemibetegségek Szakmai Kollégiuma által 2002-ben kiadott módszertani levél elsőként választandó antibiotikumok között a következőket ajánlja monoterápiában, nem komplikált urogenitalis gonorrhoea esetén:

- 1x250 mg ceftriaxon im. vagy,
- 400 mg ofloxacin p.os vagy,
- 400 mg cefixim p.os vagy,
- 500 mg ciprofloxacin p.os.

Alternatívaként ajánl 2g spectinomycint im. vagy 1g azithromycint per os. Penicillinallergia esetén 2 g erythromycin p.os adását javasolja 5-7 napig [37]. Amennyiben a gonorrhoea *C. trachomatis* koinfekcióval jár 1 g azithromycin a választandó kezelés az ajánlás szerint. Tekintettel a növekvő penicillin, tetracyclin, fluorokinolon, azithromycin, ill. cephalosporin rezisztenciára, az ajánlás elavultnak tekinthető.

A 2011-ben kiadott Bőrgyógyászati útmutató elsőként választandó terápiának ajánlja cervix, urethra és rectum gonorrhoea fertőzése esetén a következőket:

- 250 mg ceftiaxon im. vagy,
- 400 mg cefixim p. os vagy,

- 2 g spectinomycint im. vagy,
- kinolonokat, de csak rezisztencia-meghatározás után.

Míg pharynx fertőzése esetén ceftriaxon az elsőként választandó. Rezisztencia meghatározás után azithromycin vagy ciprofloxacin adása is szóba jöhet [36].

2.6.2. Európai ajánlás

A legfrissebb, IUSTI által kiadott 2012-es európai ajánlásban elsőként választandó terápiának kombinációs kezelést javasolnak: **1x500 mg ceftriaxon im. 1x2 g per os azithromycinnel**. Ha ceftriaxon nem elérhető, vagy nem biztosítható parenterális gyógyszeradás, vagy esetleg a beteg nem járul hozzá parenterális kezeléshez, akkor 1x400 mg per os cefiximet 2 g per os azithromycinnel javasolnak. Ha pedig az azithromycin nem áll rendelkezésre, akkor 1x500 mg ceftriaxon adható. Penicillin-vagy cephalosporin-allergia, vagy rezisztencia esetén 1x2 g spectinomycint 2 g per os azithromycinnel javasolnak. Az antibiotikumok kombinációjával és a dózisok növelésével ceftriaxon és azithromycin MIC értékek növekedését igyekeznek megakadályozni. A kombináció előnye, hogy széles spektrumú cephalosporinok és az azithromycin között egyes vizsgálatok szerint szinergizmus áll fenn, illetve az esetleges *C. trachomatis* koinfekció gyógyulásával is jár [38, 45-49]. Az európai ajánlás szerint *C. trachomatis* és a *N. gonorrhoeae* együttes előfordulása 30 éves kor alatt olyan gyakori, hogy a kezelést mindenképpen ki kell egészíteni 1 g azithromycinnel vagy 7 napig tartó 2x100 mg doxycyclin terápiával. Itt hivatkoznak az Egyesült Királyságban 2008-ban végzett felmérésre, miszerint a gonorrhoeás nők esetén 41%, míg heteroszexuális férfiak esetén 35%-os volt a koinfekció gyakorisága [50]. Monoterápiát az ajánlás szerint csak akkor alkalmazhatunk, ha nukleinsav-amplifikációs teszttel kizártuk a chlamydia-fertőzést.

Igazolt kinolon-érzékenység esetén 400 mg ofloxacin p.os vagy 500 mg ciprofloxacin p.os akkor használható, amennyiben a ceftriaxon nem alkalmazható. Azithromycin monoterápiában az európai ajánlásban nem szerepel. Ennek oka, hogy növekszik az emelkedett azithromycin MIC értékű törzsek száma, gyakoriak a gastrointestinális mellékhatások, másrészt in vitro igazolt érzékenység esetén is előfordulhat terápiás kudarc [51,52]. Mivel a harmadik generációs cephalosporinok esetén is egyre többször mérnek emelkedett MIC értéket, az európai ajánlás erre az

esetre is tesz javaslatot. Ilyen esetben 1x1 g ceftriaxont 2 g azithromycinnel, vagy 240 mg gentamycinnel kombinálnak. Tekintettel az eltérő helyi rezisztencia-viszonyokra, elfogadhatónak tartják helyi alternatív kezelések adását is. A terápiához nem utolsó sorban a partnerek kezelése is hozzátartozik [38].

2.6.3. Terápiás irányelvek a világ többi részén

A WHO 2016-ban kiadott ajánlásában hangsúlyozzák a regionális rezisztencia-viszonyok alapján felállított kezeléseket. Amennyiben ez nem ismert, akkor a kombinációs kezelést javasolják a monoterápiával szemben. Ha ismertek a helyi antibiotikum rezisztencia-viszonyok, monoterápia is alkalmazható [1]. A WHO alapján elsőként választandó kezelések:

- kombinációs kezelés:
 - 250mg ceftriaxon im. egyszeri dózisban, 1g per os azithromycinnel,
 - 400mg per os cefixim per os, 1g per os azithromycinnel.
- monoterápia (Helyi rezisztencia-adatok alapján!):
 - ceftriaxon 250mg im.,
 - cefixim 400mg per os,
 - spectinomycin 2g im.

Alternatív terápiaként gentamicint, kanamycint egyelőre nem javasolják, tekintettel a rezisztencia-adatok hiányára. Oropharyngeális gonorrhoeában kombinációs kezelést javasolnak, figyelembe véve a közölt terápiás kudarcokat. Amennyiben terápiás kudarc lép fel a javasolt monoterápiákkal szemben, a kombinációs kezelés alkalmazandó másodszorra. Ha a terápiás kudarc a javasolt kombinációs kezelés után lép fel, akkor a dózisok megduplázását javasolják vagy gentamicin/ spectinomycin kombinációját azithromycinnel. A WHO guideline szerzői emellett megjegyezték, hogy kevés adat van a kombinációs kezelés és az emelt dózisú monoterápia összehasonlításával kapcsolatban. Több országban sokkal nagyobb standard dózisokkal kezelnek, s inkább javasolt lenne minimum standard dózisokat adni, és bizonyos esetekre korlátozni a magasabb dózisok használatát [1].

Az USA-ban a 2015-ös irányelvek szerint az elsővonalbeli kezelés nem komplikált urethritis, cervicitis és proctitis esetén szintén kombinációs kezelés: 1x250 mg ceftriaxon im. 1g per os azithromycinnel. A kombinációs kezelés teoretikusan

javítja a kezelés hatékonyságát, potenciálisan lassítja a cephalosporin-rezisztencia kialakulását. 250mg ceftriaxon hosszantartó, baktericid koncentrációt ér el a vérben. 99,2%-át gyógyítja az urogenitalis, anorectalis fertőzéseknek, és 98,9%-át a pharynx fertőzéseknek. Alternatív terápiaként javasolnak 400mg per os cefiximet 1g azithromycinnel, de a cefixim koncentrációja nem éri el a ceftriaxonnak megfelelő baktericid koncentrációt, és nem is olyan hosszantartó, pharynx fertőzésben pedig csak 92%-ban hatékony. Ugyanakkor félő, hogy a cefixim MIC emelkedésével és további használatával meggyorsítjuk a ceftriaxon rezisztencia kialakulását. Más per os cephalosporin nem ajánlható. Penicillin-allergia esetén 320mg gemifloxacint javasolnak per os vagy 240mg im. gentamicint, 2 g per os azithromycinnel kombinálva. Gemifloxacin esetében 99,5%-ban, gentamicin esetében 100%-ban járt gyógyulással az infekció [53]. Penicillinallergia esetén keresztreakció az első generációs cephalosporinokkal kevesebb, mint 2,5%-ban léphet fel, harmadik generációs cephalosporinokkal pedig elenyésző. A cephalosporinok használata természetesen kontraindikált, ha a penicillinekre adott IgE mediált reakciók, anaphylaxia, Stevens-Johnson szindróma, toxikus epidermalis necrolysis szerepel az anamnézisben [54-56].

2015-ben **Ausztráliában** 500mg im. ceftriaxon és per os 1g azithromycint kombinációban javasolnak elsővonalbeli terápiának [57]. Észak-és Nyugat Ausztráliában, ahol az őslakosok fertőzöttsége gyakori és az antibiotikum-rezisztencia alacsony, 3 g p.os amoxicillin, 1g probenicid és 1 g azithromycin adása javasolt [43]. A 2013-as **kanadai** ajánlásban szintén kombinációs kezelést javasolnak: 250mg ceftriaxont 1g azithromycinnel [58]. Míg **Japánban** 1g iv. ceftriaxont javasolnak monoterápiában 2011 óta. Alternatív terápiaként pedig 1g iv. cefodizimet, vagy 2 g im. spectinomycint írnak elő [59]. **Hollandiában** szintén nem javasolják a kombinációs kezelést, helyette 500mg im. ceftriaxont adnak, s azithromycinnel csak igazolt *C. trachomatis* fertőzés esetében egészítik ki a kezelést [60].

A terápiás ajánlásokról

A 2002-es magyar módszertani levél korszerűtlennek tekinthető a többi ajánláshoz viszonyítva, főként mivel még kinolonokat is ajánl. A kinolonokat a CDC már 2007-ben kivette az irányelvekből, míg a cefiximet pedig 2012-től nem javasolja [61]. Hasonlóképpen az ECDC sem ajánlja ezeket az antibiotikumokat első vonalban.

Továbbra is hangsúlyozandó, hogy az adekvát terápia nélkülözhetetlen a gonorrhoea gyógyításában, tekintettel arra, hogy a krónikussá váló fertőzés kismedence gyulladáshoz vezet (PID, pelvic inflammatory disease), meddőséggel, spontán abortusszal, méhen kívüli terhességgel, az újszülött megvakulásával járhat, illetve ötszörösére emeli a HIV-fertőzés kockázatát [5, 62, 63].

A megfelelő, naprakész terápiás ajánlások létrehozásához szükséges a rezisztencia-adatok gyűjtése, elemzése. E célból indították az USA-ban a GISP programot (Gonococcal Isolate Surveillance Project) 1986-ban, a WHO GASP (Gonococcal Antimicrobial Surveillance Programme) programot 1992-ben, az Egyesült Királyságban a GRASP programot (Gonococcal resistance to antimicrobials surveillance programme) 2000-ben, a Euro-GASP programot (European Gonococcal Antimicrobial Surveillance Programme) 2009-ben, valamint 2015-ben a WHO és CDC által alapított EGASP programot (Enhanced GASP) [64].

2.7. Terápiáról a múltban

Az antibiotikum éra előtt a gonorrhoea terápiája nem volt megoldott. A terápia csupán az ágynyugalmat, alkoholtól és nemi élettől való tartózkodást jelentette. Később alkalmazták az urethra kálium-permanganátos irrigációját, ill. higany összetételű készítményeket (mercurochrom), hypertermiás eljárásokat [41, 65].

Miután az antibiotikumok bevezetésre kerültek az 1930-as évektől kezdődően, a terápia megoldódni látszott. Azonban a *N. gonorrhoeae* törzsek újabb és újabb rezisztencia-mechanizmusokat fejlesztettek ki a különböző antibiotikum-csoportok ellen [65]. Az elmúlt 70 év alapján a gonococcust az evolúció adaptációs mestereként ismerhettük meg. 2012-ben a CDC „szuperbaktériumként” sorolta be, felhívva a figyelmet a jövőben várható terápiás kudarcokra [1].

A baktérium az összes ismert rezisztencia-mechanizmussal rendelkezik: ilyenek az antibiotikum inaktiváló enzimtermelés, támadáspont szerkezetének megváltoztatása, megnövekedett efflux, permeabilitás csökkenése [35]. Ezek a mechanizmusok plasmidokon lévő rezisztenciagének konjugációjával, kromoszómális mutációkkal, és külső gén transzferekkel valósulnak meg. Ez utóbbi azt jelenti, hogy a baktérium képes egész életciklusa alatt gének „bekebelezésére”, majd azok rekombinációjára a

genomba. A *N. gonorrhoeae* esetén a géntranszfer gyorsabb és elterjedtebb, mint a plazmid-mediált rezisztencia.

Az évtizedek alatt alkalmazott valamennyi szer hatékonyságát veszítette. Az egyes antibiotikumok bevezetésével a rezisztencia rendszerint 1-2 évtized alatt kifejlődött és elterjedt [66,67]. A rezisztens törzsek többsége a Nyugati Pacifikus Régióban jelent meg először, például penicillin, spectinomycin, kinolonok esetén. Valószínűleg a túlzott és nem megfelelő antibiotikum-használat következményeként [66].

Kezdetben a szulfonamidokat penicillinre váltották. Penicillin-érzékenység esetén tetracyclint alkalmaztak. Majd a penicillináz-termelő törzsek terjedésével rövid ideig spectinomycinnel kezeltek. Mindeközben elterjedt a plazmid-mediált tetracyclin-rezisztencia is. Ezután a fluorokinolonok kerültek bevezetésre, de a kromoszóma-mediált rezisztencia 10 év leforgása alatt megjelent. S mára már a cephalosporin-és azithromycin-rezisztencia terjedése jelenti a problémát. Megjelentek a multirezisztens törzsek (MDR, multidrug-resistant), amelyek definíció szerint rezisztensek egy, az ajánlásban szereplő antibiotikumra (cephalosporin, spectinomycin, azithromycin) és ≥ 2 , korábban javasolt antibiotikumra (penicillin, fluorokinolon, tetracyclin). Míg a kiterjedt rezisztenciával bíró (XDR, extensively drug-resistant) törzsek ≥ 2 ajánlott antibiotikumra, s ≥ 3 korábban javasolt antibiotikumra rezisztensek [68]. Meglepő módon a kialakult rezisztencia-mechanizmusok állandóak, évtizedek alatt sem eliminálódtak, annak ellenére, hogy nem alkalmazzák az adott antibiotikumot a gonorrhoea terápiájában. Feltételezhetően ez azzal magyarázható, hogy a rezisztencia-mechanizmusok fokozzák a baktérium életképességét [69,70]. Így napjainkban szulfonamidok, penicillinek, tetracyclin, fluorokinolonok, szűk spektrumú cephalosporinok nem adhatóak empirikus terápiában. Az orális terápia korlátozott, jelenleg a parenterális gyógyszerek, a ceftriaxon, a spectinomycin a legmegbízhatóbbak [65].

Az első antibiotikum a gonorrhoea kezelésében a **szulfonamid** volt. 1935-ös felfedezése, ami Domagk nevéhez fűződik, jelentette az áttörést a fertőzés kezelésében, ami akkor a betegség 80-90%-át meggyógyította. A szulfonamidok a baktérium dihidropteroát-szintetáz enzimén keresztül gátolják a folsav szintézist. Az 1940-es évek végére azonban a törzsek 90%-a rezisztens lett [41]. Az 1970-es években vezették be a

trimethoprim és szulfometoxazol kombinációját. Ez azonban a közös rezisztencia-mechanizmusok miatt kevés előnnyel bírt a szulfonamiddal szemben. A rezisztencia a paraaminobenzoésav túlzott szintéziséből következik, amely felhígítja az antibiotikumot, vagy pedig a dihidropteroát-szintetáz génjének (*folP*) a mutációjából, ami egy olyan enzimet kódol, melynek csökkent az affinitása a szulfonamidhoz [71,72].

Miután 1929-ben Fleming felfedezte a **penicillint**, 1943-ban kezdték először alkalmazni a gonorrhoeás urethritis gyógyítására szulfonamid-rezisztens esetekben. A penicillin a béta-laktám antibiotikum-csoport részeként a peptidoglikán-keresztkötések kialakulásának gátlásával másodlagos baktericid hatást fejt ki. Ez a hatásmechanizmus mintegy 40 évig eredményes kezelést biztosított. Jóllehet ehhez a dózis folyamatos növelése kellett: 1945-ben 50000 egység procaine penicillin elégséges volt, míg 1970-es években 4,8 millió egységre volt szükség. 1989-re pedig már nem volt hatékony a kezelésben [73]. A *N. gonorrhoeae* kromoszómális és plasmidos rezisztenciával is bír a penicillinnel szemben. Kromoszómálisan a *penA* és a *ponA* lokusz mutációja eredményezi a PBP-1,-2 (penicillin binding protein) alacsony affinitását a β -laktámokhoz. A *penB* lokusz változásával mérséklődik a sejt permeabilitása. A negyedik gén, ami rezisztenciát eredményez, az *mtr* gén, mely aktív effluxot okoz, és más antibiotikum ellen is hatékony, például tetracyclin, azithromycin, cephalosporin ellen. A *penA*, *penB* és az *mtr* gének együttes mutációja akár 120-szorosára emelheti a penicillin-MIC értéket. A plasmidon kódolt β -laktamáz enzimet 1976-ban írták le az USA-ban és Angliában, egymással párhuzamosan. Az enzim bontja a laktámok gyűrűjét [74,75]. Ez utóbbi törzseket PPNG (penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae*) néven említi a szakirodalom. Szerencsére eddig széles-spektrumú béta-laktamáz termelő (ESBL, Extended-spectrum beta-lactamases) gonococcus nem írtak le [41].

A penicillin-rezisztencia geográfiai megjelenése variábilis: a WHO statisztikái szerint 1998-ban a Koreai Köztársaságban a törzsek 90%-a, míg Franciaországban csak 30%-a volt rezisztens [1]. Az Euro-GASP (European Gonococcal Antimicrobial Surveillance Programme) felmérései szerint a magasfokú, plazmid-mediált penicillin-rezisztencia viszonylag változatlan értékek között ingadozik Európában (8,6-14,8%) az utóbbi időszakban. A plazmid-mediált penicillin-rezisztencia (PPNG) a 2009-es évhez képest (12,6%) szignifikánsan csökkent 2010-re, amikor is 8,6%-ot ért csak el. Míg a

2012-es Euro-GASP már 13%-ot mért, a 2014-es 14,1%-ot, a legfrissebb 2015-ös felmérés pedig 14,8%-ot mutat [76-83]. Ezzel párhuzamosan az USA-ban, a GISP program alapján a kromoszómális és plazmid-mediált penicillin-rezisztencia 10 év alatt megduplázódott, és 2014-re 16,2%-ot ért el, melynek 42%-a volt PPNG [84, 85].

Ami a **spectinomycint** illeti, az 1960-as években, kifejezetten a gonorrhoea kezelésére hozták forgalomba [41]. 30S riboszómához kapcsolódva gátolja a fehérje szintézist, bakteriosztatikus hatású. Sikeresen alkalmazták a PPNG kezelésében, bár pharyngitis esetén nem elég hatékony (75%; 49% és 100% között) [1]. Hátránya továbbá, hogy nem is szerezhető be minden országban. Elterjedt használata a rezisztencia gyors kialakulását okozhatja egy egy lépéses kromoszómális mutációval. Ez a 16S rRNS génjén jelentkező, egyetlen nukleotidot érintő polimorfizmus (SNP) [2,65]. Emellett *rpsE* gén mutációja is rezisztenciát okoz, mely a 30S riboszómális, S5 proteint kódolja [41]. 1967-ben írták le az első rezisztens baktériumot Hollandiában. 1981-ben Dél-Koreában elsővonalbeli kezelésként vezették be az Egyesült Államok hadseregében, de 4 év után a terápiás kudarcok aránya elérte a 8,2%-ot. Emellett 1983-ban számos rezisztens törzset jelentettek az Egyesült Királyságban is. Következésképp a spectinomycint kivették a nemzetközi empirikus, elsővonalbeli terápiás ajánlásokból. Ettől függetlenül egy kiváló alternatív lehetőség a terápiában. Koreában az elmúlt 2 évtizedben több mint a fertőzések felére használták (2002-2006 53-58%, 2009-2012 52-73%), de rezisztens törzset 1993 óta nem észleltek [86,87]. A Euro-GASP friss adatai szerint Európában az utóbbi években sem volt rezisztens törzs [76-83].

Az aminoglikozid antibiotikumok közül, **kanamycint** Indonéziában sikeresen alkalmazzák gonorrhoea kezelésére [2]. A **gentamicint** pedig Malawiban alkalmazzák mintegy 20 éve elsővonalbeli antibiotikumként [88]. Euro-GASP felmérések szerint a MIC értékek 2013-ban és az azt megelőző években alacsonyok voltak (1-16mg/l) Európában, azonban továbbra sincsenek MIC határértékek meghatározva *N. gonorrhoeae* esetén [82].

A **tetracyclint** az 1940-es évek végén a penicillinallergiás betegekben kezdték használni [41]. A 30S riboszómához kötődve gátolják a fehérjeszintézist, bakteriosztatikus hatást fejtenek ki. Jellemző erre is a kromoszómális és a plazmidos rezisztencia. Hátránya továbbá a többnapos alkalmazás, ami a compliance-t jelentősen csökkenti. Mára a tetracyclint az irányelvek mellőzik. A kromoszómális rezisztenciáért

az *mtr* és a *penB* lokuszok változásai felelősek, valamint az *rpsJ* gén mutációja, mely az S10 riboszómális proteint kódolja. A plasmid-mediált tetracyclin rezisztenciát (TRNG) először 1986-ban írták le az Egyesült Államokban, majd az Egyesült Királyságban, amiért a *TetM* determináns a felelős, és magasfokú rezisztenciát ($\geq 16\text{mg/l}$) okoz [65, 89]. 1997-re a törzseknek körülbelül 26%-a tetracyclin-rezisztens lett [2]. A Euro-GASP pedig jelenleg nem végez tetracyclin-rezisztencia vizsgálatot.

A **kinolonokat** az 1980-as évek közepétől használták gonorrhoea kezelésére, baktericid hatásukat a DNS giráz és topoizomeráz IV gátlásán keresztül érik el. A kinolonok előnye, hogy a különböző anatómiai lokalizációkban megjelenő fertőzésekben is hatékonyak, kevés a mellékhatásuk, viszont terhéseknek nem adhatók. Terápiás kudarcot először 1986-ban, Hollandiában közöltek enoxacin kapcsán [87]. Kinolon-rezisztencia emelkedéséről 1992-ben írtak a Nyugati Pacifikus Régióban első alkalommal. Ebben a térségben a rezisztencia mintegy hat év alatt elérte Kínában az 54%-t, a Fülöp-szigeteken a 63%-ot, Japánban a 80%-ot, ahol 1999-ben törölték az ajánlásból. Azonban, annak ellenére, hogy abbahagyták a kinolonok adását, 2005-ben még meghaladta a rezisztencia a 80%-ot. Ehhez nagyban hozzájárult, hogy az ofloxacint, levofloxacint a chlamydia fertőzések kezelésére is alkalmazták. Az USA-ban 2000-ben 1%-os volt a rezisztencia, ami 2001-ben 10%-osra emelkedett. Először 2000-ben Hawaii-ban terjedtek el a rezisztens törzsek, amelyek onnan a nyugati parton, majd egész USA-ban teret hódítottak. A CDC 2004-től MSM-ek számára nem ajánlotta tovább a kinolonokat, 2007 után pedig teljesen kihagyták az ajánlásokból [90-92]. Ami a rezisztencia-mechanizmusokat illeti, a kromoszómális változások sejtporositás változást, effluxot eredményeznek, illetve a *gyrA* gén (DNS girázt kódolja) és a *parC* gén (topoizomerázt kódolja) mutációjával eltérő támadáspont alakul ki [41]. A magasfokú-rezisztencia kialakulásáért a *parC* gén mutációja a felelős. Az utóbbi években, Európában a rezisztencia fokozatos növekedést mutatott, átlagosan 50%-os a megjelenése. 2010-ben a Euro-GASP 53%-os rezisztenciát mért, ami a 2009-es évhez viszonyítva 10%-os csökkenést jelent (62%), s ez az érték tovább csökkent 2011-re 4%-kal (49%). Majd 2012-ben pedig 50,1%-os volt, 2014-ben pedig 50,7%-os, 2015-ben 49,4%-os [76-83]. Legmagasabb rezisztenciát a heteroszexuális férfiak között mérték, míg legalacsonyabb volt a rezisztencia a nők körében [82, 83]. A WHO 2013-ban 56 ország adatait közölte, mely alapján Ázsiában a legmagasabb a rezisztencia (>

90%), s szinte minden országban 20% feletti. Összesen 4 országban alacsonyabb 5%-nál: Dominikai Köztársaság, Fiji, Új-Kaledónia, ill. Panama [1].

2.8. Az antibiotikum-terápiáról a jelenben

2.8.1. Az azithromycinről

Az azithromycin hatékonysága a gonorrhoea kezelésében az 1990-es évek óta ismert [93]. Bakteriosztatikus hatását az 50S riboszómához kötődve, a protein szintézist gátolva fejt ki. Hatása koncentráció-és időfüggő, azaz attól függ, hogy a szérum-koncentráció MIC-et meghaladó értéke mennyi ideig tart, és milyen magas ez az érték. A jelenlegi terápiás ajánlások az Egyesült Államokban és Európában 1x250-500mg ceftriaxont írnak elő 1x1-2g azithromycinnel **kombinációban**, mivel egyre többször írtak le széles spektrumú cephalosporinnal kapcsolatban terápiás kudarcot, amit a kombinációból következő szinergizmussal igyekeznek késleltetni [48,94]. Még ma is vitatott, hogy fennáll e szinergizmus a két antibiotikum között. A vizsgálatok ellentmondanak [95]. Mindenesetre az emelkedő cephalosporin- és azithromycin-rezisztencia miatt a jövőben új kombinációkra lesz szükség. Újabban az USA-ban az azithromycint más kombinációkban is, például gentamicinnel vagy gemifloxacinnal is használják [85, 96].

Monoterápiában ma már nem ajánlják az azithromycint gonorrhoea kezelésére. Alternatív terápiaként csak a kanadai ajánlás említi. Penicillin-és cephalosporin-allergia esetében csak a rezisztencia kizárása után használható. Ilyen esetekben vissza kell rendelni a beteget egy hét után kontrollvizsgálatra. Alkalmazható ugyanakkor *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma genitalium* és *Haemophilus ducreyji* esetén. Azonban, az azithromycin-monoterápia egy feltételezett, de nem bizonyított *Chlamydia* vagy *Mycoplasma* fertőzésben hozzájárulhat a rezisztens gonococcusok kisselektálódásához [97]. Előnyei miatt előszeretettel használják az STD betegségek kezelésében más antibiotikumokkal, pl. doxycyclinnel, flourokinolonokkal szemben. Az 1990-es években Dél-Amerikában gyakran alkalmazták monoterápiában STI-k kezelésére, így ebben a régióban már a 90-es években jelentettek azithromycin-rezisztens törzseket [41]. Japánban 2009-től elérhető az azithromycin a gonorrhoea terápiájában, ez az egyetlen per os alkalmazható gyógyszer a cefixim 2006-os kivonása

óta. Azonban itt is emelkednek az azithromycin-rezisztens törzsek és a magas MIC értékű izolátumok is [98].

Az azithromycin **előnye**, hogy egyszeri adagban hatékony a gonorrhoea, valamint chlamydia koinfekció esetén. Per os jól felszívódik. Hosszú felezési idejének (2-4 nap) és magas szöveti koncentrációjának (50-szerese a plazma koncentrációjának) köszönhetően elegendő egyszeri adagolása, ami javítja a betegcompliance-t [99]. Magas koncentrációt ér el a macrophagokban, neutrophilekben, melyek a fertőzés színterére vándorolva, ott magas antibiotikum-koncentrációt biztosítanak. Hatékony urethritis, cervicitis, pharyngitis és proctitis esetében is. Kombinációban használva a cephalosporinokkal, a két antibiotikum csökkenti egymás MIC értékét egyes kutatások szerint.

Az azithromycin **hátránya** viszont, hogy 1 grammos adagban gyakoribb a terápiás kudarc esélye, míg 2 grammos adagban pedig gyakoribbak a gastrointestinalis mellékhatások. Ez utóbbi mellékhatás elkerülhető egy hosszabb kibocsátású mikroszféra-készítménnyel, ami hosszú hatástartamot, emelkedett penetrációt biztosít a szövetekbe [100]. Mivel a gyógyszer jelentősebb részét az alsó gastrointestinalis traktusban bocsátja ki, ezért csökken a mellékhatások gyakorisága. Így nagyobb dózis beadása is lehetséges. További hátránya, hogy in vitro MIC méréssel nem lehet megbízhatóan megjósolni a terápia kimenetelét, ezért monoterápia után egy héttel mindenképp ellenőrizni kell a gyógyulást [66,101,102]. Azithromycin kapcsán leírták azt is, hogy a táptalaj összetétele, pH, ill. szén-dioxid szint is befolyásolja az antibiotikum-rezisztencia vizsgálat eredményét [103].

Ami a **rezisztenciát** illeti, az első rezisztens törzsek Latin-Amerikában jelentek meg az 1990-es évek közepén. A terjedő rezisztenciát valószínűleg az azithromycin széleskörű használatával lehet magyarázni az STD betegségekben. A rezisztencia a következő mechanizmusokkal magyarázható: az egyik az *mtr* gén, *macAB* ill. *mef* gén mutációjával járó efflux pumpa expressziójának fokozódása; a másik mechanizmus a célmolekula mutációjához köthető. Ez utóbbi a 23S rRNS génben történő pontmutáció, ami nagyfokú rezisztenciát okoz [2]. Ezen a génen történő A2059G pontmutáció más baktériumok esetében is nagyfokú makrolid-rezisztenciát okoz, pl. *Helicobacter pylori*, *Mycoplasma*, *Streptococcusok* esetén. Mivel egy egyszerű pontmutációval kialakulhat a rezisztencia, ezért nagyon fontos, hogy megfelelően kezeljük a gonorrhoeát: megfelelő

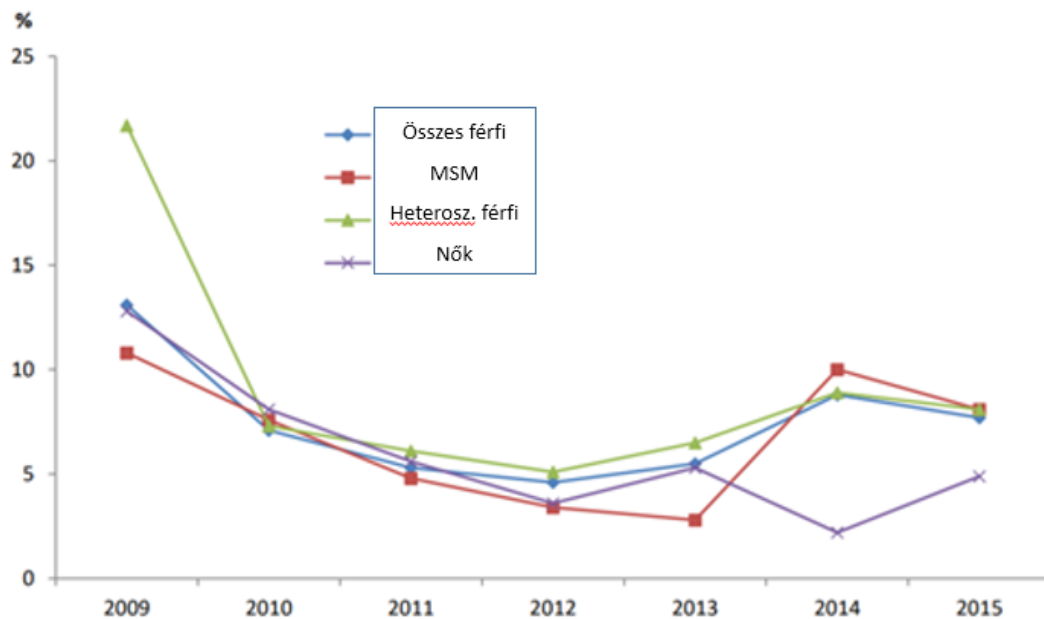
dózisban és ne azithromycin monoterápiával [104]. A 23S rRNS metilációjáért az *Erm* gének által kódolt rRNS-metiláz a felelős. Az *Erm* gének patogén és kommenzális *Neisseriák* között átjuthatnak. Mivel a rezisztencia könnyen kialakul, ezért monoterápiában az azithromycint semmiképp nem ajánlják.

A rezisztencia kialakulását egyes elméletek a mutációt megelőző (prevenciós) koncentráció=MPC emelkedésével magyarázzák. Az MPC az a legalacsonyabb antibiotikum-koncentráció, amin rezisztens mutánsok nem szelektálódnak ki. Ha egy gonococcus már rendelkezik mutációval, mely csökkent in vitro érzékenységet okoz, de ez klinikailag még nem nyilvánul meg, akkor nagyobb esély van rá az MPC növekedéséből következően további mutációk alakulnak ki a baktériumban a terápia alatt. Erre akkor van esély, amennyiben szuboptimális dózissal, pl. 1 gram azithromycinnel kezelik a fertőzést [105].

A rezisztencia terjedéséhez hozzájárulhat a fertőzés anatómiai lokalizációja is. Egy 2009-es olaszországi felmérés szerint az azithromycin-rezisztens gonococcusok 30%-a pharyngeális fertőzést okozott, ami azért fontos, mert a pharyngeális fertőzések nagy része aszimptomatikus. Így mint hordozók nagyban hozzájárulnak a betegség terjesztéséhez, ugyanakkor az apatogén *Neisseriák* átadhatják a rezisztencia-mechanizmusokat a garatban lévő gonococcusoknak [106].

Európában a Euro-GASP felmérés során a rezisztencia 2009-ben 13%-ot ért el, és 2012-ig csökkenő tendenciát mutatott. 2010-re 7%-ra csökkent, majd 2011-ben 5,3%-ot, 2012-ben pedig 4,5%-ot ért el. 2011-ben volt az első felmérés, amikor a Euro-GASP magasfokú azithromycin-rezisztenciával bíró törzseket izolált, ami 256mg/l feletti MIC értéket jelent [76-80]. 2012-től a tendencia megfordult, és a rezisztencia-növekedést mutat. 2013-ban 5,4% volt, 2014-ben pedig 7,9%. 2015-ben 7,1% volt az azithromycin-rezisztencia (5. ábra). 2013-ig a rezisztenciát ≥ 1 mg/l MIC felett definiálták, míg 2013-tól $> 0,5$ mg/l felett. A rezisztens törzsek többsége a MIC határértéket közelíti, így ezzel magyarázható a minimális ingadozás. A legmagasabb rezisztencia arányt Görögországba mérték (22%). 2015-ben a legmagasabb rezisztenciát az MSM-ek és heteroszexuális férfiak körében észlelték, melyet a non-gonorrhoeás urethritis azithromycin kezelésével hoznak összefüggésbe, habár nők chlamydia fertőzésében is azithromycint használnak általában [81-83]. Emellett szoros

összefüggést találtak az azithromycin-rezisztencia és a korábbi gonorrhoea fertőzés fennállása között, illetve az anorectális és pharyngeális fertőzés között [83].



5. ábra: Azithromycin-rezisztencia nem és nemi orientáció szerint, 2009-2015 között, Európában, Forrás: European Centre for Disease Prevention and Control. Gonococcal antimicrobial susceptibility surveillance in Europe, 2015. Stockholm: ECDC; 2017.

A **WHO**, 2013-as adatai szerint Európában, Cipruson és Görögországban 20% feletti a rezisztencia, Ázsián belül Japánban 10% feletti. Míg Dél-Amerikában egyedül Chilében nagyobb, mint 5% [1].

Kínában, Hefeiben 2015-ben a törzsek 28,6%-a volt azithromycin-rezisztens, ennek 36%-a magasfokú ($\geq 256\text{mg/l}$) rezisztenciával bírt, 10%-ában a $\text{MIC} > 2048\text{mg/l}$ -es volt [107].

Az **USA-ban** 2005 és 2013 között végeztek egy átfogó, kizárólag azithromycin-rezisztenciát vizsgáló felmérést [52]. Összességében alacsony azithromycin-rezisztenciát mértek. A 2mg/l MIC értékű törzsek kevesebb, mint 1%-át adták a vizsgálati anyagnak, ezért továbbra is javasolták az azithromycin adását kombinációs terápiában. Rezisztens törzseket sporadikusan regisztráltak, amit azzal magyaráznak, hogy az egyes megszerzett rezisztencia-mechanismusok akadályozzák a baktérium átvitelét, ahogy azt már *Campylobacter jejuni* esetén leírták. Ugyanakkor megállapították, hogy egyes mutációk, így az *mtrR* gén esetében is, a baktérium életképességét növelik. Míg mások viszont csökkenthetik azt. Szintén az USA-ban

végzett kísérletek során kimutatták, hogy az MSM-ek esetében a MIC értékek szignifikánsan emelkedettebb értékeket értek el, mint azon férfiak esetén, akiknek kizárólag női partnereik voltak (MSW). Ezt magyarázhatja az a feltevés, mely szerint az *mtr* mutációval bíró izolátumok jobban túlélnek a rectumban. Egyébiránt az MSM-ek körében a cephalosporin-rezisztencia is magasabb. Fluorokinolonok esetében is előbb homoszexuálisok között, majd heteroszexuálisok között emelkedett meg a rezisztencia. A GISP program során 2014-re az azithromycin-rezisztencia emelkedését észlelték, 4%-ig [52].

Latin-Amerikában is történtek egyéb hosszútávú kutatások. Ennek során 1999-ben nem észleltek rezisztenciát, míg 2008-ra a rezisztencia 26%-os volt, 2010-re pedig újra 1%-ra csökkent. Mivel azonban változott évről évre a résztvevő országok aránya és a vizsgált törzsek száma is, ezért az adatok fenntartással kezelendők. **Kelet-Ázsiában** a rezisztencia 1 és 4 % között változik [52].

Kanadában 2010 és 2014 között szintén a rezisztencia emelkedését észlelték. 2010 előtt a rezisztencia 0,4% alatt volt, de 2014-re 3,3%-ra emelkedett, ami megközelíti az 5%-os határt, amikor javasolt az antibiotikum elhagyása a WHO szerint [108].

Hollandiában 2012 és 2015 között az azithromycin-rezisztencia 1,2%-os volt, jóval az európai átlag alatt. Ezt azzal magyarázzák, hogy Hollandiában sose volt kombinációs kezelés, csak ceftriaxont alkalmaznak monoterápiában [60].

Németországban 2014-ben 12%-os volt az azithromycin-rezisztencia, s emellett még 33%-ban fordultak elő a mérsékelten rezisztens törzsek [109].

Általánosságban elmondható, hogy az azithromycin-rezisztencia kis százalékot ér el a világon, viszont a magas MIC értékű törzsek 2001-től kezdve egyre több helyen megjelentek. Japánban először 2014-ben írtak le 2 gramm azithromycin kapcsán terápiás kudarcot. A törzs az NG-MAST módszer alapján az 1407-es szekvencia típusba tartozik, melyről alább lesz szó a polirezisztens törzsek kapcsán. Ez a törzs felelős a legtöbb terápiás kudarcért, a fluorokinolon-, cefixim- és ceftriaxon-rezisztenciáért is [110]. Emellett magas MIC értékű törzsek megjelentek már az USA-ban, Kanadában, az Egyesült Királyságban, Olaszországban, Franciaországban, Írországban, Norvégiában és Svédországban is [106,111-118]. A PubMed weboldalon,

ha beírjuk a keresőbe az azithromycin-rezisztencia és *Neisseria gonorrhoeae* kulcsszavakat 300 cikknél is több jelenik meg a témában.

Az emelkedő azithromycin-rezisztenciát több elmélettel is magyarázzák. Az egyik szerint manapság a bakteriális légúti fertőzések, így tonsillitisek, sinusitisek, pharyngitisek, laryngitisek, otitis media, bronchitisek, közösségben szerzett pneumoniák kezelésére egyre gyakrabban alkalmazzák a makrolidokat [66]. Ennek oka, hogy a makrolidok forradalmasították a kezelést: 7-14 napról 1-5 napra lecsökkentették a kezelés időtartamát. Ezért a betegeket gyakran már előzőleg kezelték azithromycinnel alsó-felső légúti fertőzések kapcsán [106,119]. Másik elmélet szerint az azithromycin-rezisztencia az MSM-ek körében terjedt el nagyobb mértékben, ami azért lehet, mert ez a populáció gyakrabban ki van téve különböző STD-knek. Így több esetben kezelték már őket előzőleg azithromycinnel pl. egy *C. trachomatis* infekció miatt. Egy Hollandiában végzett vizsgálatban az adatok alátámasztották, hogy a gyakori azithromycin-használat az STD-k szempontjából veszélyeztetett populációban a MIC értékek emelkedését és rezisztencia kialakulását okozhatja. A vizsgálat szignifikáns összefüggést mutatott az STD betegségek kialakulása előtti 30 napban alkalmazott azithromycin-terápia és a MIC értékek emelkedése, ill. az *mtrR* mutációk megjelenése között [120].

Mindez azt mutatja, hogy hosszútávon a jelenlegi kombinációs terápia nem lesz hatékony. Az emelkedő azithromycin-rezisztencia fenyegeti a kombinációs kezelés sikerét [121]. Azithromycin helyettesítésére a solithromycin alkalmazása a jövőben szóba jöhet [122].

2.8.2. Cephalosporinokról

A 3. generációs cephalosporinok közül az im. adható ceftriaxont és több orális antibiotikumot (pl.: cefixim, cefpodoxim) használják a terápiában a kinolon-rezisztencia elterjedése óta. A cefixim esetében a rezisztens törzsek aránya kisebb 5%-nál. A MIC értékek azonban folyamatosan magasabb tartományba tolódnak [66,76-80]. 2010-től az USA-ban nem javasolják a cefixim rutinszerű használatát [55]. Európában cefixim-rezisztens törzsekről 2010-ben Norvégia, Anglia, 2011-ben Ausztria, míg **ceftriaxon**-rezisztens törzsről Spanyolország, Franciaország és Svédország számolt be az elsők között [80,123-130]. Japánban a terjedő cefixim-rezisztencia miatt már 2006

óta kivették a cefiximet a terápiás ajánlásból. Mivel a cephalosporinok képezik az elsővonalbeli terápiát, és a MIC értékek pedig emelkednek, féltő, hogy terápia-rezisztencia alakulhat ki a jövőben.

A ceftriaxon dózisa 125mg és 1000mg között választható a regionális MIC értéktől függően. A hatása attól függ, hogy az antibiotikum szérumszintje mennyire tartósan haladja meg a baktérium MIC-ét, tehát hatása időfüggő. Az EUCAST alapján a MIC határérték, mely felett rezisztenciáról beszélünk: 0,125mg/l. 0,25mg/l MIC értéknél 500mg ceftriaxon javasolható, míg 0,5mg/ml-nél 1g [59]. (Magyarországon, a Bőr-, Nemikórtani és Bőronkológiai Klinikán a legmagasabb MIC érték 0,047mg/l volt 2014-ben.) A MIC értékek növekedésével csökkenhet a hatékonysága pharyngeális gonorrhoeában, mivel a pharynxban kisebb koncentrációt ér el, mint a szérumban. Ezt bizonyítja az elsővonalbeli kombinációs kezeléssel történt terápiás kudarc is, amit 2016-ban közöltek az Egyesült Királyságban: a beteg urogenitalis gonorrhoeája gyógyult, míg a pharynxban megmaradt a fertőzés [3].

Egyéb cephalosporinok, mint ceftizoxim (500mg im.), cefoxitin (2g im., 1g per os probenidiciddel), cefotaxim (500mg im.) szintén hatékonyan alkalmazhatóak, azonban nincs előnyük a ceftriaxonnal szemben, és kevésbé ismert hatékonyságuk pharynx fertőzésben [55].

Ami a rezisztencia-mechanizmusokat illeti, háromféle rezisztencia-mechanizmus ismert pontosan a széles spektrumú cephalosporinokkal (ESC=extended-spectrum cephalosporins) szemben. A *PenA* gén változásával a PBP2 fehérje affinitása mérséklődik az ESC-khez. Az *mtrR* gén mutációjával pedig az efflux pumpák expressziója fokozódik. Míg a *penB* esetén a sejt permeabilitása csökken. A *penA* gén terjedésében fontos lépésnek tartják a kommenzális és patogén *Neisseria* közötti horizontális géntranszfert. A kommenzális *Neisseria* speciesek, mint például a *Neisseria cinerea*, *Neisseria flavescens*, *Neisseria perflava* sokkal több antibiotikumnak vannak kitéve, ezért nagyobb eséllyel jutnak rezisztencia génekhez. Ezeket egy gonorrhoea infekcióval párhuzamosan, főként pharynx gonorrhoea fertőzésében, transzfer útján átadhatják a gonococcusoknak. Ehhez még hozzájárul, hogy az aszimptomás pharynx fertőzés esetén, a hosszú tünetmentes időszak alatt, erre több idő is rendelkezésre áll. Ugyanakkor a WHO szerint egy antibiotikumot nem célravezető használni, ha a törzsek több mint 5%-a rezisztens. Az eddig említett antibiotikumok

közül csak a ceftriaxon és cefixim rezisztencia van jelenleg 5% alatt. Viszont évről évre nő a MIC értékük [2].

Az elmúlt években egyre több országban emelkedik a polirezisztens törzsek száma, jellemzően a homoszexuális rizikócsoportban. Ez azt jelenti, hogy a szulfonamidok, penicillin, tetracyclin, kinolonok mellett az elsőként választandó harmadik generációs, széles spektrumú cephalosporinokra is rezisztens törzsek jelentek meg [65,68]. Először 2000-ben, Japánban írtak le terápiás kudarcot cefiximmal. Ez visszavezethető, arra, hogy Japánban az 1990-es és 2000-es évek között nem alkalmaztak ceftriaxont, csak per os cefiximet, és azt is alacsonyabb dózisban, mint ahogy a nemzetközi ajánlásokban szerepel. 2006 óta per os cephalosorint nem is javasolnak, csak 1g iv. ceftriaxont monoterápiában. A Japánban, 2009-ben leírásra kerülő ceftriaxon-rezisztens izolátum, a H041 (ST3763) nevet kapta. Nem terjedt tovább a helyi közösségnél, ami jelzi a törzs kisebb életképességét [41, 131].

A fentiekből következik, hogy a ceftriaxon az utolsó empirikusan választható, elsővonalbeli kezelés [132]. 2010-ben találtak először Európában, Angliában és Norvégiában terápiás kudarcot cefixim alkalmazása során. Európán belül az első ceftriaxon-rezisztens *N. gonorrhoeae* speciesteket Franciaországban izolálták urogenitális fertőzésben, majd Spanyolországban [125,130]. Phayngeális gonorrhoea esetén terápiás kudarcról Svédországban írtak először [123].

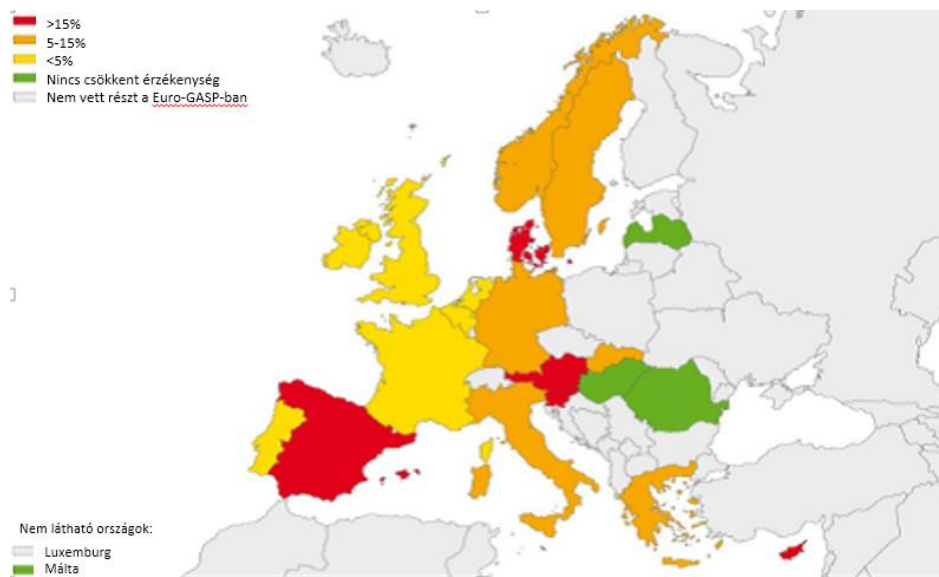
A WHO 2012/2013-as adatai szerint a Nyugati Pacifikus Régióban 12 országból 10 jelentett csökkent érzékenységet ceftriaxonra. Közülük 4 országban ez 5% felett volt, ami meghaladja a WHO által javasolt százalékot, ami felett terápiát kell változtatni [1].

Kanadában a növekvő cephalosporin MIC értékek miatt 2011-ben bevezették a kombinációs kezelést. Ezzel egyidőben 2010 és 2014 között cefixim MIC értékek csökkenését észlelték (3,3%-ról 1,1%-ra), illetve az azithromycin rezisztencia emelkedését [108].

Ausztráliában 2015-ben az AGSP program (Australian Gonococcal Surveillance Programme) 1,7%-os ceftriaxon és 1,7%-os azithromycin-rezisztenciát írt le. A kontinensen nagy regionális különbségek vannak, pl. 22%-os penicillin-rezisztencia mellett vannak penicillinre érzékeny régiók is, így a kezelés régióként eltérő [133].

Európában 2009-től kezdve minden évben Euro-GASP (European Gonococcal Antimicrobial Surveillance Programme) néven felmérést végeznek. Ennek keretében vizsgálják a *N. gonorrhoea* izolátumok antibiotikum-érzékenységét. 2009-ben 17 európai uniós ország 1300 izolátumát tanulmányozták. A felmérés alapján a törzsek 5%-a bizonyult csökkent érzékenységűnek cefiximre, s ez összesen 10 országra volt jellemző [76].

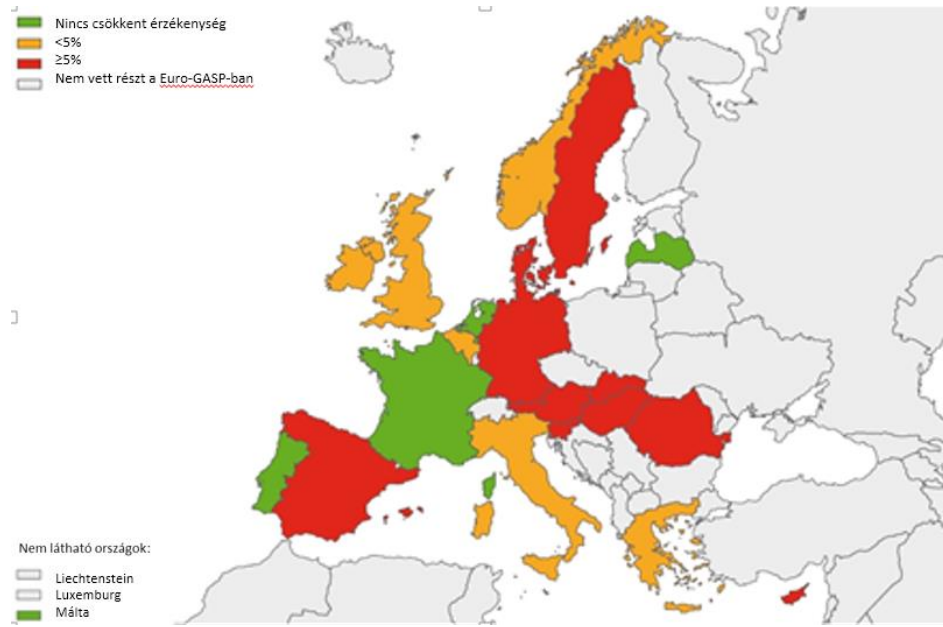
2010-re ezeknek a törzseknek az aránya már 9%-ra emelkedett, ami egy figyelemfelkeltő 4%-os emelkedés. Ebben az évben 21 országból 1700 izolátum érkezett. Az újabb résztvevő országok (Ciprus, Magyarország, Írország, Románia) adatai nélkül is hasonló megoszlásokhoz jutottak, így kizárható, hogy ez okozta volna a kiugró eltérést. A 21 országból 11-ben több, mint 5%-ban jelentek meg a csökkent érzékenységű törzsek, míg 4 országban pedig már több, mint 15%-ban (6. ábra). Ezek között van Dánia, Spanyolország, Ausztria, Szlovénia. Magyarországon csökkent érzékenységet nem találtak, de csak 17 törzs érkezett az országból [77].



6. ábra: Cefixim-rezisztens (MIC > 0.12 mg/l) törzsek aránya Európában 2010-ben, Forrás: European Centre for Disease Prevention and Control. Response plan to control and manage the threat of multidrug-resistant gonorrhoea in Europe. Stockholm: ECDC; 2012.

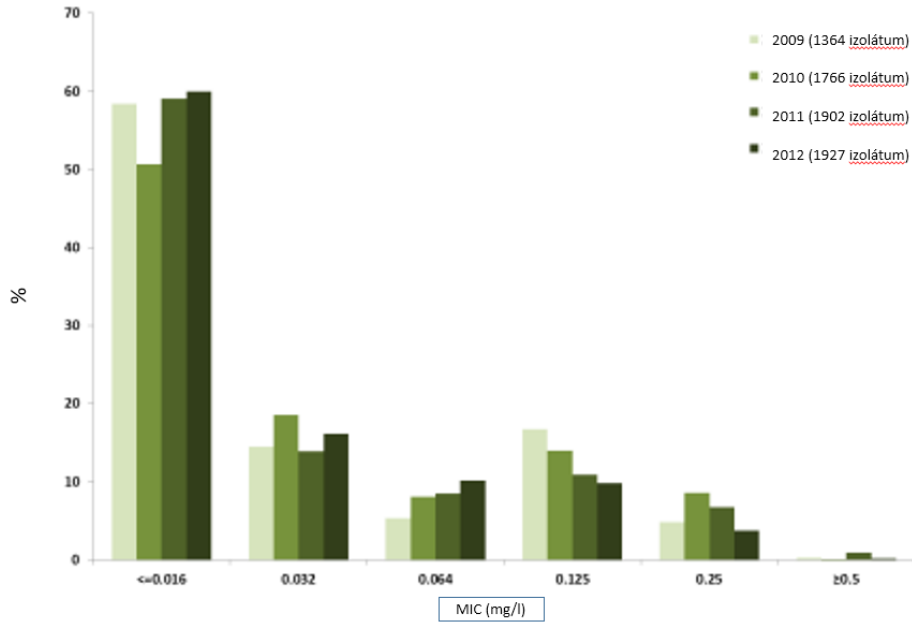
A 2011-es Euro-GASP felmérés már 1900 izolátumot vizsgált meg 21 országból, ahogy a megelőző évben is. Az adatok alapján a cefixim-rezisztencia 8%-os volt, ami 1%-kal kisebb, mint 2010-ben. Ekkor írták le az első 10 ceftriaxon-rezisztens izolátumot is. Csúpan 4 országban nem találtak csökkent cefixim-érzékenységet, így

Franciaországban, Hollandiában, Norvégiában és Litvániában. 11 országban pedig 5% felett volt a cefixim-rezisztens speciestek száma, s ezek közül 5 országban (Szlovákia, Románia, Szlovénia, Dánia, Spanyolország) még a 15%-ot is túllépte a rezisztencia (7. ábra) [78].



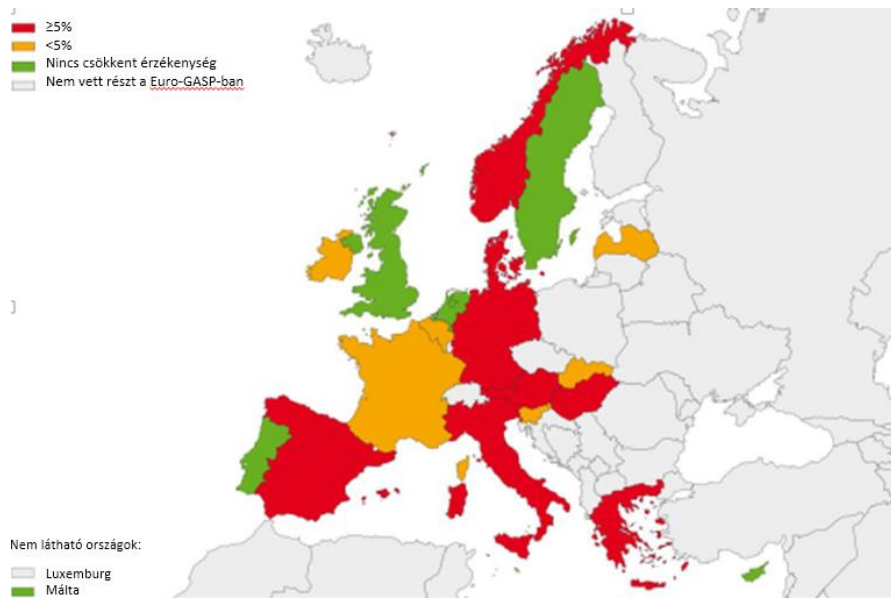
7. ábra: Cefixim-rezisztens (MIC > 0.12 mg/l) törzsek aránya Európában 2011-ben, Forrás: European Centre for Disease Prevention and Control. Annual Epidemiological Report 2013. Reporting on 2011 surveillance data and 2012 epidemic intelligence data. Stockholm: ECDC; 2013.

A 2012-es Euro-GASP kutatásban 20 ország részvételével 1927 mintát elemeztek. Ez alapján a törzsek 4%-a bizonyult cefixim-rezisztensnek, ami kb. fele az előző évben mért százaléknak. Ez szignifikáns csökkenést jelent. A csökkenést a 8. ábra is szemlélteti. Ebben az évben csak három ceftriaxon-rezisztens törzset találtak, ami szintén kevesebb a 2011-es évhez képest. Összesen 8 országban volt 5% feletti a cefixim-rezisztens törzsek aránya, és csupán Spanyolországban volt 15% feletti, szemben az előző évvel, amikor ez 5 országban is megvalósult.(9. ábra) Vizsgálták a gentamycin MIC értékeket is. Az eredmények alapján elképzelhető, hogy ez lesz a következő, alkalmazható terápiás szer a gonorrhoea kezelésében [80].



8. ábra: Cefixim MIC értékek eloszlása a Euro-GASP felmérése alapján 2009 és 2012 között

Forrás: European Centre for Disease Prevention and Control. Gonococcal antimicrobial susceptibility surveillance in Europe, 2012. Stockholm: ECDC; 2014.



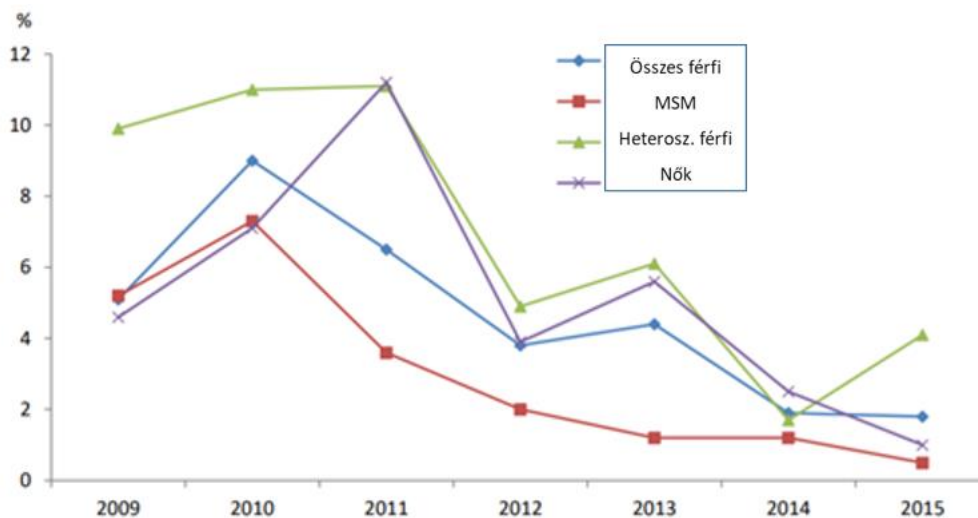
9. ábra: Csökkent cefixim-érzékenységű törzsek aránya Európában 2012-ben

Forrás: European Centre for Disease Prevention and Control. Gonococcal antimicrobial susceptibility surveillance in Europe, 2012. Stockholm: ECDC; 2014.

2013-ban 21 országból 1994 törzset vizsgálva a cefixim-rezisztens törzsek nem-szignifikáns emelkedését észlelték (3,9%-ról 4,7%-ra). 7 ceftriaxon-rezisztens törzset írtak le. Összesen 6 országban volt magasabb a cefixim-rezisztencia 5%-nál [81].

2014-ben 23 ország 2151 izolátumából 2% bizonyult cefiximre rezisztensnek, mely szignifikáns csökkenést jelez. 5db ceftriaxon-rezisztens törzs volt. A gonorrhoeás esetek 20%-a volt chlamydiával is fertőzve [82].

2015-ben 24 ország 2134 izolátumából 1,7% volt cefiximre rezisztens, illetve 1 db törzs volt ceftriaxonra rezisztens (10. ábra) [83]. Görögországban és Belgiumban lépte túl a cefixim-rezisztencia az 5%-ot. Míg a gonorrhoeás esetek 19%-ban lehetett *C. trachomatis* fertőzést is igazolni. A cefixim-rezisztencia szignifikánsan összefüggött a heteroszexuális férfiak fertőzésével.



10. ábra: Cefixim-rezisztencia nem és nemi orientáció szerint 2009 és 2015 között

Forrás: European Centre for Disease Prevention and Control. Gonococcal antimicrobial susceptibility surveillance in Europe, 2015. Stockholm: ECDC; 2017.

A kombinációs kezelés bevezetése óta a ceftriaxon és cefixim-rezisztencia csökkent, az azithromycin-rezisztencia pedig emelkedett. Utóbbi a kombinációs kezelés kudarcát jelzi előre, ahogy egy alkalommal Nagy-Britanniában már bekövetkezett [3]. Ugyanakkor a cefixim-és ceftriaxon-rezisztencia csökkenését nemcsak a kombináció bevezetésével, hanem a ceftriaxon-dózis megemelésével is lehet magyarázni. Mivel a cefixim-és ceftriaxon-rezisztencia továbbra is csökkent értéket mutatnak, a helyzet biztató, de fontos, hogy továbbra is végezzenek tenyésztést és rezisztencia-

vizsgálatokat. Az azithromycin-rezisztencia emelkedése miatt szükséges újabb antibiotikumok, ill. antibiotikum-kombinációk bevezetése [81, 83].

2.9. Az antibiotikum-terápiáról a jövőben

A szuperbaktériumként emlegetett *N. gonorrhoeae* egy meglehetősen komoly népegészségügyi problémát jelenthet a közeljövőben, s eljőhet egy éra, amelyben nem áll rendelkezésre kezelési lehetőség. Ez olyan problémákat okozhat, mint a HIV disszeminációja a magas HIV-prevalenciájú országokban [65]. Azon országok, ahol magas a gonorrhoea prevalenciája, és nincsenek elfogadható intézkedések a betegség fékezésére, a rezisztencia gyors terjedéséhez járulnak hozzá. Erre a fenyegető helyzetre reagálva, a WHO megfogalmazott egy egész világra vonatkozó akciós tervet a *N. gonorrhoeae* terjedésének és antibiotikum-rezisztenciájának ellenőrzésére [134]. Európában és az USA-ban a CDC kiadott régióspecifikus terveket. A WHO és az ECDC is kidolgozta a saját GASP programját, melyek elsősorban az antibiotikum-rezisztenciát követik, főként az ESC-kel és az azithromycinnel szemben kialakuló rezisztenciát, értesítik a népegészségügyi hivatalokat az újabb terápiás ajánlásokról, és segítik a terápia-rezisztens esetek korai felismerését és nyomon követését [66].

Az intézkedések valószínűleg megakadályozni nem tudják az ESC rezisztens törzsek terjedését, azonban lelassíthatják azt. Ezen cél érdekében Európában 500 mg-ra, Japánban 1 g-ra növelték meg a ceftriaxon egyszeri adagját. Valószínűleg a dózis emelhető 1x2g-ra, ahogy közösségben szerzett pneumonia esetén is használják.

Mindazonáltal a jövőben elengedhetetlenül szükséges újabb antibiotikumokat bevezetni, lehetőleg több, monoterápiában hatékony gyógyszer. Az ideális antibiotikum per os alkalmazható, egyszeri dózisban, az esetek >95%-ában hatékony, jó biohasznosulású, és a pharynxban is kellő koncentrációt ér el.

Az Egyesült Államokban randomizált vizsgálatokban kutadják a gentamicin+azithromycin és gemifloxacin+azithromycin kombináció hatékonyságát [135,136]. Az intravénásan vagy intramuscularisan alkalmazható **gentamicint** 1993 óta Malawiban első vonalbeli szerként alkalmazzák a gonorrhoea kezelésében, doxycyclinnel kombinációban [88]. A gentamicin azonban önmagában nem hatékony, mivel a törzsek 91%-ában hat csak, ami a 95%-os WHO kritérium alatt van [137]. A gentamicin további hátránya még, hogy nem állnak rendelkezésre MIC határértékek a

vizsgált törzsek érzékenységének interpretálására, és nincsenek adatok arról, hogy pharyngeális és anorectális infekcióban hatékony lenne [2]. In vivo vizsgálatok során fiatal, normál vesefunkciójú betegek esetén, egyszeri dózisban adva, oto-és nefrotoxikus hatást nem észleltek, de további kísérletek szükségesek [53]. Nagy-Britanniában szintén folynak in vivo vizsgálatok a gentamicin hatásosságáról [137].

A **gemifloxacin**, 4. generációs fluorokinolon, in vitro hatékonyan bizonyult ciprofloxacin-rezisztens gonorrhoeára. Azithromycinnel kombinálva kitűnő hatékonyságú volt (99,5%). Azonban a beteg 37%-nál lépett fel hányás, 23%-nál hasmenés, s emellett hiányoznak a *N. gonorrhoeae*-ra vonatkozó MIC határértékek [53].

Másik ígéretesnek tűnő antibiotikum, a makrolidok csoportjába tartozó **solithromycin**, az ESC-k ellen is hatékony [122]. Használható monoterápiában. Hat a *C. trachomatis*, *M. genitalium* fertőzésekben is. Viszont a riboszómális mutációhoz köthető azithromycin-rezisztencia félő, hogy solithromycin esetében is kifejlődhet. Egyes kutatások kimutatták, hogy mivel a solithromycin három helyen tud a riboszómához kötődni, ezért a pontmutációk, melyek azithromycin-rezisztenciához vezetnek, nem okoznak MIC emelkedést solithromycin esetén. Ezenkívül per os szedhető, jó biohasznosulású, magas plazma-és intracelluláris koncentrációt ér el. Jelenleg fázis III vizsgálatok folynak ezzel kapcsolatban [85].

A széles spektrumú, parenterálisan alkalmazható glycylicyclin, a **tigecyclin** jelenthet még megoldást. Hatékony tetracyclin-rezisztens speciesek esetén is [66]. Azonban nagyrészt az epén keresztül választódik ki, így kérdéses, hogy használható lesz e urogenitalis fertőzésben [41].

Ciprofloxacin-rezisztens törzsek kezelésére szóba jön a **sitafloxacin**, mely Japánban már elérhető [138]. Azonban további kísérletek szükségesek a hatékonyság megítélésére. Bízható in vitro kísérletek folytak lipoglycopeptid **dalbavancinnal** is [139]. Emellett eravacycline (tetracyclin-analóg), ill. avarofloxacin, delafloxacin (fluorkinolonok) in vitro hatásait is bizonyították *N. gonorrhoeae*-vel szemben [41].

További opció lehet az **ertapenem**, mely hat multirezisztens törzsek esetén is, és biztonságosan alkalmazható [140]. Azonban az ESC rezisztenciát okozó *penA*, *mtrR*, *penB* génmutációk megemelik az ertapenem MIC értékét is. Ugyanakkor a

carbapenemáz megjelenése teljes rezisztenciát vonhat maga után, ami megkérdőjelezi a jövőbeni alkalmazhatóságot. További kísérletek szükségesek ennek megítélésére.

A fentiekből következik, hogy az ismert gyógyszerek közül egyik sem ideális monoterápiára a gonorrhoea kezelésében. Vakcina kikísérletezésén is dolgoznak, eddig kevés sikerrel [141].

Nemcsak monoterápiával, hanem **kombinációs kezelésekk**el kapcsolatos kutatásokat is folytatnak. 2013-ban, az USA-ban egy kutatócsoport az antibiotikumok szinergista kapcsolatát vizsgálta: 3. generációs cephalosporinokat azithromycinnel, doxycyclinnel, gentamicinnel, rifampicinnel és fosfomycinnel kombinálva. A vizsgálat minden kombináció esetén indifferenciát mutatott ki. Se szinergizmust, se antagonizmust nem írtak le [95]. 2014-ben, svájci és svéd kollaborációval végzett ölési görbés kísérletekben vizsgálták a ceftriaxon, azithromycin és **fosfomycin** hatását. A vizsgálat alapján a ceftriaxon és fosfomycin kombináció gyorsabb és erősebb baktericid hatással rendelkezett, mint az antibiotikumok önmagukban. A ceftriaxon és az azithromycin kombinációja pedig kevésbé volt baktericid, mint a ceftriaxon monoterápiában. Így a ceftriaxon fosfomycinnel kombinációban hasznos lehet a jövőben. A fosfomycin per os, egyszeri dózisban, biztonságosan, jó biohasznosulással alkalmazható. Kevés adat van a *N. gonorrhoeae* elleni in vitro hatásról, hiányoznak a MIC határértékek *N. gonorrhoeae* esetén, illetve hosszútávon alkalmazva könnyen kialakul a rezisztencia [142].

Gentamicin (240mg im.) és azithromycin (2 gram) párosítása hatékonynak bizonyult a gonorrhoea kezelésében eddigi kutatásokban [95,143]. Makrolid-rezisztens törzsek esetén a ceftriaxon gentamicinnel adva hatékony terápia lehet. Ehhez azonban további vizsgálatok szükségesek. **Rifampicin**-cefixim párosítás előnye, hogy per os adható [59].

A fentiek mellett, hosszútávon mindenképp javítani kellene a primer prevenciót, a lakosság tájékoztatását a fertőzésről, ill. a biztonságos nemi érintkezésről. Mivel a pharynx fertőzése gyakran tünetmentesen zajlik, ezért a betegség felszámolásában fontos lenne a torokból vett minták számának emelése, illetve a kondom használatának előmozdítása orogenitális kontaktus esetén is. A terápia-rezisztens esetek kiszűrésére, reinfekció kizárására minden esetben be kellene vezetni a betegek kontrollját,

különösen pharyngeális fertőzések esetén. Indokolt a terápia-rezisztencia pontos meghatározása, s a protokollok kiadása az ilyen esetekre [2].

2.10. A tipizálási eljárások és az antibiotikum-rezisztencia kapcsolata

Tipizálási eljárásokat alkalmazhatnak epidemiológiai kutatásokban az antibiotikum-rezisztens törzsek terjedésének követésére, igazságügyi orvosszakértői vizsgálatokban, ill. akár klinikai, akár igazságügyi kontaktuskutatásban. Mivel a tipizálás különböző célból történhet, alapvető, hogy a célnak leginkább megfelelő eljárást válasszuk ki. Egy tipizálási módszer akkor tekinthető optimálisnak, ha különbséget tud tenni az eltérő forrásból származó törzsek között, és azonosítani tudja a kapcsolódó eseteket, amelyek ugyanabból a forrásból származnak [6]. A legújabb molekuláris vizsgálatok a *N. gonorrhoeae* tipizálási eredményei és a rezisztencia közötti összefüggéseket keresik, annak reményében, hogy magyarázatot adnak a rezisztens törzsek terjedésére, ill. hogy megfelelő terápia megválasztásával ez megakadályozható [5].

2.10.1. *Neisseria gonorrhoeae* multiantigén szekvencia tipizálás (NG-MAST)

Az utóbb tíz évben az NG-MAST módszer világszerte teret hódított a törzsek elkülönítésére. A módszer gyors, nagy teljesítményű, reprodukálható, objektív, magas diszkriminációs lehetőséggel bír. A kapott eredmények a nemzetközi kutatások között könnyen összehasonlíthatóak egy nyilvános internetes adatbázison ([http://: www.ng-mast.net](http://www.ng-mast.net)) keresztül, ami az analízist biztosítja [5].

A tipizálás során a gonococcus DNS 2 polimorf háztartási génjének, a *porB*-nek és a *thpB*-nek a variábilis belső fragmentumainak a bázissorrendjét írjuk le. Ezt nevezzük szekvenálásnak. Ehhez olyan géneket kellett keresni, melyek erősen variábilisak, így rajtuk a genetikai változások, mutációk gyorsan megjelennek. Ez nagyrészt a felszíni fehérjéket kódoló génekre teljesül. A baktérium külső membránjának porinját kódoló *porB* gén teljes szekvenálásával a törzseket el lehet különíteni egymástól. Mivel a *porB* gén egyik belső fragmentuma nagy valószínűséggel hordozza a változásokat, ezért nem

kötelező a teljes gén szekvenálása. A *tbpB* gén ugyancsak felszíni proteint kódol, a humán transferrin kötő fehérje β -alegységét.

A tipizálás során először a tenyésztett izolátumból szuszpenziót készítenek, majd izolálják a DNS-t. Ezután a megfelelő *porB* és *tbpB* génszakaszok felsokszorozása következik PCR (polymerase chain reaction) módszer alkalmazásával. A szükséges primerekhez a *porB* és a *tbpB* gének konzervált részeit használták fel mintának. A felamplifikált szakaszok szekvenálásával megkapják a pontos bázissorrendet. A bázissorrendből egy előre megadott, konzervált szekvencia keresendő meg, ahonnan pontos bázisszám számolandó le. A *porB* esetén 490 bp, a *tbpB* esetén pedig 390 bp, ami az NG-MAST weboldalra beillesztve kiadja a keresett allél sorszámát. Ha ismeretlen allélt azonosítottunk, akkor az NG-MAST weboldalra feltölthető. Így automatikusan új sorszámot kap a talált allél. A *porB* és a *tbpB* allélok száma alapján kapjuk meg a gonorrhoea törzs szekvencia típusát, azaz ST számát. Ha szükséges az azonos ST-k között különbséget tenni, akkor más tipizáló módszerekkel, például teljes *porB* szekvenálást, *Opa* tipizálást végezhetünk. Az NG-MAST tipizálás a módszerből adódóan a tipizáláson kívül alkalmas szexuális kontaktusok igazolására, terápiás kudarcok, ill. törvényszéki orvostani esetek vizsgálatára [6,144].

Ma az NG-MAST módszer a leggyakrabban alkalmazott tipizáló módszer a gonorrhoea esetén. Először 2010-ben, a Euro-GASP program keretében végezték el az első olyan nagyszabású vizsgálatot, ami az antibiotikum-rezisztencia felmérést molekuláris tipizáló módszerrel egészítette ki. A kutatás során 21 ország 1066 törzsét NG-MAST módszerrel is vizsgálták, és 406 különböző ST típust azonosítottak. A legelterjedtebb szekvencia típusokat genocsoportokba sorolták. A genocsoport esetében egy allél megegyezik, míg a másik $\geq 99\%$ -ban hasonlóságot mutat, ez *porB* esetén 5 bázispár különbség, míg *tbpB* esetén 4 bázispár lehet. A genocsoportot mindig a leggyakoribb szekvencia típusról nevezik el. A leggyakoribb genocsoport a G1407-es volt, ami az izolátumok 23%-át adta, és 21 ország közül 20-ban fordult elő. 13-ban pedig ez volt a leggyakoribb. A 2003 és 2005 közötti kutatások alapján az ST1407 nem emelkedett ki sem európai országokban, sem Európán kívül. Először 2007-ben figyeltek fel az emelkedésére. 2010-re 16%-ot ért el az előfordulása. Mindez arra utal, hogy az ST1407 széleskörű elterjedése egy újkeletű jelenség, amit az USA-ban, Kanadában, Ausztráliában, Japánban is megfigyeltek. Azért van nagy jelentősége, mert

az ST1407-es egy multirezisztens törzs: rezisztens ciprofloxacinnal és emelkedett cefixim, ceftriaxon és azithromycin MIC értékekkel rendelkezik. Tehát ez a törzs áll az eddigi terápiás kudarcok többségének hátterében. Az ST1407 egyetlen mutációval a *penA* génen, ami a PBP2-t (penicillin-binding protein 2) kódolja, magasfokú rezisztenciára tesz szert a cefiximmal és a ceftriaxonnal szemben. Ezt Franciaországban írták le először [125]. Az ST1407-et gyakoriságban követő törzsek az ST2992 (7%) és az ST225 (5%). Az ST225 és genocsoportja összefüggést mutatott ciprofloxacinnal rezisztenciával. 2003-ban írták le először. Azóta is jelen van. Kanadában pedig csökkent cefixim és ceftriaxon-érzékenységet mértek ennél a törzsnél [145]. A többi törzs esetén szoros összefüggést ST és antibiotikum-rezisztencia között nem írtak le. Magyarország ugyan részt vett a felmérésben, de csak 17 törzssel járult hozzá az ország a kutatáshoz, míg a többi ország 50 izolátumot biztosított [5].

Tehát a módszer lényege, hogy a szekvencia típusok és az antibiotikum-rezisztencia közötti összefüggések előrejelzik a regionális antibiotikum-rezisztenciát. Azonban az egész világra nézve a rezisztencia alakulását nehéz megjósolni, mivel az egyes országokban az ST-k jelentősen különbözhetnek, ezért ehhez további, átfogó kutatások szükségesek [7]. A módszerrel továbbá csoportosíthatjuk az egymással összefüggő, rokon ST-eket, és időben és térben elemezhetjük ez alapján az összefüggő eseteket. Ez pedig a gonorrhoea fertőzések sikeres ellenőrzése miatt lényeges, mivel azonosíthatjuk a fertőzések kiinduló pontját, a fertőző forrásokat [146].

A kisebb változások a hipervariábilis régiókban, főként a *porB*-ben, már új ST-khez vezetnek, amely ST-k egymáshoz filogenetikailag közel állnak. Az ST-k nagy változatossága miatt ez a módszer jól alkalmazható rövidtávú molekuláris kutatásokra. Mivel az ST-k és az antibiotikum-rezisztencia kapcsolata régióként változik, ezért minden régióban el kellene végezni a vizsgálatokat arra vonatkozóan, hogy az ST szám valóban előrejelzi-e a rezisztencia-fenotípust. Azokban az esetekben, amikor a gonococcus olyan antibiotikumra érzékeny, ami már nem szerepel az ajánlásokban (pl.: ciprofloxacinnal), felhasználhatjuk az NG-MAST módszert. Ilyenkor, ha az ST szám és az érzékenység összefüggése köztudott, akkor az antibiotikum észszerű használata mellett szól [7].

Az NG-MAST eljárás rövidebb időszakok, így pár év követésére alkalmas, mivel a *porB* gének olyan gyakorisággal változnak, hogy nincs értelme évtizedeket átfogó kutatásoknak.

2.10.2. Egyéb tipizáló eljárások összevetése az NG-MAST vizsgálattal

A DNS alapú módszereket gélelektroforézisen alapuló és szekvenáláson alapuló csoportokra oszthatjuk. Az előbbi csoportba sorolható a plasmid-vizsgálat, a PFGE (Pulsed field gel electrophoresis), a ribotipizálás, az *Opa* tipizálás és az ARDRA (amplified rDNA restriction analysis). Ezek közül a leglényegesebb és legelterjedtebb az ***Opa* tipizálás**, melyet az NG-MAST-tal azonosított ST-k további elkülönítésére lehet használni. A genom 11, nagy diverzitású *opa* génjét PCR-rel amplifikálni kell, majd restriktív endonukleázzal emészteni, s a fragmentumokat gélelektroforézissel szétválasztani. Az eljárás előnye, hogy kitűnően elkülöníthetők a különböző törzsek. Hátránya viszont, hogy az eredményeket nem lehet összehasonlítani a laborok között. Alkalmas a gonorrhoea populáció elemzésére, szexuális kontaktusok követésére, terápia-rezisztencia és kevert infekció kimutatására [147].

A szekvenálással járó további eljárások az NG-MAST-on kívül a *porB* alapú DNS szekvenálás és az MLST (Multilocus sequence typing) és a WGS (Whole- genome sequencing). **Teljes *porB* szakasz szekvenálása** kitűnően elkülöníti egymástól a törzseket, könnyen reprodukálható, és az eredmények is objektíven összevethetők a laborok között. Használható az azonos NG-MAST ST-k elkülönítésére. Viszont nincsen megfelelő adatbázis, ahova a szekvenciák feltölthetők lennének, mint például az NG-MAST esetén. Az **MLST** a gonococcus 7 háztartási génjének a belső fragmentumainak a bázissorrendjét adja meg. A gének nélkülözhetetlen enzimeket kódolnak, így mindegyik izolátum tartalmazza őket. Mivel a gének kismértékben különböznek, ezek alapján a törzseket szekvencia típusokba sorolhatjuk. Az MLST is reprodukálható, objektív módszer. A kutatások nemzetközi szinten is összevethetők egy weboldal segítségével: <http://pubmlst.org>. Hátránya, hogy hosszadalmas és sok hozzáértés szükséges, továbbá nem kellőképpen különíti el a törzseket egymástól [6]. Az MLST a legalkalmasabb módszer hosszabb időszakokra, évtizedekre kiterjedő vizsgálatokra, az NG-MAST-tal ellentétben, ami túl gyorsan változó géneket vizsgál, és rövidebb időszakok elemzésére alkalmas [6,144]. A **WGS** a baktérium teljes genom

szekvenálását jelenti, mely a rezisztencia-determinánsok ismeretében előre jelezheti a baktérium antibiotikumok iránti érzékenységét. Hátránya, hogy ismeretlen rezisztencia gének esetében a módszer nem megbízható [44].

3. Célkitűzések

- A) 1.) A gonorrhoea fertőzés incidenciája az ezredforduló óta emelkedik világszerte [15]. Célul tűztem ki a tenyésztéssel igazolt gonorrhoea fertőzés incidenciájának vizsgálatát 2010 és 2014 között, a Bőr-, Nemikórtani és Bőronkológiai Klinikán, a SE *Neisseria gonorrhoeae* Referencia Laboratóriumában. A tenyésztéssel igazolt gonorrhoea fertőzött betegpopuláció kor és nem szerinti vizsgálata is céлом volt.
- 2.) További céлом volt a tenyésztés által igazolt fertőzés anatómiai lokalizáció szerinti megoszlását vizsgálni, kiemelten a pharynx infekciójára, amely legtöbb esetben aszimptómás és fontos szerepet játszik a rezisztens törzsek kialakulásában, a kommenzális és patogén Neisseriak közötti géntranszfernek köszönhetően [66].
- 3.) Mivel a gonococcusok az elmúlt évtizedekben az újabb és újabb bevezetésre kerülő antibiotikumokra rezisztensek lettek, ezért fontosnak tartom az antibiotikum-érzékenység követését évről évre, ahogy az a GASP programok során megvalósul világszerte, és ahogy a WHO 2012-es kiadványa is hangsúlyozza az antibiotikum-rezisztencia terjedésének folyamatos monitorozását [4]. Céлом volt továbbá kiemelten vizsgálni a jelenlegi terápiás ajánlásban szereplő antibiotikumok rezisztenciáját, azaz a 3. generációs cephalosporinok és az azithromycin hatékonyságát.
- 4.) Az érvényes európai terápiás ajánlás a jelenlegi terápia (a ceftriaxon és azithromycin kombináció) létjogosultságát az antibiotikumok szinergista hatása mellett azzal is alátámasztja, hogy az azithromycin a chlamydia koinfekciót is eradikálja, ami gyakorinak tekinthető 30 év alatti STD betegek között [38]. Céлом volt ezt az állítást összevetni a Bőr-, Nemikórtani és Bőronkológiai Klinikán észlelt viszonyokkal. Az STD ambulanciáról beérkező, multiplex RT-PCR-rel vizsgált minták eredményét kiértékelve, elemzésre került a *C.trachomatis* fertőzés és a gonorrhoea koinfekció gyakorisága.
- B.) Molekuláris vizsgálatok felhasználása egy racionális terápia megalapozásához Magyarországon.
- 1.) További célul tűztem ki NG-MAST (*N.gonorrhoeae* Multi Antigen Sequence Typing) molekuláris tipizáló eljárás alkalmazásával 52 törzs szekvencia típusának

meghatározását a 2013-as évből, mellyel a magyarországi NG-MAST típusok előfordulási gyakoriságáról szerettem volna képet adni, és eredményeinket az ismert európai NG-MAST típusok előfordulási gyakoriságával összehasonlítani. Vizsgálatunk az első olyan magyarországi reprezentatív vizsgálat, ami kellő mennyiségű törzs tipizálásával az évek óta fennálló adathiány pótlására is képes, és kiegészítheti az Euro-GASP felmérés adatait.

2.) Emellett további tervem között szerepelt 50 db, 2014-es évben izolált, azithromycin-rezisztens törzs szekvencia típusát megállapítani, az eredményeket összevetni külföldi felmérések adataival.

3.) Újabb célkitűzésként pedig a 2014-es, azithromycin-rezisztens szekvencia típusok molekuláris evolúciós vizsgálatát terveztük, filogenetikai fa készítésével, az eredményekből következtetések levonásával a sikeresen terjedő szekvencia típusokról.

4. Módszerek

4.1. Adatgyűjtés

A Semmelweis Egyetem, Bőr-, Nemikórtani és Bőronkológiai Klinikáján, a *Neisseria gonorrhoeae* Referencia Laboratóriumban, a tenyésztésre beérkező minták alapján végeztünk retrospektív adatgyűjtést, 2010 és 2014 között, a *Neisseria gonorrhoeae* fertőzések előfordulásáról, a fertőzés anatómiai lokalizációjáról, nemek arányáról, a rezisztencia-adatokról. A betegek adatait az 1997/CLIV 25§. szerint kezeltük, az orvosi titoktartás szerint. A rutin diagnosztika során izolált kórokozók rezisztenciájának és molekuláris epidemiológiájának vizsgálatát a 161/2014-es TUKEB (Tudományos és Kutatásetikai Bizottság) engedély alapján végeztük.

4.2. A *N. gonorrhoeae* baktériumok tenyésztése

Az STD ambulancián a tünetes gonorrhoea-suszpekt betegektől és partnereiktől vett minta várakozás és szállítás nélkül közvetlenül táptalajra lett kioltva. A mintákat urethrából, cervixből, rectumból és pharynxból vették. A páciensektől vett váladék előmelegített VCA3 agarra (Biomérieux, Budapest) lett oltva, ami a természetes flóra és a vancomycin-érzékeny törzsek kinövését akadályozza. Emellett nem szelektív PVX csokoládé agaron (Biomérieux, Budapest) is vizsgáltuk a vancomycin-szenzitív törzsek növekedését. Az előírásoknak megfelelően 37° C-on, 5%-os szén-dioxid atmoszférán, 1-3 napig tenyésztettük a táptalajokat. A gonorrhoea telepek szürkék, fényesek, 0,5-1,0 mm átmérőjűek, és oxidáz-pozitívak. Ha 72 óra után sem indulnak növekedésnek a telepek, a tenyésztés negatív. A kitenyésztett törzseket ezután -80°C-on lefagyasztottuk megőrzés céljából.

4.3. A rezisztencia vizsgálata Epsilonmeter-teszttel

PVX agaron (Biomérieux, Budapest) MIC Test Strip (Liofilchem® s.r.l., Roseto degli Abruzzi, Italy) alkalmazásával mértük az antibiotikumok minimális inhibitor koncentrációit. A MIC meghatározást 7 antibiotikum esetén végeztük el. Ezek a következők voltak: azithromycin, cefixim, ceftriaxon, ciprofloxacin, penicillin, spectinomycin és tetracyclin. A mérés során a forgalmazó utasításai szerint jártunk el: 0.5 McFarland sejtsűrűségű szuszpenziót készítettünk, ami körülbelül 4-5 telep feloldását jelenti 2 ml fiziológiás sóoldatban. Mindezt vattapálcával PVX agarra

szélesztettük. A táptalajokat 37° C-on, 5%-os szén-dioxid atmoszférán helyeztük el egy napig. Majd egy nap után a gátlási zónának megfelelő koncentrációkat leolvastuk a MIC Test Stripről. A MIC alapján meghatározott antibiotikum-rezisztencia tartományokat az EUCAST ajánlásban szereplő határértékek szerint adtuk meg (1. táblázat) [148]:

1. táblázat: EUCAST által meghatározott rezisztens és érzékeny tartományok MIC határértékei

Antibiotikum	MIC (mg/l) határérték	
	Érzékeny ≤	Rezisztens >
Benzylpenicillin	0,06	1
Cefixim	0,12	0,12
Ceftriaxon	0,12	0,12
Ciprofloxacín	0,03	0,06
Ofloxacin	0,12	0,25
Azithromycin	0,25	0,5
Tetracyclin	0,5	1
Spectinomycin	64	64

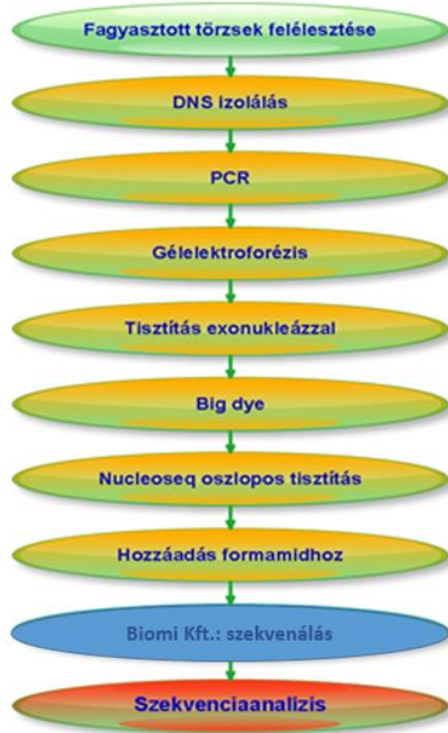
4.4. Multiplex PCR vizsgálat koinfekciók kimutatására

Közvetlenül a betegekből érkező vizsgálati anyagból végeztünk DNS izolálást Ribospin™ vRD izoláló kittel (GeneAll®) a gyártó leírása szerint, majd multiplex Real Time vizsgálatához az Anyplex™ II STI-7 Detection STD kitet (Chemium, Hungary) használtuk a gyártó (Seegene) leírása szerint. A multiplex PCR-rel egyidejűleg *N. gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum*, *U. parvum*, *Mycoplasma hominis*, *M. genitalium* és *Trichomonas vaginalis* fertőzést tudtunk detektálni.

4.5. Az NG-MAST módszer lépései

A 2013-as év *N. gonorrhoeae* törzseiből kiválasztottunk szekvenálásra 52 törzset, melyek a kontaktus csoportokból 1 index törzset képviseltek. A 2014-es év törzseiből szintén kiválasztottunk 50 azithromycinre mérsékelten rezisztens és rezisztens tartományba tartozó törzset. A választásunk magyarázata az Eredmények fejezetben részletezett rezisztencia-viszonyokkal magyarázható. Az emelkedett azithromycin-rezisztencia miatt, szeretnénk volna az azithromycin-rezisztens törzseket ST típusokba

sorolni, elemezni a magyarországi viszonyokat, és ezt összehasonlítani más országok eredményeivel. A kiválasztott törzseken az alább ismertetett vizsgálati sort végeztük, melyet a következő folyamatábra (11. ábra) szemléltet:



11. ábra: Az NG-MAST kísérlet folyamatábrája

4.5.1. *Neisseria gonorrhoeae* törzsek tenyésztése fagyasztást követően

A klinikán kezelt betegek mintáinak feldolgozása után a tiszta *N. gonorrhoeae* telepek felhasználásával törzsbankot hozunk létre, ami azt jelenti, hogy kriocsőben lefagyasztjuk a törzseket, -80°C -on. A kiválasztott, lefagyasztott törzseket kiolvastottuk, előmelegített, szelektív VCA táptalajra kioltottuk és tenyésztettük a fent részletezett körülményeknek megfelelően.

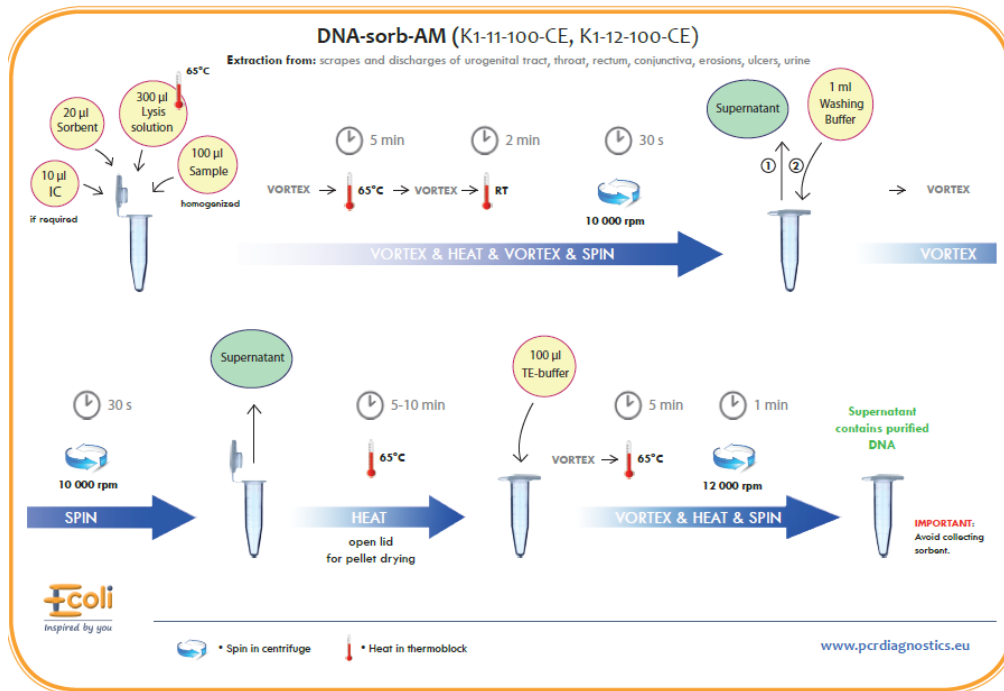
4.5.2. DNS kivonása

A *N. gonorrhoeae* DNS-ének izolálásához 95°C -on történő hőkezelés is elegendő, ugyanakkor számos izoláló kitet gyártanak erre a célra.

2013-ban izolálásra RibospinTM vRD izoláló kitet (GeneAll®) használtunk. Első lépésként a felélesztett *N. gonorrhoeae* tenyészetekből $200\ \mu\text{l}$ szuszpenziót készítettünk, s ehhez adtunk hozzá $500\ \mu\text{l}$ VL puffert, majd vortexeltük a mintát, s 10 percig állni hagytuk szobahőmérsékleten. Majd $700\ \mu\text{l}$ RB1 puffert adtunk a mintához,

és utána megint vortexeltük. Ezután 750 µl-t átmértünk kis centrifuga csövekbe, és lecentrifugáltuk 1 percig 10.000g-n. Utóbbi lépést még egyszer megismételtük a maradék mintával. Majd 500 µl RBW puffert mértünk a centrifugacsőbe, s 30s alatt 10.000g-n lecentrifugáltuk. Ezt követően 500µl RNW puffert pipettáztunk a csőbe, s 1,5 percig centrifugáltuk 10.000g-n. A centrifuga csövet ezek után új Eppendorf-csőbe helyeztük és 80µl nukleázmentes vizet mértünk a centrifugacső membránjára, s újabb 1 percig centrifugáltuk a mintát. Ezzel az utolsó lépéssel nyertük ki a DNS-t, amit aztán -80°C-n tároltunk, amíg nem került további felhasználásra.

2014-ben újabb kitet választottunk a feladatra: DNA-sorb-AM DNS izoláló kitet (AmpliSens. ®., Bratislava) használtunk. Először a gonococcus telepeket 100µl fiziológias sóoldatban szuszpendáltuk, s hozzáértünk 20µl, vortexelt universal sorbentet, illetve 300 µl 65°C-on, 5 percig előmelegített lízis oldatot. Ezután az Eppendorf-csőket vortexeltük, majd 65°C-on 5 percig állni hagytuk. Majd újra vortexeltük, és utána 2 percig hagytuk állni szobahőmérsékleten. Ezután lecentrifugáltuk fél perc alatt, 10.000g-n. Majd a felülúszót pipettával lemértük a csövekből, s 1ml mosópuffert adtunk hozzá. Ezután újra vortexelés következett, amit a fél percig tartó 10.000g-vel történő centrifugálás követett. A továbbiakban a felülúszót újra eltávolítottuk. Végül 10 percig, 65°C-on állni hagytuk az Eppendorf-csőket nyitott kupakkal. Majd 100 µl TE puffert mértünk a csövekbe, vortexeltük a mintát, és 65°C-on újra inkubáltuk 5 percre, ekkor már zárt kupakkal. Utolsó lépésben pedig 10.000g-n lecentrifugáltuk egy perc alatt a csöveket. A kivont DNS-t a felülúszó tartalmazta (12. ábra).



12. ábra: A DNS izolálás folyamatábrája

Forrás: <http://www.pcrdiagnostics.eu/files/documents/schemes/DNASorb.pdf>

4.5.3. *PorB* és *tbpB* szakaszok felszorzása PCR módszerrel

A *N. gonorrhoeae*-genom specifikus génjeinek azonosításához a keresett szakaszokat amplifikálni kell. A PCR (=polimeráz láncreakció) során templát DNS-ként az előző lépésben kivont DNS-t használtuk fel. Primerként a nemzetközi kutatások során bevált primereket (Csertex kft. Budapest) vettük igénybe [144]. A primerek bázissorrendje a nemzetközi cikkek alapján:

porB reverse: 5'-CCG ACA ACC ACT TGG T-3'

porB forward: 5'-CAA GAA GAC CTC GGC AA-3'

tbpB reverse: 5'-TTC ATC GGT GCG CTC GCC TTG-3'

tbpB forward: 5'-CGT TGT CGG CAG CGC GAA AAC-3'

A PCR reakció során a *tbpB* gén esetében egy 589 bázispárból álló szakaszt, míg a *porB* gén esetén 737 bázispárból álló szakaszt amplifikáltunk. Az anyagok összemérésekor a következő mennyiségben alkalmaztuk az egyes összetevőket:

- 25 µl ImmoMixRed (Bioline, Budapest)
- 21 µl nukleázmentes víz (Bioline, Budapest)
- 1 µl forward primer (*porB* vagy *tbpB*)

- 1 µl reverse primer (*porB* vagy *tbpB*)
- 2 µl izolált DNS

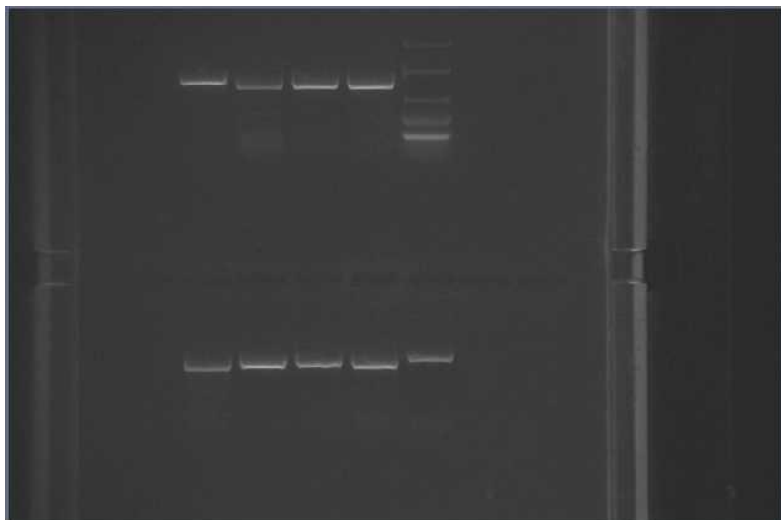
Az ImmoMix-et, a primereket és a DNS-t is a kísérlet előtt vortexeltük. A mintákat a PCR gépben inkubáltuk. Ezalatt, a *tbpB* gének felsokszorozásához a következő programot alkalmaztuk:

- I. Kezdő denaturáció: 95°C-on 5 percig
- II. Denaturáció: 95°C-on 30 másodpercig
Annelláció: 69°C-on 30 másodpercig
Extenzió: 72°C-on 1 percig
Ezt a 3 lépést 25-ször kell megismételni.
- III. Végző extenzió: 72°C-on 10 percig
- IV. Hűtés 4°C-ra

A *porB* esetén az annellációs lépést 58°C-on végezzük, a többi lépés megegyezik a fent leírt lépésekkel.

4.5.4. Az amplifikált szakaszok jelenlétének ellenőrzése gélelektroforézissel

Agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük a PCR vizsgálat eredményességét. 2 db 0,5 mg-os agaróz tablettát adtunk 50 ml 2%-os TAE pufferhez, majd addig melegítettük, míg átlátszó nem lett. A kb. 55°C-ra lehűlt oldathoz 4 µl GelGreen-t (Biotium, Budapest) adtunk hozzá, ami a DNS-hez kötődve megfesti azt. Ezután az oldatot öntőformába helyeztük, ami kb. 30 perc után megdermedt. Ezután a gél készítéséhez használt 2%-os TAE pufferrel teli futtató kádba tettük. A gél zsebeibe 15 µl PCR terméket pipettáztunk, és 90V feszültségen 30 percig futtattuk. Emellett DNS létrát (Easy Ladder, Bionline, Budapest) is futtatunk a DNS szakaszok méretének viszonyításához (13. ábra). Ha igazolódott a DNS jelenléte a mintában folytattuk a kísérletet.



13. ábra: *N. gonorrhoeae* DNS gélelekrtoforézise

4.5.5. Tisztítás exonukleázzal és alkalikus foszfatázzal

2,5 µl PCR termékhez 1 µl ExoSAP-IT reagenst (Biomedica Hungária Kft., Budapest) adtunk, ami egy exonukleáz és egy alkalikus foszfatáz enzimet foglal magába. Ezekre azért van szükség, mert el kell távolítani a zavaró primereket, ill. dinukleotidokat, amelyek akadályozzák a szekvenálást. A mintát 37°C-on 45 percig, 80°C-on 15 percig melegítettük, majd 4°C-on inkubáltuk.

4.5.6. Big dye, azaz szekvenáló PCR: a dinukleotidok jelölése

A szekvenálás következő lépése a dinukleotidok jelölése. Az összetevőket a következő mennyiségben mérjük össze:

- 0,5 µl primer (forward) (Csertex Kft., Budapest)
- 4,9 µl nukleázmentes víz (Bioline, Budapest)
- 0,6 µl BD puffer, amely tartalmazza a fluoreszcensen jelölt dideoxinukleotidokat [BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems®)]
- 1 µl BD terminátor enzim [BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems®)]
- 3,5 µl exonukleázzal tisztított PCR termék

Ezt az elegyet PCR gépben a következő programon inkubáljuk:

I. 96°C-on 2 percig,

II. 94°C-on 20 másodpercig,

60°C-on 4 percig

Az utóbbi két lépést 35-ször ismételtük.

III. Hűtés 4°C-ra.

4.5.7. Oszlopos tisztítás nucleoseq kittel

A big dye elvégzése után a BigDye terminátortól, a primerektől és a hozzáadott nukleotidoktól NucleoSeq kit (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG) segítségével, gélfiltrációs technikával mentesítettük a terméket. Először az oszlopos Eppendorf-csőveket fél percig 10.000g-n centrifugáltuk, utána 600 µl vizet mértünk hozzá, vortexeltük, majd állni hagytuk legalább 30 percre, miután újra vortexeltük. A következő lépésben az alsó kupak eltávolítása után 10.000g-n, 2 percig centrifugáltuk, majd a lecsepegett vizet leöntöttük. Ezután a géloszlopok tetejére pipettáztuk a PCR terméket, s centrifugáltuk 5,5 percen keresztül 10.000g-n. A cső aljára összegyűlik a tisztított termék.

4.5.8. Hozzáadás formamidhoz

Az oszlopos tisztításból kapott DNS-hez 12 µl formamidot mértünk hozzá, és 95°C-on 5 percre PCR gépbe helyeztük. A kapott terméket küldtük tovább a pontos szekvenciák analíziséhez a Biomi Kft-nek (Gödöllő).

4.5.9. Szekvencia-analízis ChromasLite programmal

A megküldött szekvenciákat a ChromasLite 2.1. programmal elemeztük. A *porB* génen 490, *tbpB* génen pedig 390 bázisnyi szakaszt azonosítottunk, s a www.ng-mast.net weboldalon keresztül ST szerint csoportosítottunk, az új törzseket pedig ide feltöltöttük.

4.6. Filogenetikai fa készítése

A filogenetikai vizsgálatok célja az evolúciós kapcsolatokra következtetni. 1965-ben Zuckerkandl és Pauling írta le, hogy a nukleinsavak és fehérjék szekvenciájából következtetni tudunk az evolúciós eseményekre [149].

A szekvenciák összehasonlításához szükséges, hogy a homológ nukleotid helyeket egymás alá rendezzük, ami az illesztés (*alignment*) folyamata. A filogenetikai rekonstrukció újabb lépése a filogenetikai fa készítő algoritmus kijelölése.

Alapvetően két csoportból választhatunk: távolság alapú és karakter alapú fa készítő módszerek. Az első során a szekvenciák alapján kiszámolt távolságmátrixot ábrázoljuk, ez a Neighbour Joining metódus. A második esetben pedig a konkrét karakterek alapján számítják ki a fatopológiát (Maximum Likelihood módszer).

A 2014-es, azithromycin-rezisztens szekvencia típusok analíziséhez MEGA6 programot alkalmaztunk [150]. A filogenetikai analízist neighbour-joining statisztikai módszerrel (szomszéd-összevonó módszer), maximum composite likelihood modellel (legnagyobb valószínűségi érték modell) végeztük. A szekvenciák hasonlósági fokát Megablast (highly similar sequence) BLASTN programmal határoztuk meg az NCBI weboldal segítségével [151].

5. Eredmények

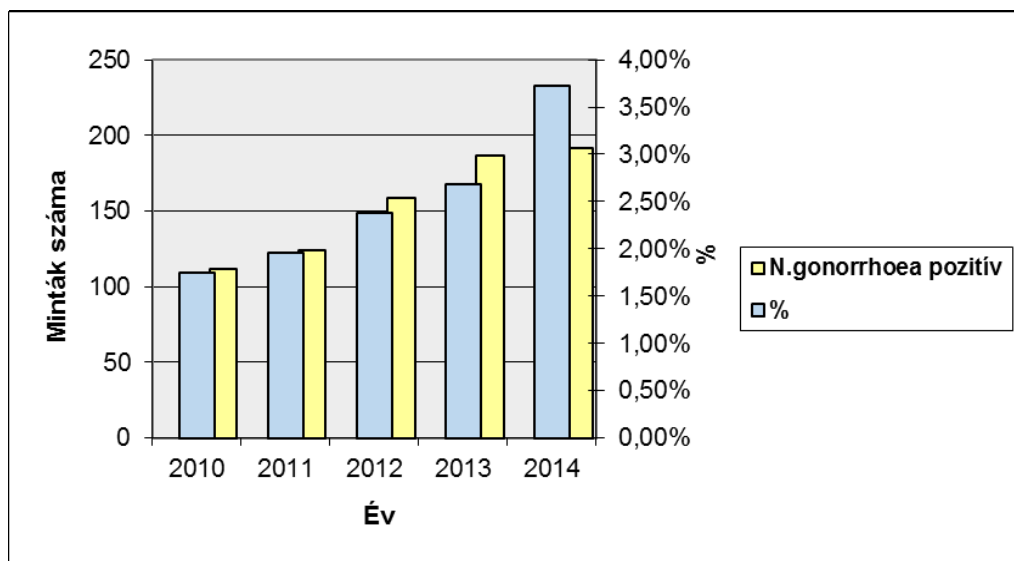
5.1. Epidemiológiai adatok 2010 és 2014 között a Mikrobiológiai Laboratórium vizsgálati anyaga alapján

5.1.1. A *N. gonorrhoeae* pozitív tenyésztések aránya

Az elmúlt évtized nemzetközi felmérései alapján a fejlett országok többségében folyamatosan emelkedik a gonorrhoea incidenciája. Az STD ambulanciáról érkező, *N. gonorrhoeae* pozitív tenyésztések száma és aránya 2010 és 2014 között folyamatosan emelkedett. Ez számokkal kifejezve azt jelenti, hogy 2011-re 11%-kal, 2012-re 28%-kal, míg 2013-ra 18%-kal, 2014-re pedig 4%-kal emelkedett a tenyésztéssel igazolt fertőzött betegek megjelenése (2. táblázat, 14. ábra). A gonorrhoea pozitív minták aránya a bakteriológiai tenyésztések számához képest is növekedett évről évre, ami alátámasztja a gonorrhoea fertőzés terjedését.

2. táblázat: 2010 és 2014 között *N. gonorrhoeae* pozitív tenyésztéssel bíró páciensek száma, százalékos aránya a bakteriológiai vizsgálatra küldött minták számához viszonyítva

Év	2010	2011	2012	2013	2014
Vizsgálati anyag	6397	6350	6682	6954	5164
<i>N. gonorrhoeae</i> pozitív tenyésztéssel bíró páciensek száma	112	124	159	187	192
%	1,75	1,95	2,38	2,69	3,72



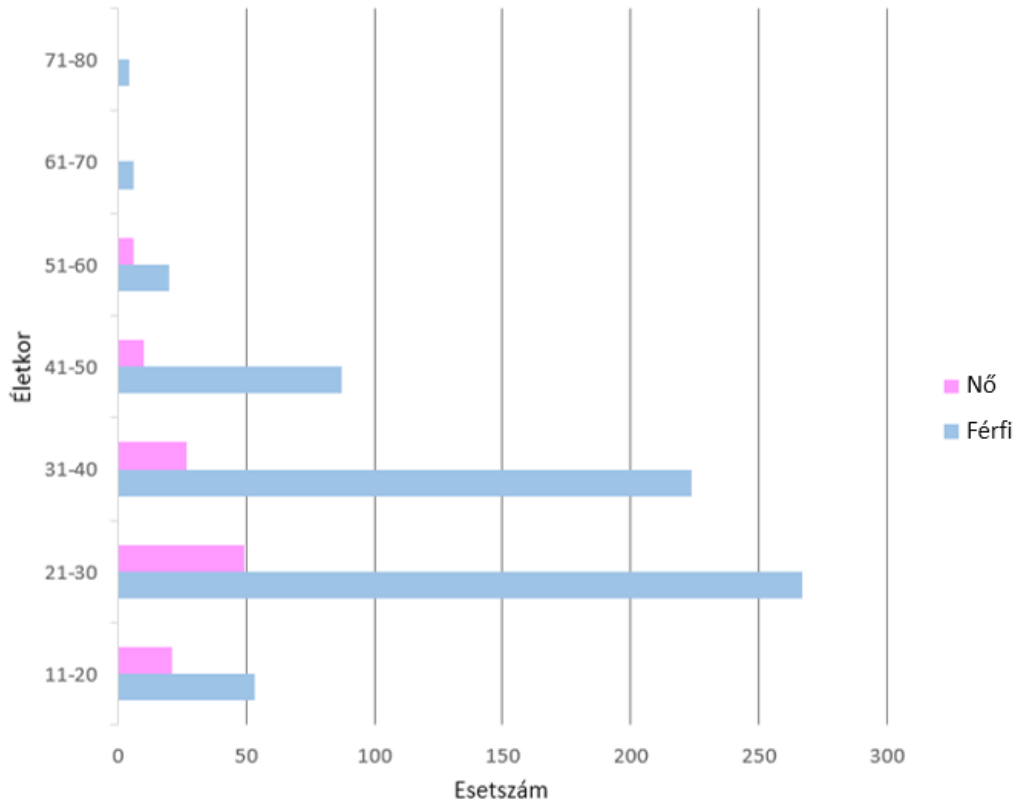
14. ábra: 2010 és 2014 között *N. gonorrhoeae* pozitív tenyésztéssel bíró páciensek száma, százalékos aránya a bakteriológiai vizsgálatra küldött minták számához viszonyítva

5.1.2. A tenyésztéssel igazolt gonorrhoeás nők és férfiak kor szerinti eloszlása

5 év adatai alapján a tenyésztéssel igazolt fertőzöttek 85,4%-a férfi, 14,6%-a nő volt (3. táblázat, 15. ábra). A férfiak kb. 74%-a 20 és 40 év közötti, míg a nők esetén ez kb. 67%. Nők esetén a 20 éves kor alatti fertőzöttség aránya magasabb. Míg férfiaknál későbbi életkorban is jellemző volt a fertőzés megjelenése.

3. táblázat: 2010 és 2014 között, gonorrhoeával diagnosztizált betegek eloszlása nem és kor szerint

Kor	Férfi	Nő
11-20	53	21
21-30	267	49
31-40	224	27
41-50	87	10
51-60	20	6
61-70	6	0
71-80	4	0
Összesen	661	113



15. ábra: 2010 és 2014 között gonorrhoeával diagnosztizált betegek eloszlása nem és kor szerint

5.1.3. Pozitív tenyésztések eloszlása anatómiai lokalizáció és nem szerint

2010 és 2013 között, a beérkező pozitív tenyésztések esetén vizsgáltuk az anatómiai lokalizáció szerinti eloszlást. Férfiak estében a minták 80%-a az urethraból származott, 4%-a a pharynxból, 16%-ban pedig a rectumból. Nők esetén a minták nagyobb része a cervixből (62%), kisebb része az urethrából (20%), ill. az anusból és a pharynxból volt kimutatható (8-8%). A mintavétel nők esetében gyakrabban multiplex lokalizációjú fertőzést mutatott, általában cervicitis és urethritis együttesen fordult elő, de akár ezek mellett az anorectum vagy pharynx fertőzése is fennállhatott. Speciális esetben conjunctiva fertőzését is megfigyeltük, ami a genitális váladék autoinokulációjával alakulhat ki (4. táblázat).

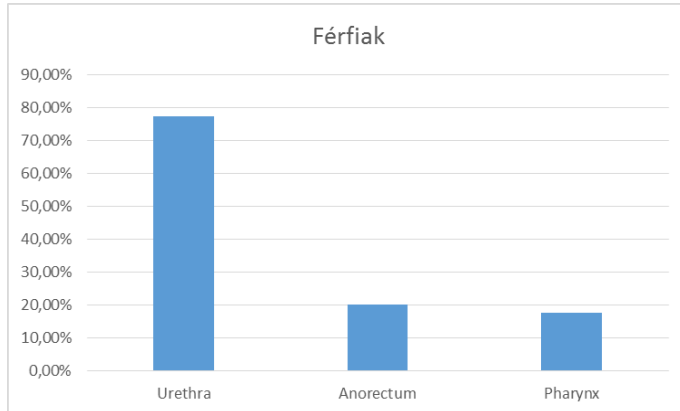
4. táblázat: A fertőzés anatómiai hely szerinti megoszlása nők és férfiak esetén 2010 és 2013 között

Mintavétel helye	Férfiak esetében a minta mennyisége		Nők esetében a minta mennyisége	
	db	%	db	%
Cervix	-	-	77	61,6
Pharynx	22	4,02	11	8,08
Rectum	88	16,06	10	8,00
Urethra	437	79,74	27	21,6
Conjunctiva	1	0,18	0	0,00
Összesen	548	100,00	125	100,00

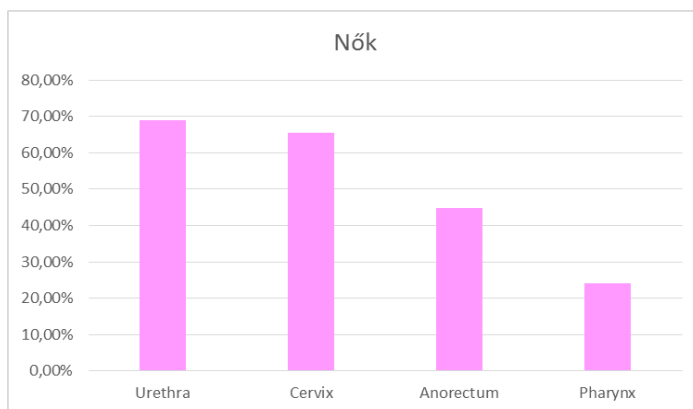
2014-ben pedig azt vizsgáltam, hogy a férfiak, ill. nők hány százalékának van urethra, pharynx, anorectum fertőzése. A gonorrhoeás férfiak esetén az urethrából vett bakteriológiai minták 77%-a volt pozitív. 20%-ukban az anorectum, 18%-ukban pedig a pharynx fertőzése igazolódott. Nőkben leggyakoribb a cervicitis (65,5%) és az urethritis (68,9%) megjelenése. Az anorectum fertőzöttsége is gyakori, 44,8%. A pharynx fertőzés megjelenése pedig 25%-os volt. (5. táblázat, 16-17. ábra).

5. táblázat: A fertőzés anatómiai lokalizáció szerinti megoszlása 2014-ben

Minta	Férfiak (%)	Nők (%)
Urethra	77,3%	68,9%
Cervix	-	65,5%
Anorectum	20,2%	44,8%
Pharynx	17,8%	24,1%



16. ábra: Férfiak fertőzésének anatómiai lokalizációja 2014-ben



17. ábra: Nők fertőzésének anatómiai lokalizációja 2014-ben

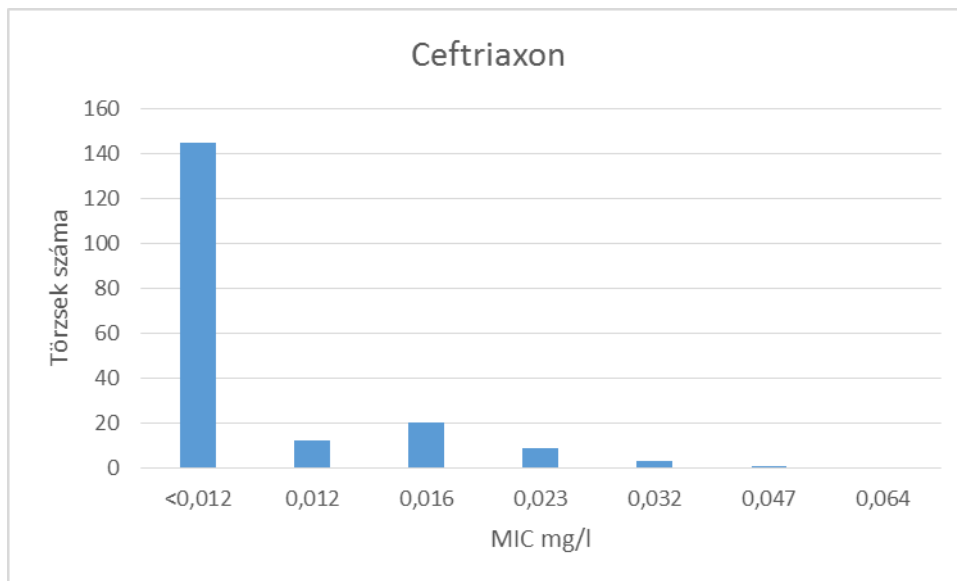
5.1.4. Antibiotikum-rezisztencia alakulása az elmúlt 5 évben

Az adatokat összefoglalva a következő táblázat szemlélteti:

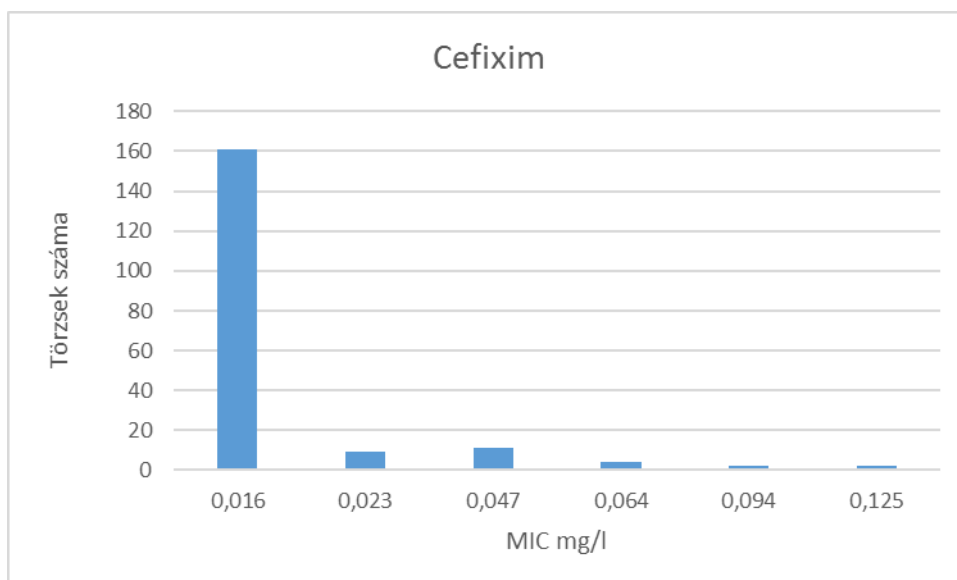
6. táblázat: Rezisztens törzsek aránya 2010 és 2014 között

Antibiotikum	Rezisztencia (%)				
	2010	2011	2012	2013	2014
Azithromycin	0,0	0,8	6,9	15,9	30,0
Cefixim	0,0	0,0	0,0	0,5	1,6
Ceftriaxon	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Ciprofloxacín	70,5	61,7	64,6	67,2	39,8
Penicillin	75,4	76,2	77,3	79,5	-
Spectinomycin	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Tetracyclin	88,1	87,5	82,9	85,5	70,0

Látható, hogy spectinomycin, ill. ceftriaxon-rezisztens törzs nem fordult elő. Csökkentnek tekintetem a ceftriaxon-érzékenységet $MIC \geq 0,012 \text{ mg/l}$ értéktől. Ebbe a tartományba a törzsek 18,4%-a tartozott 2014-ben. Csökkent cefixim-érzékenységet $MIC \geq 0,025 \text{ mg/l}$ -től számítottam. Ez utóbbi a törzsek 10%-ára volt jellemző. (A rezisztenciát mindkét antibiotikum esetében: $MIC > 0,12 \text{ mg/l}$ -től számítjuk [126, 148].) Cefixim-rezisztens törzsek 2013-tól jelentek meg. A cefixim és ceftriaxon MIC értékek megoszlását a következő diagramok szemléltetik (18-19. ábra):



18. ábra: Ceftriaxon MIC értékek 2014-ben



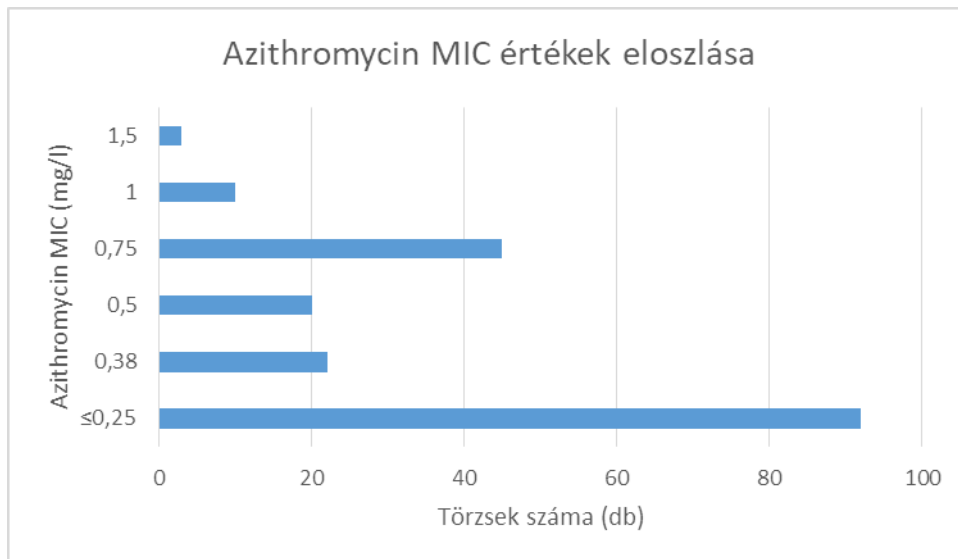
19. ábra: Cefixim MIC értékek 2014-ben

5.1.5. A 2014-ben megjelenő azithromycin-rezisztens törzsek elemzése

Mivel a 2014-es évben az azithromycin-rezisztens törzsek mennyisége 30%-ra emelkedett, nagyobb hangsúlyt helyeztem ezek vizsgálatára. Az EUCAST ajánlás szerint 0,25mg/l-es MIC felett csökken a törzsek érzékenysége. 0,5mg/l-nél nagyobb MIC esetén rezisztensnek tekinti a törzseket. Mivel az EUCAST nem definiálja a két érték közötti tartományt, ezért a laboratóriumunk mérsékelten rezisztensnek nevezi az ide sorolható törzseket. Összességében tehát a törzsek 52%-a mutat csökkent érzékenységet azithromycinre. Ebből 30,0% a rezisztens és 22,0% a mérsékelten rezisztens törzsek százaléka.

A nő és férfi arány ebben az esetben 1:7,3, ami kismértékben eltér az egész betegpopulációtól, mivel ez esetben 1 aránylik az 5,6-hoz. A medián életkor 33,6 év.

1 mg/l feletti MIC értékkel rendelkező törzsek az azithromycin-rezisztens törzsek 22,4%-át, míg az összes gonococcus 7%-át adták (20. ábra).

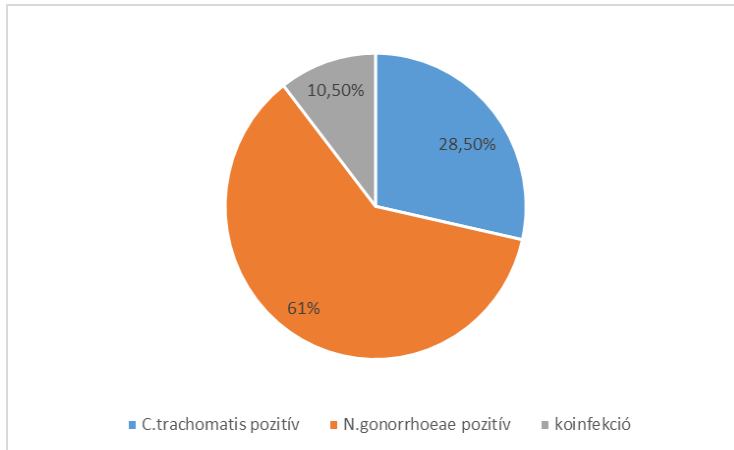


20. ábra: Azithromycin MIC értékek 2014-ben

5.1.6. A *Chlamydia trachomatis* infekció megjelenése

2014-es évben az STD ambulanciáról multiplex RT-PCR vizsgálatra érkező mintákat *N. gonorrhoeae* mellett *C. trachomatis*ra, *Mycoplasma hominis* és *genitalium*ra, *Ureaplasma ureolyticum* és *parvum*ra, valamint a *Trichomonas vaginalis*ra is vizsgálták. Így képet kaptunk a gonorrhoea és chlamydia fertőzés együttes előfordulásáról.

A multiplex RT-PCR vizsgálatok alapján azt találtuk, hogy a vizsgálati anyagok 6,7%-a volt *C. trachomatis* fertőzött, míg 12,2%-a volt gonorrhoeás. A *N. gonorrhoea* fertőzött esetek 14,7%-a volt *C. trachomatis* fertőzött, míg a chlamydiások 27% bizonyult gonorrhoeásnak. Az arányokat a következő kördiagram szemlélteti (21. ábra):



21. ábra: A Chlamydia és gonorrhoea infekciók megjelenése

5.2 Az NG-MAST módszerrel vizsgált törzsek eredményei

5.2.1. 2013-ban izolált, 52 NG-MAST módszerrel vizsgált törzs eredménye

Az általunk kiválasztott 52 törzs vizsgálatával sikerült 44 ST típust azonosítani az ng-mast weboldalon. 6 törzs esetében pedig olyan *porB* és *tbpB* allélokat találtunk, amiket ugyan már leírtak, de a kettő egymással való kombinációja még nem fordult elő. Ezen új kombinációk esetében a megfelelő ST számot az ng-mast weboldalra történő feltöltés után kaptuk meg: ST10083 és 10088 közötti számok tartoznak ide. Két törzs esetében pedig új *porB* allélt azonosítottunk, ismert *tbpB* allélokkal kombinációban (ST 10081-10082).

Az 7. táblázat mutatja a szekvencia típusok előfordulási gyakoriságát és az adott ST-k esetében mért, EUCAST ajánlások szerint meghatározott rezisztencia adatokat. Rövidítések: É= érzékeny, R= rezisztens, M= emelkedett MIC érték (az EUCAST nem interpretálja mérsékelten érzékeny kategóriának).

7. táblázat: 2013-ban azonosított ST típusok előfordulási gyakorisága és antibiotikum-rezisztenciája

NG- MAST ST	Incidencia (%)	Antibiotikum-rezisztencia					
		Ciprofloxacin	Tetracylin	Specinomycin	Azithromycin	Cefixim	Ceftriaxon
2992	19,2	E	10% É, 90% R	E	30% E, 30% M, 40 % R	E	E
1407	17,3	R	R	E	22% E, 22% M, 56% R	89% É, 11% R	E
4995	17,3	R	R	E	78% E, 22% R	E	E
225	7,7	R	R	E	50% E, 50% R	E	E
8517	3,8	E	R	E	E	E	E
359	3,8	E	R	E	E	E	E
210	1,9	R	R	E	E	E	E
387	1,9	E	E	E	E	E	E
995	1,9	E	R	E	E	E	E
2212	1,9	R	R	E	E	E	E
2569	1,9	R	R	E	R	E	E
6155	1,9	E	R	E	E	E	E
8343	1,9	R	R	E	E	E	E
9901	1,9	E	E	E	E	E	E
10081	1,9	R	R	E	R	E	E
10082	1,9	R	R	E	E	E	E
10083	1,9	E	R	E	E	E	E
10084	1,9	R	R	E	E	E	E
10085	1,9	R	R	E	R	E	E
10086	1,9	E	R	E	E	E	E
10087	2	R	R	E	E	E	E
10088	2	E	E	E	E	E	E

A különböző ST-khez tartozó cefixim és ceftriaxon MIC értékeket a 8. táblázat mutatja. Csökkent cefixim-érzékenység: MIC $\geq 0,025$ mg/l, csökkent ceftriaxon-érzékenység: MIC $\geq 0,012$ mg/l, rezisztencia mindkét antibiotikum esetében: MIC $> 0,12$ mg/l [126, 148].

8. táblázat: A 2013-ban vizsgált 50 törzshöz tartozó cefixim és ceftriaxon MIC értékek

ST	Anti-biotikum	A törzsek száma (db) az adott MIC értékkel (mg/l)									
		$\leq 0,002$	$\leq 0,012$	$\leq 0,016$	0,019	0,023	0,0032	0,047	0,064	0,094	0,125
2992	CFM			10							
	CRO	10									
1407	CFM					2	1	3	1	1	1
	CRO	1	2	1		1	2	1	1		
4995	CFM			9							
	CRO	9									
225	CFM			1			1		1	1	
	CRO					3		1			
Egyéb ST-k	CFM			17	1	2	1	1			
	CRO	15	4	1					1 (ST210)		

5.2.2. 2014-ben izolált, 50 azithromycin-rezisztens törzs NG-MAST vizsgálat eredménye

Mivel jelentős mértékben növekedett a 2013-as és 2014-es évben az azithromycin-rezisztens törzsek aránya, ezért 2014-ben 50 azithromycinre csökkent érzékenységű törzset NG-MAST eljárással szekvencia tipizáltam. Az izolátumok vizsgálatával 40 ST típust sikerült az ng-mast weboldal segítségével azonosítani. 4 törzs esetén új kombinációban fordultak elő a *porB* és *tbpB* allélok, így ezek a törzsek új ST számot kaptak. Ugyancsak új ST számot kapott az a 6 törzs, melyek alléljainak szekvenciája új mutációkat tartalmazott. Ezek ST 11699 és 11708-as számmal kerültek feltöltésre az NG-MAST weboldalra. Összesen 34 különböző szekvencia típust azonosítottam.

A következő táblázatok foglalják össze a kísérlet eredményeit, a szekvencia típusok gyakoriságát és az adott törzsekhez tartozó rezisztencia viszonyokat. A táblázat

nem tartalmazza a spectinomycin és ceftriaxon rezisztenciát, mivel minden törzs érzékeny volt ezekre az antibiotikumokra. Rövidítések jelentése a következő: É= érzékeny, R= rezisztens, M= emelkedett MIC értékű, mérsékelten rezisztens törzs, CIP= ciprofloxacín, T= tetracyclin, CFM= cefixim.

9. táblázat: 2014-ben izolált, a 6 leggyakoribb ST és rezisztencia-értékük

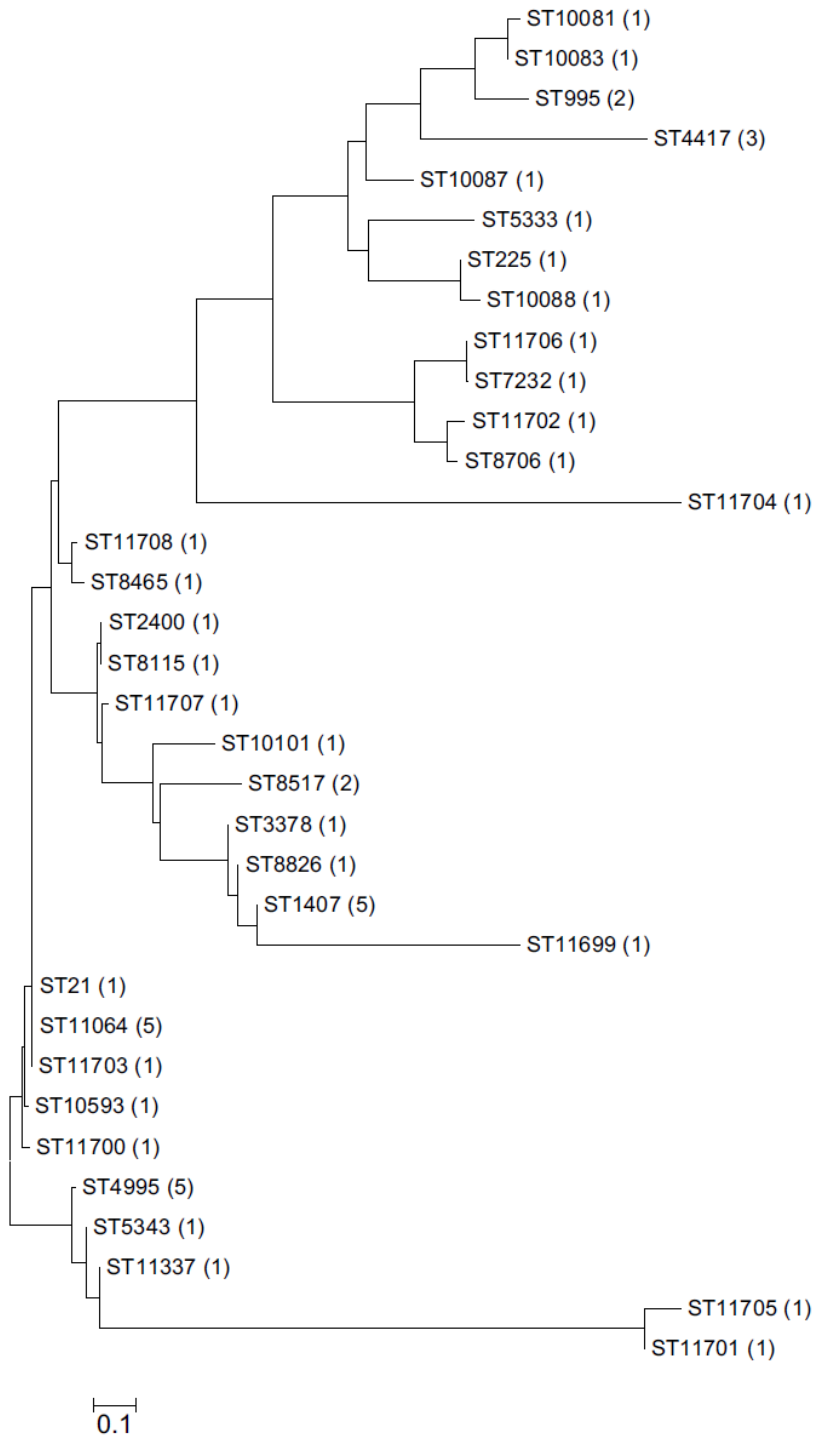
ST szám	Előfordulás		Rezisztencia			Ffi:nő
	db	%	CIP	T	CFM	
1407	5	10	R (magas MIC)	R (alacsony MIC)	1db R, 4db É	3:2
4995	5	10	R (alacsony MIC)	R (magas MIC)	É	4:1
11064	5	10	4É, 1R	R (alacsony MIC)	É	5:0
4417	3	6	É	É	É	2:1
995	2	4	1É; 1R	R	É	2:0
8517	2	4	É	R	É	2:0

10. táblázat: 50 azithromycin-rezisztens törzs *porB* és *tbpB* alléljai és rezisztenciája

ST	<i>porB</i> allél	<i>tbpB</i> allél	Törzsek száma (db)	Azithromycin-érzékenység	
				Mérsékeltlen érzékeny (db)	Rezisztens (db)
10081	5921	29	1	1	-
10083	3031	29	1	1	-
995	28	29	2	-	2
4417	2707	894	3	1	2
10087	35	29	1	-	1
5333	3229	137	1	-	1
225	4	4	1	-	1
10088	2700	4	1	1	-
11706	1183	1388	1	-	1
7232	1489	1388	1	-	1
11702	6870	1582	1	1	-
8706	35	1582	1	1	-
11704	6871	2003	1	-	1
11708	1183	18	1	-	1
8465	4864	18	1	-	1
2400	1489	563	1	-	1
8115	3942	563	1	-	1
11707	4864	563	1	-	1
10101	4160	110	1	1	-
8517	1142	1531	2	1	1
3378	2043	110	1	1	-
8826	5213	110	1	-	1
1407	908	110	5	2	3
11699	6867	138	1	1	-
21	14	33	1	-	1
11064	14	1131	5	2	3
11703	1582	1131	1	1	-
10593	581	1131	1	1	-
11700	6868	1131	1	1	-
4995	3031	33	5	3	2
5343	6195	1131	1	-	1
11337	6630	1131	1	-	1
11705	6872	2004	1	1	-
11701	6869	1131	1	-	1
Σ			50	21	29

5.2.3. Filogenetiki vizsgálatok

5.2.3.1. 2014-ben izolált ST-k esetén

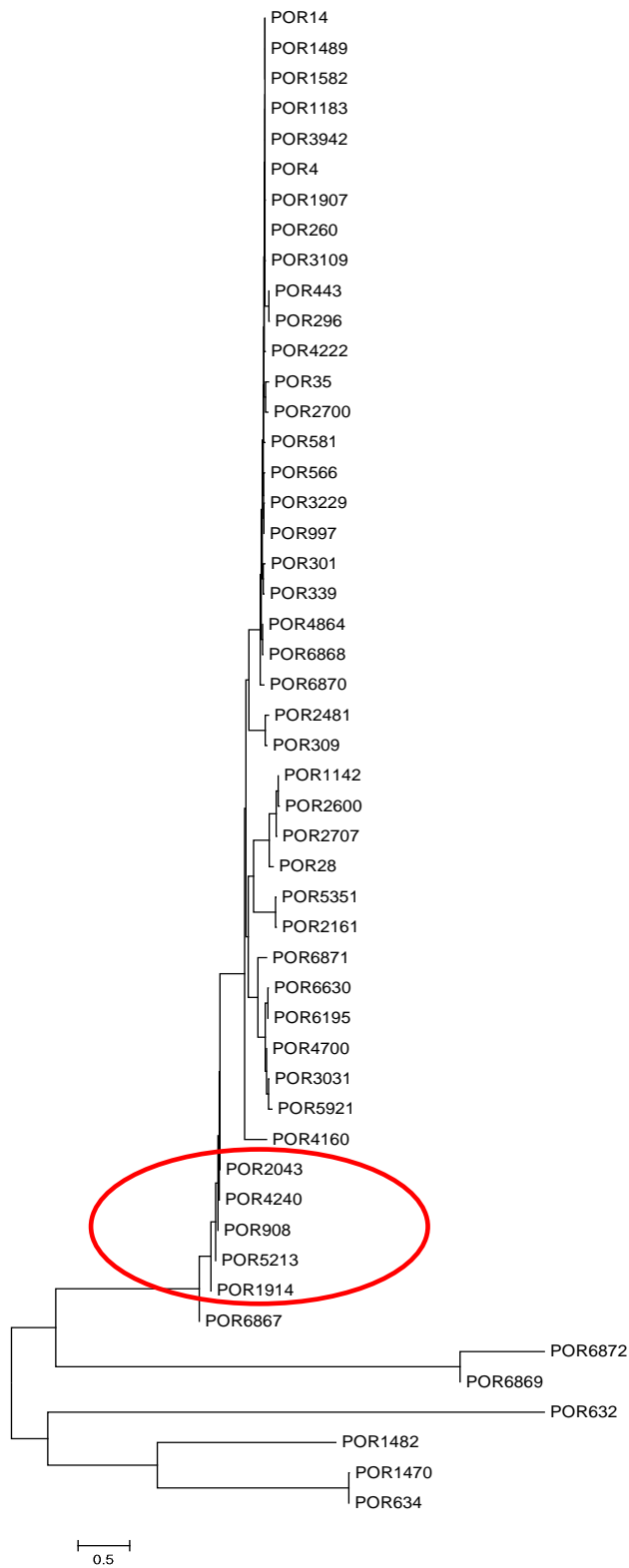


22. ábra: 50 azithromycin-rezisztens ST elemzésével készült filogenetikai fa, zárójelben a törzsek darabszáma

22. ábrán bemutatott filogenetikai fa alapján, az azithromycin-rezisztens és mérsékelt-rezisztens törzsek 3 nagy csoportra oszthatóak, a közeli rokonság szerint. A leggyakoribb ST-k közül az ST 4417 az első csoportba, az ST 1407-es a második csoportba, míg az ST 4995 és az ST 11064-et a harmadik csoport tartalmazza. Minimum 96%-os hasonlóság volt kimutatható a harmadik csoport összes tagja között. 99%-os hasonlóságot tapasztaltunk az ST 21, ST 11064 és ST 11703 között. 98% volt a hasonlóság az ST 11703 és az ST 10593, ill. az ST 10593 és az ST 11700-as között, de csak 97% az ST 11700 és az ST 11703 között. Az utóbbi kettővel pedig az ST 4995-ös 96%-os azonosságot mutatott. Az ST 4995-ös, ill. az ST 5343 és ST 11337 között szintén csak 97%-os hasonlóságot észleltünk. Az ST 1407, ST 3378, ST 8826 közti hasonlóság 99%-os.

5.2.3.2. 2013-ban és 2014-ben Magyarországon és külföldön izolált ST-k esetén

Tekintettel a *porB* allélok diverzitására, összevetettük az azithromycin-rezisztens, külföldön, Japánban (por 908, 4240, 4, 2481, 4222), Kanadában (por 1914, 581, 3109, 4, 339, 4700, 5351, 2161, 260), Olaszországban (por 1470, 443, 634, 301, 1470, 1907, 632, 296, 309, 997, 566, 1482), valamint az általunk izolált 2013-as, 2014-es (por 908, 4, 581, 443 és a maradék 26 darab) törzsek *porB* alléljait (23. ábra) [98, 105, 106]. A filogenetikai fa alsó részén látható, hogy a por 908 és a hozzá közelálló allélok a világ többi részén is sikeresen megjelentek (Japán, Kanada, Magyarország), és az azithromycin-rezisztencia terjedéséhez járulhatnak hozzá.



23. ábra: Japánban, Kanadában, Olaszországban, valamint az általunk izolált 2013-as, 2014-es törzsek *porB* alléljainak filogenetikai elemzése

6. Megbeszélés

6.1. A gonorrhoeás nők és férfiak kor szerinti eloszlása

A tenyésztések alapján 5-ször több a fertőzött férfi, mint a nő. Ennek egyik oka lehet, hogy szélesedik az MSM-ek, azaz homoszexuális férfiak csoportja. A másik feltételezhető ok, hogy az akut fertőzés a férfiak kb. 90%-ában kifejezett tünetekkel, gennyes húgycsőfolyással jár, míg nők esetén több mint 70%-ban tünetszegény, így rejtve marad a betegség, ami idővel krónikus folyamattá alakulhat [19,34,36,38].

6.2. Az infekció megjelenése a különböző anatómiai lokalizációkban

A 4. táblázat szerint a férfiaktól vett minták között az urethrából (80%) tenyésztett ki leggyakrabban baktérium, majd a rectumból (16%), s végül a pharynxból (4%). Nők esetén a cervixből (62%), urethrából (22%), majd a rectumból (8%), és a pharynxból (9%). Az 5 év alatt egyszer conjunctivitis is előfordult, ami valószínűsíthetően a genitális váladék autoinokulációjával magyarázható.

Az 5. táblázat alapján 2014-ben, férfiak esetén az urethrából vett bakteriológiai minták 77%-a volt pozitív. 20%-ukban az anorectum, 18%-ukban pedig az pharynx infekciója igazolódott, amit az MSM csoport növekedésével lehet magyarázni. A anorectum és a pharynx fertőzése 90%-ban tünetmentesen zajlik. Nőkben leggyakoribb a cervicitis (65,5%) és az urethritis (68,9%) megjelenése. Az anorectum fertőzöttsége is gyakori, 44,8%, amit a hüvelyből kifolyó váladék, ill anogenitális érintkezés magyaráz. A pharynx infekció megjelenése 25%-os. Nők esetén gyakoribb a többszörös fertőzés, ami rendszerint a cervix és az urethra párhuzamos fertőzésével jár, de ezek mellett akár proctitis vagy pharyngitis is megfigyelhető.

Rezisztencia terjedésének szempontjából a pharynx és a rectum fertőzése a legfontosabb, mivel a fertőzés aszimptomatikusan zajlik és a jelenlévő apatogén *Neisseriák*, mint a rezisztencia-gének rezervoárjai, átadhatják a géneket a *Neisseria gonorrhoeae* törzseknek. Ugyanakkor a diagnózis felállítása sem egyszerű a pharynxban, mivel a tenyésztés gyakran álnegatív [38, 66], míg az NAAT vizsgálatok korlátolt értékelhetőségűek az apatogén *Neisseriák* jelenléte miatt. Egyes

antibiotikumok, így a cefixim, spectinomycin nem érnek el kellő koncentrációt a pharynxban, s az aszimptomatikusan zajló fertőzés miatt, az egyén tünetmentes hordozóvá válhat („néma járvány”).

6.3. Antibiotikum-rezisztencia alakulása az elmúlt 5 évben

Ahogy a 6. táblázatból leolvasható a penicillin-és tetracyclin-rezisztencia 70-80% között mozgott az elmúlt években. A ciprofloxacin-rezisztencia 60 és 70% között alakult 2010 és 2013 között, 2014-re 40%-ra csökkent. A magasabb ciprofloxacin-rezisztenciát a fluorokinolonok további használata okozhatja, a csökkenést pedig az antibiotikum-használat felfüggesztése. Fluorokinolonok elhagyása után a rezisztencia csökkenését tapasztalták San Franciscóban is, párhuzamosan az USA területén használt guideline-ok megváltoztatásával [152]. A rezisztencia-adatokból következik, hogy penicillin, ciprofloxacin, tetracyclin empirikus terápiában nem alkalmazható. Ezt különösen a ciprofloxacin esetén kell hangsúlyozni, amely a 2002-es módszertani levélben még szerepel.

Ami a cefixim-rezisztenciát illeti, 1 év alatt 1,5%-ra emelkedett. Spectinomycin-és ceftriaxon-rezisztens törzs nem volt, ami biztató a jövőre nézve. Azonban a spectinomycin használatát korlátozza a spectinomycin-rezisztencia gyors kifejlődési lehetősége, ill. csökkent hatékonysága a pharynx fertőzésben.

A rezisztencia folyamatos terjedése mellett a diagnosztikában nem szabad megelégedni a Gram-festéssel végzett mikroszkópos vizsgálattal, illetve nukleinsav-amplifikációs tesztekkel, hanem szükséges a tenyésztés készítése a diagnózis alkotásakor, hiszen csak így követhetjük a rezisztencia-viszonyok alakulását. Az antibiotikum-rezisztencia ismerete a beteg szintjén gyors gyógyulást, célzott terápiát biztosít, míg a lakosság szintjén pedig lehetővé teszi a rezisztencia terjedésének követését, empirikus terápiák alkotását. Ez az elve a WHO által megfogalmazott és világszerte működő GASP (Gonococcal Antimicrobial Surveillance Programme) programoknak is.

Mivel a rezisztencia-vizsgálat nem elérhető minden rendelőben, ezért eddig empirikus terápiában az európai ajánlás követését javasolták. Azonban az azithromycin-rezisztencia jelentős, kétszeres emelkedése miatt ez megkérdőjelezhető.

6.4. A 2014-ben megjelenő, azithromycin-rezisztens törzsek elemzése

Azithromycin-rezisztens törzsek esetében a férfiak aránya nagyobb volt (1:7), mint a nőké, az egész betegpopulációhoz képest (1:5,6). Ez valószínűsíthetően azzal magyarázható, hogy az MSM-ek között magasabb az azithromycin-rezisztencia aránya [52,106].

Emellett az azithromycin-rezisztencia is folyamatosan emelkedik. 2013-ban 15,9%-os, 2014-ben pedig már 30%-os volt a rezisztencia. Tehát egy év alatt mintegy megduplázódott az azithromycinre rezisztens törzsek száma, s ez szignifikáns emelkedés ($\chi^2 = 11.4437$, $P=0.000717$, $P < 0.001$). Összevetve a Euro-GASP adataival (2009:13%, 2010: 7%, 2011: 5,3%, 2012: 4,5%, 2013: 5,4%, 2014: 7,9%, 2015: 7,1%), 2012-től Európában és Magyarországon is emelkedett a rezisztens törzsek százaléka, a kombinációs kezelés bevezetése után.

Az emelkedő azithromycin-rezisztencia háttérében a gyakori azithromycin-használatot feltételezzük. Egy Hollandiában végzett 2017-es vizsgálat szerint szignifikáns összefüggés van az STD betegségek diagnosztizálása előtti 30 napban alkalmazott azithromycin-terápia és a MIC értékek emelkedése, ill. az *mtrR* mutációk megjelenése között. Egy Svájcban végzett, 2016-os tanulmány az antibiotikum-rezisztencia kialakulásának legnagyobb kockázati tényezőjeként szintén az adott antibiotikumnak való kitettséget jelöli meg [153]. Az Európai Antibiotikum-felhasználási Felügyelet (ESAC) 2015-ös, magyarországi adatai szerint a járóbeteg antibiotikum-fogyasztás definiált napi dózisa (DDD=defined daily doses) 1000 lakosra számítva 16-os értéket ért el. Ezt a számot feloszthatjuk nagyobb antibiotikum-csoportokra. Első helyen a penicillinek szerepelnek (DDD=7,19). Makrolidokra a második helyen (DDD=2,94), ill. cephalosporinokra a harmadik helyen kerül sor (DDD=2,13) [154]. Tehát a makrolidok a második leggyakrabban használt antibiotikumok Magyarországon a járóbeteg ellátásban. Így elképzelhető, hogy a betegeket azithromycinnel kezelték a gonorrhoea betegséget megelőzően. Ilyenkor a pharynxban és anusban az apatogén, kommenzális *Neisseriák* rezisztencia-mechanizmusokat akvirálhatnak, és rezisztencia gének rezervoárjaivá válhatnak.

Tekintettel a WHO által kiadott ajánlásra, mely szerint egy antibiotikumot nem javasolhatunk, ha a *Neisseria gonorrhoeae* törzsek több mint 5%-a rezisztens, az azithromycin használata a továbbiakban megfontolandó. Hasonló következtetésre

jutottak 2014-ben, Németországban, ahol az azithromycin-rezisztencia 6%-ra emelkedett. (Mivel spectinomycin Németországban nem elérhető, így csak a cefiximet és a ceftriaxont tekintik megfelelő empirikus kezelésnek gonorrhoea esetén [155].) A WHO 2016-os ajánlása szerint a regionális antibiotikum-rezisztencia ismeretében, ceftriaxon monoterápiában alkalmazható gonorrhoea kezelésére.

6.5. A *Chlamydia trachomatis* fertőzés megjelenése

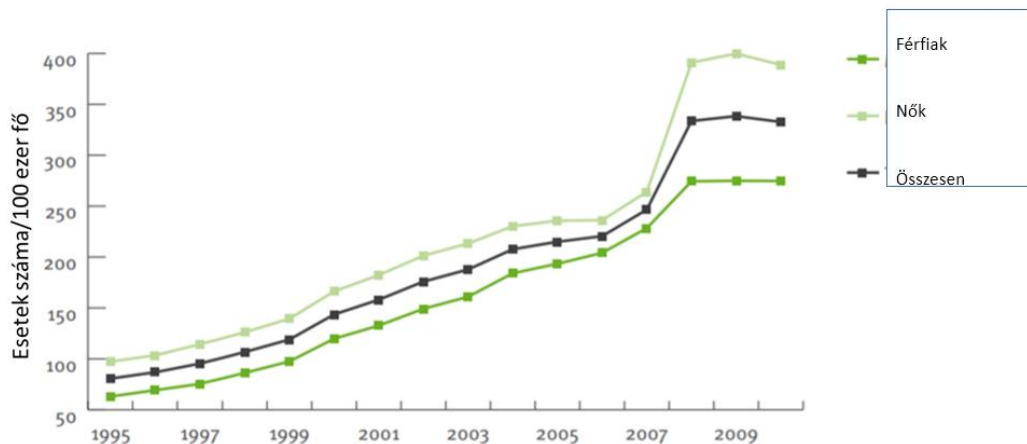
Mivel a *C. trachomatis* fertőzés kezelése azithromycinnel történik, és a 2012-es európai ajánlás szerint 30 éves kor alatt a koinfekció gyakori, a terápiaiban a ceftriaxon azithromycinnel való kiegészítését javasolják. Mivel Magyarországon az utóbbi években az azithromycin-rezisztencia emelkedett, ezért szükségesnek láttuk ennek a megállapításnak a magyar vonatkozásait is vizsgálni.

Az Epiinfo adatai szerint 2010 és 2014 között a fertőzés a bejelentések alapján folyamatosan emelkedett, majd 2015-ben 14%-kal csökkent:

- 2010-ben 710,
- 2011-ben 858,
- 2012-ben 1060,
- 2013-ben 1130,
- 2014-ben 1121,
- majd 2015-ben pedig 965 esetet jelentettek [20-33].

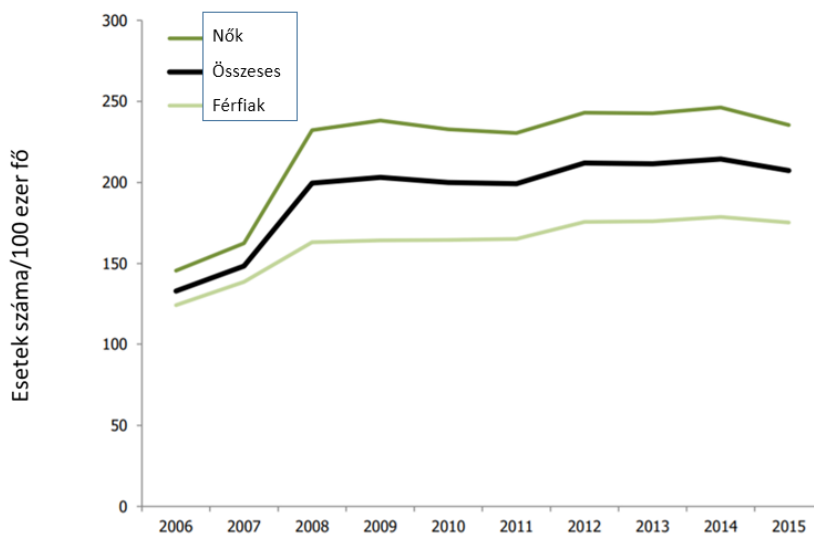
2012 óta pedig egy-egy eset erejéig megjelent az LGV, azaz lymphogranuloma venerum fertőzés is, amelynek az előfordulása egyébként trópusi területeken jellemző. Az általunk tapasztalt 6,7%-os előfordulás megegyezik az Országos Epidemiológiai Központ 2009-ben kiadott felmérésében szereplő adatokkal, ahol nagykockázatú csoporton belül, prostituáltakat vizsgálva, 6,6%-ban találták meg a fertőzés megjelenését [156].

Az ECDC 1990 és 2010 között végzett felmérései szerint a chlamydia fertőzés incidenciája folyamatosan emelkedést mutatott, s a leggyakoribb STD betegség Európában. 2008-tól relatíve állandó értékeket jelentettek (24-25. ábra).



24. ábra: A *C.trachomatis* infekció incidenciája 1990 és 2010 között.

Forrás: European Centre for Disease Prevention and Control. Sexually transmitted infections in Europe 1990–2010. Stockholm: ECDC; 2012.



25. ábra: 100 ezer főre eső chlamydiás esetek száma 2006 és 2015 között.

Forrás: European Centre for Disease Prevention and Control. Chlamydia. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2015. Stockholm: ECDC; 2017.

1990-ben 100 chlamydiás fertőzés jutott 100ezer főre, ami 2000-re 143, 2011-re pedig 175, 2014-ben pedig 187 esetre emelkedett [17]. A számok jelentős növekedését nemcsak a fertőzés terjedése, hanem a diagnosztika fejlődésével, széleskörű szűrőprogramok bevezetésével lehet magyarázni [15,17]. A legfrissebb, 2015-ös évről szóló adatok szerint közel 394ezer fertőzést jelentettek 27 országból, ami kb. 5,6-

szorosa a gonorrhoeás bejelentéseknek. Utóbbi 70 056 esetet jelent 2015-ben. Magyarországon az OEK adatai alapján több gonorrhoeás esetet jelentettek, mint chlamydiásat (11. táblázat).

11. táblázat: Az OEK 2010 és 2014 között közétett adatai

Év	Gonorrhoea (fő)	Chlamydia (fő)
2010	1170	701
2011	1369	858
2012	1487	1060
2013	1526	1130
2014	1620	1121

A magyar értékekhez hasonlóan, Németországban végzett vizsgálatok szerint a *N. gonorrhoea* fertőzött esetek 12,7%-a volt *C. trachomatis* fertőzött [157]. Magyarországon ez 14,7% volt 2014-ben, míg Nagy-Britanniában 2008-ban 35-41%-ot mértek [47]. A Euro-GASP 2015-ben a gonorrhoeás esetek 19%-ában írt le *C. trachomatis* fertőzést [83]. Egy 2006 és 2013 közötti szingapúri felmérés szerint 15 és 19 év közöttiekben a chlamydia és gonorrhoea koinfekciója 10%-os [14]. Míg 2003-ban kiadott, londoni felmérés szerint ugyanebben a korosztályban a nők több mint fele, a férfiak pedig negyede koinfekcióban szenvedett, tehát a magas százalékok miatt javasolták a chlamydia kezelését gonorrhoeás esetekben [13].

Tehát a koinfekciók aránya laboratóriumunk adatai alapján alacsonyabb, mint Nagy-Britanniában, s ez megkérdőjelezi a kombinációs kezelés szükségességét.

6.6. NG-MAST vizsgálati eredmények kiértékelése

6.6.1. 2013-as 52 törzs szekvencia-tipizálása

A leggyakoribb szekvencia típusú törzsek az ST 2992, ST 1407, ST 4995 és ST 225 voltak, 19,2%, 17,3%, 17,3% és 7,7%-os gyakorisággal. Emellett izoláltunk még ST 359-es és ST 8517-es típusba tartozó törzseket is 3,8-3,8 %-ban. A többi ST típusból 1-1 darabot találtunk, így összesen 22 különböző ST-t sikerült azonosítani.

A vizsgálati anyagunkban legnagyobb számban (19,2%-ban) előforduló ST 2992 a Euro-GASP 2010-es évi adatai alapján Európában a második leggyakoribb törzs volt,

és 7%-ban fordult elő [5]. Laboratóriumunkban végzett vizsgálatok szerint 90%-ban rezisztens tetracyclinre és 40%-ban rezisztens azithromycinre, míg ciprofloxacinra érzékeny. Cefiximre, ceftriaxonra nézve alacsony MIC értékekkel bír (CFM MIC: 0,016mg/l és CRO MIC: 0,002mg/l).

Az Európában legelterjedtebb, a Euro-GASP adatai alapján 2010-ben 16%-ban fellelhető, multirezisztens ST 1407 vizsgálatainkban is magas arányt ért el, szám szerint 17,3%-ot. A 2010-es Euro-GASP felmérésben leírták, hogy ez az a törzs, amelyikhez a legtöbb terápiás kudarc köthető, mivel rezisztens ciprofloxacinra, csökkent érzékenységgű cefiximre, és emelkedett MIC értékkel bír azithromycinnel és ceftriaxonnal szemben. Az általunk megvizsgált 9db ST 1407-es törzs 56%-ban már rezisztens azithromycinre, és 22%-ban pedig mérsékelten érzékeny rá, míg tetracyclinre és ciprofloxacinra 100%-os rezisztenciát mutat. Cefiximre a rezisztens tartományban 1 törzset izoláltunk. Az ST 1407 67%-a mutat csökkent érzékenységet cefiximre ($MIC \geq 0,025 \text{mg/l}$), míg 89%-a pedig ceftriaxonra ($MIC \geq 0,012 \text{mg/l}$). Ahogy már Franciaországban leírták, ez az a szekvencia típus, amelyik egyetlen további mutációval a *penA* génen magas szintű rezisztenciát fejleszt ki, cefiximre és ceftriaxonra egyszerre [125].

A vizsgálataink alapján a harmadik leggyakoribb szekvencia típus az ST 4995. Rezisztenciát mutatott ciprofloxacinra, tetracyclinre, és 22%-ban emelkedett MIC értéket mértünk azithromycinre. Míg emelkedett cefixim és ceftriaxon MIC értéket ez esetben nem mértünk. Kiemelném, hogy ugyan ezt a törzset leírták már (szerepelt az ng-mast adatbázisban), azonban ilyen gyakori előfordulásban még nem talákoztunk vele. Ráadásul a 2010-es Euro-GASP sem említi meg cikkében, annak ellenére, hogy egy nagy területet felölelő vizsgálat volt. Így felmerül a kérdés, hogy vajon ez a szekvencia típus egy újabban terjedő törzset takar, vagy esetleg ilyen nagy eltérések lehetnek Nyugat- és Közép-Európa között, amire esetleg eddig nem derült fény, mivel kevés az adat Közép-és Kelet-Európára nézve.

A negyedik leggyakoribb, 7,3%-ban előforduló szekvencia típus az ST 225 volt. Ez Európában hasonló százalékos arányok mellett (5%) a harmadik leggyakoribb ST a Euro-GASP 2010-es adatok alapján, ahol azt is leírják róla, hogy ciprofloxacin-rezisztens törzset takar. A méréseink szerint ezen túlmenően 100%-ig tetracyclin-

rezisztensek, és már 50%-ban azithromycin-rezisztensek. Ráadásul már a cefixim és ceftriaxon MIC értékeik is emelkedettek.

Összehasonlítva a Euro-GASP által, Magyarországról 2010-ben közétett adatokat, amiket 17 törzsből végeztek, a következőket állapíthatjuk meg. A Euro-GASP felmérése szerint a leggyakoribb ST az 5332 volt, míg az ST 1407 csak 12%-ban fordult elő, és ST 2992 és ST 225 nem is jelent meg. A jelenlegi kutatásban azonban ST 5332-t nem találtunk, az ST 1407 pedig nagyobb arányban szerepelt.

MIC értékekből az alábbi következtetéseket vonhattuk le a megszekvenált 52 törzs esetében. Cefixim és ceftriaxon MIC értékek között javarészt az alacsonyabb értékek gyakoribbak (8. táblázat). Cefixim esetén a MIC érték 70%-ban 0,016mg/l-es, míg ceftriaxonnál 58%-ban 0,002mg/l-es.

Emelkedett cefixim MIC értékek ($> 0,025\text{mg/l}$) ST 1407, ST 225 és ST 2212 típusokhoz tartoznak. Míg a magasabb ceftriaxon MIC értékek ($\geq 0,012\text{mg/l}$) ST 1407-hez, ST 225-höz, ST 2569-hez, ST 2212-höz és ST 210-hez tartoznak. Ciprofloxacinnál magasfokúnak tekintjük a rezisztenciát 32mg/l feletti MIC esetén [126]. Ilyen értékek jellemzőek ST 225-re és ST 1407-re. Tetracyclin esetén a magasfokú rezisztencia határát 16mg/l-es MIC-nél határozták meg [126]. Ez alapján magas rezisztenciát mértünk ST 4995-nél 89%-ban (8/9 törzs), ellenben ST 1407 és ST 225 esetén alacsony értékeket tapasztaltunk. Ebből pedig következtethetünk arra, hogy az utóbbi típusoknál a rezisztencia-mechanizmus kromozómán kódolt, ami a penicillin iránti érzékenységet is csökkenti az *mtr* és *penB* gén mutáció révén, előbbinél (ST 4995) pedig plazmidon kódolt.

Kísérletünkből látszik, hogy az emelkedett cefixim-, ceftriaxon- és azithromycin-rezisztenciával rendelkező ST 1407, ST 225 hazánkban is magas arányban fordulnak elő, így egyre nagyobb gondot okoz a megfelelő antibiotikum kiválasztása a kezelésre. A 2012-es európai ajánlás szerint elsőként választandó kezelés 1x500 mg ceftriaxon im. 2 g per os azithromycinnel kiegészítve. Azonban felmerül, hogy ez hosszú távon Magyarországon nem megbízható kezelési mód, mivel a négy leggyakoribb szekvencia típusba tartozó törzs 60%-a rezisztens azithromycinre.

6.6.2. A 2014-es, azithromycin-rezisztens szekvencia típusok eredményeinek megbeszélése

A kísérlet során a leggyakrabban előforduló azithromycin-rezisztens törzsek az ST 1407, ST 4995, ST 11064 voltak, melyek egyforma gyakorisággal, 10-10%-kal jelentek meg. 4%-os gyakorisággal izoláltuk az ST 995-öst, az ST 4417-est, az ST 8517-est. Összesen 34 különböző ST-t azonosítottunk az 50 törzs esetében.

Az első helyen 3 törzs áll egyforma gyakorisággal. Az ST 1407-es, mely Európában 16%-os megjelenéssel az első helyen áll, és 2013-as kísérleteink szerint is a 2. leggyakoribb Magyarországon. Magas cefixim és ciprofloxacín MIC értékekkel rendelkezik, tetracyclinre rezisztens. A legmagasabb azithromycin MIC értékeket is ezeknél az ST-knél mértük. Az ST 4995-ös szintén első helyen áll, magas tetracyclin és ciprofloxacín rezisztenciával, tehát továbbra is megőrizte vezető szerepét a magyarországi törzsek között. Az ST 11064-es törzset eddigi kutatások nem említik. Egy újonnan elterjedő törzs, melyet a megelőző évben végzett vizsgálatban sem azonosítottunk. Cefiximre, ciprofloxacínra is érzékeny. Az ST 1407 és 11064 esetén a tetracyclin MIC értékek alacsonyak. Ez utal arra, hogy kromoszómáisan öröklődő mutációról van szó.

6.6.3. Filogenetikai vizsgálatok

A hasonlósági fok szerint, a 22. ábrán látható filogenetikai fa alapján a szekvencia típusokat 3 nagy csoportra osztottuk. Az első csoportba tartozik az ST 4417, a másodikba az ST 1407, a harmadikba az ST 4995 és az ST 11064. Az utóbbi kettő képviseli a törzsek 20%-át, illetve mondhatjuk a 10. táblázat és a filogenetikai fa alapján, hogy a harmadik csoportba tartozó szekvencia típusok a törzsek 30%-át adják. A 2013-as év során, második leggyakoribb törzsként izolált ST 4995-ös ismételt gyakori előfordulása és megjelenése a harmadik csoportban arra utal, hogy ezek a szekvencia típusok sikeres törzsek, melyek a jövőben terápiás kudarcot is okozhatnak. Ha figyelembe vesszük a genocsoport definícióját, azaz egy közös allél mellett a másik allél 99%-os hasonlóságot mutat, akkor az ST 21, ST 11064 és az ST 11703 egy genocsoportba tartoznak. A leggyakoribb ST alapján a genocsoport 11064 nevet kapja [5].

A második csoportban található ST 1407, amelyről már korábban leírták, hogy jellemző rá a ciprofloxacin- és tetracyclin-rezisztencia, illetve a csökkent cephalosporin-érzékenység. Az ST1407-et alkotó *por* 908-as allél szoros kapcsolatban van a *por* 5213-mal, illetve a *por* 2043-mal, az ST 8826 és ST 3378 részeként. Ez a három szekvencia típus szintén egy genocsoportot alkot, mely nevét az 1407-es típusról kapta. Az ST 1407 és ST 3378 között 1 nukleotid különbség van, míg az ST 1407 és ST 8826 között 2 nukleotid különbség, az ST 3378 és az ST 8826 között pedig 3 nukleotid különbség. Ezen ST-eket a *tbpB* 110-es allél alkotja. Tekintettel arra, hogy ezekre a törzsekre jellemző az azithromycin-rezisztencia, feltételezhetjük, hogy a *por* 908-as allél sikeres allélnak tekinthető azithromycin-rezisztencia terjedése szempontjából. Mindezt megerősíti az, hogy a Japánban is elterjedt ST1407, az USA-ban megfigyelt ST 3709, ill. a Skóciában leírt ST 1503-as, melyek mind *tbpB* 110-es alléllal rendelkeznek, s azithromycin-rezisztensek, mind *por* 908-as allélhoz közel álló *por* allélt hordoznak. Ez mutatja, hogy a globálisan elterjedt ST 1407-es és az ahhoz kapcsolódó törzsek világszerte azithromycin-rezisztenciára tettek szert [98]. Egy kanadai vizsgálatban a leggyakoribbnak talált azithromycin-rezisztens szekvencia típus, az ST 3158 szintén *tbpB* 110 alléllal bír, és 1 nukleotid különbség van a *por* alléljában az ST 1407-től. A felsorolt törzsek közeli kapcsolatát mutatja be 23. ábra filogenetikai fája (ST 3158, ST 1407, ST 8826, ST 3378).

7. Következtetések

A tenyésztéssel azonosított *Neisseria gonorrhoeae* törzsek gyakoriságának, a nem és kor szerinti megoszlásának, rezisztencia-adatainak, illetve molekuláris vizsgálatának megteremtése lehetővé tette, hogy hazánkból származó új adatokkal egészítsük ki a meglévő nemzetközi eredményeket, hozzájárulva a *N. gonorrhoeae* nemzetközi kutatásához. Eredményeink részben egyeznek a nyugat-európai adatokkal, de új eredményeket is szolgáltatnak:

1. Vizsgálatainkkal sikerült képet kapni a *N.gonorrhoeae* pozitív tenyésztések arányáról (mikrobiológiai laboratóriumunk vizsgálati anyagában), fertőzés anatómiai megjelenéséről, nem és kor szerinti eloszlásáról, rezisztencia-adatokról.
2. Az elsőként választandó antibiotikumok rezisztenciájának emelkedésével felhívtuk a figyelmet az antibiotikum-rezisztencia vizsgálatok szükségességére a diagnosztikában.
3. Sikerült molekuláris vizsgálatokat (NG-MAST) bevezetni *N. gonorrhoeae* esetében a laboratóriumunkba, mellyel a hazánkban előforduló szekvencia típusok leírhatóak.
4. Elvégeztük az első olyan vizsgálatot hazánkban, mely a szekvencia típusok és a hozzájuk tartozó rezisztencia adatokat írta le.
5. 18 új szekvencia típust azonosítottunk, és töltöttünk fel az ng-mast adatbázisba.
6. A különböző szekvencia típusok megjelenése alapján, megállapítható volt, hogy a gyakori szekvencia típusok egy része megegyezik a nyugat-európai ST-vel (ST 1407, ST 225, ST 2992), kissé eltérő százalékban. Ugyanakkor hazánkban vannak eltérő, domináló szekvencia típusok is (ST 4995, ST 11064), melyeket a nemzetközi szakirodalom nem említ.
Filogenetikai vizsgálatokkal felhívtuk a figyelmet a sikeres azithromycin-rezisztens genocsoportokra.
7. A sikeres szekvencia típusok és a rezisztencia-adataik ismerete alapot nyújthat megfelelő, regionális empirikus terápiás ajánlások kidolgozásához.

8. Összefoglalás

A *Neisseria gonorrhoeae* okozta szexuális úton terjedő betegség (STD) az európai felmérések szerint a második leggyakoribb baktérium okozta STD. Az elmúlt 70-80 év alatt a gonococcusok a terápiába bevezetésre kerülő összes antibiotikum ellen kifejlesztettek rezisztencia-mechanizmusokat. Az aktuális elsőként választandó antibiotikumokra, a ceftriaxonra és azithromycinre rezisztens törzsek is megjelentek. Mindez előrevetít egy érárt, melyben nem áll rendelkezésre hatékony antibiotikum-terápia. Következésképpen számolni kell a szövődményekkel, mint pl. a kismencede gyulladáshos megbetegedése (PID), sterilitás, korai vetelés, méhen kívüli terhesség, neonatalis conjunctivitis okozta vakság, ill. a HIV-fertőzés disszeminációja.

Kutatásaim alatt a SE Bőr-, Nemikórtani és Bőronkológiai Klinika gonorrhoea törzseinek rezisztencia-adatait vizsgáltam. 2010 és 2014 között a cefixim- és azithromycin-rezisztens törzsek százaléka emelkedett. Emellett molekuláris tipizálások során 102 törzs NG-MAST tipizálását végeztük. 18 új szekvencia típust (ST-t) azonosítottunk. A módszerrel az adott földrajzi területen a leggyakrabban fertőzést okozó ST-k és rájuk jellemző antibiotikum-érzékenység ismeretében empirikusterápia-ajánlások alkothatóak. 2013-ban a négy leggyakoribb ST-hez tartozó törzs 60%-a volt rezisztens azithromycinre, ami az elsőként választandó kezelés részét képezi. 2014-ben 50 azithromycin-rezisztens törzset tipizáltunk. A szekvencia típusokból végzett filogenetikai vizsgálataink alapján elmondhatjuk, hogy az ST 1407-es törzsnek, ill. por 908-as alléljának és az ezekhez kapcsolt törzseknek jelentős szerepe van az azithromycin-rezisztencia terjesztésében. Az azithromycin-rezisztencia növekedésével felmerül, hogy a ceftriaxon és azithromycin kombinációja Magyarországon nem feltétlenül megbízható terápiás javaslat. Emellett szól, hogy szinergista hatást több vizsgálatban nem sikerült bizonyítani. Ölési görbe vizsgálatokban a kombináció kevésbé volt baktericid hatású, mint a ceftriaxon önmagában. A WHO nem javasolja egy antibiotikum használatát, ha a törzsek > 5%-a rezisztens az adott antibiotikumra. Ugyanakkor laboratóriumunkban a gonorrhoeás esetek koinfekciója chlamydiával 2014-ben csak 14,7%-os volt. Tekintettel a növekvő azithromycin rezisztenciára, ill. a további azithromycin rezisztencia kialakulásának megelőzésére, az azithromycin alkalmazását azokra az esetekre érdemes korlátozni, ahol ez elengedhetetlen, pl.: cephalosporinallergia, ill. igazolt *C.trachomatis* koinfekció.

8. Summary

Gonorrhoea, caused by *Neisseria gonorrhoeae*, is the second most common bacterial STI according to European surveys. During the last 70–80 years, the gonococcus has developed resistance to mainly all antimicrobials introduced for treatment, even for the the first-choice therapy. Ceftriaxone-and azithromycin-resistant strains have been isolated. This may herald an era of untreatable gonorrhoea. Consequently, this can result in several complications, such as pelvic inflammatory disease (PID), infertility, early abortion, ectopic pregnancy, neonatal conjunctivitis causing blindness or promoted transmission of HIV.

At the Department of Dermatology, Venereology and Dermatocology the distribution of antimicrobial resistance was observed. Between 2010 and 2014, the percentage of cefixime- and azithromycin-resistant strains increased. Besides, 102 strains were analysed by NG-MAST typing method. 18 new sequence types (STs) were identified. By identification of the most prevalent sequence types in a geographic region and by the knowledge of associated antimicrobial resistance phenotypes, empiric therapeutic regimens can be recommended. In 2013, 60% of the four most frequently isolated STs in Hungary were resistant to azithromycin which is one of the first-choice therapy for gonorrhoea. In 2014, 50 azithromycin-resistant strains were sequence typed. According to the phylogenic analysis of STs, ST 1407 and especially the por 908 allele have an important role in the dissemination of azithromycin resistance. The emergence of azithromycin resistance raises the question whether the combination therapy is appropriate treatment in the case of Hungary. Furthermore, there are studies which do not report in vitro synergy between ceftriaxone and azithromycin. In a time-kill experiment the dual therapy was less bactericidal than ceftriaxone alone. WHO recommended that an antimicrobial should not be used when >5% of the strains are resistant. Moreover, in our laboratory only 14.7% of the gonorrhoea-positive samples were co-infected with *C. trachomatis*. According to the emerging azithromycin resistance and to avoid the spread of further resistance, the use of azithromycin should be restricted to cases when its usage is definitely necessary, like cases co-infected with chlamydia or patients allergic to cephalosporins.

9. Irodalomjegyzék

1. World Health Organization. (2016) WHO guidelines for the treatment of *Neisseria gonorrhoeae*. WHO Document Production Services, Geneva, Switzerland, 1-55.
2. Tapsall J. (2001) Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. World Health Organisation (WHO), Geneva, Switzerland, 1-36.
3. Fifer H, Natarajan U, Jones L, Alexander S, Hughes G, Golparian D, Unemo M. (2016) Failure of Dual Antimicrobial Therapy in Treatment of Gonorrhea. *N Engl J Med*, 374 (25): 2504-6.
4. WHO, Department of Reproductive Health and Research. (2012) Global action plan to control the spread and impact of antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. Geneva, Switzerland, 1-32.
5. Chisholm SA, Unemo M, Quaye N, Johansson E, Cole MJ, Ison CA, Van De Laar MJ. (2013) Molecular epidemiological typing within the European Gonococcal Antimicrobial Resistance Surveillance Programme reveals predominance of a multidrug-resistant clone. *Euro Surveill*, 18 (3): 20358.
6. Unemo M, Dillon JA. (2011) Review and international recommendation of methods for typing *neisseria gonorrhoeae* isolates and their implications for improved knowledge of gonococcal epidemiology, treatment, and biology. *Clin Microbiol Rev*, 24 (3): 447-458.
7. Thakur SD, Levett PN, Horsman GB, Dillon JA. (2014) Molecular epidemiology of *Neisseria gonorrhoeae* isolates from Saskatchewan, Canada: utility of NG-MAST in predicting antimicrobial susceptibility regionally. *Sex Transm Infect*, 90: 297-302.
8. Horváth A. Dermatoinfektológia. STD-fertőzések. In: Dobozy A, Horváth A, Hunyadi J, Schneider I. *Bőrgyógyászat, Eklektikon Kiadó és Nyomdai Szolgáltató Kft.*, Budapest, 2004: 114-118.
9. No authors listed. (1955) Albert Neisser and the Gonococcus. *Am J Public Health Nations Health*, 45 (1):95-7.
10. Rowley J, Toskin I, Ndowa F. (2008) Global incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted infections, World Health Organization (WHO), Geneva, Switzerland, 1-19.

11. WHO. (2011) Prevalence and incidence of selected sexually transmitted infections, Chlamydia trachomatis, Neisseria gonorrhoeae, syphilis and Trichomonas vaginalis. Methods and results used by WHO to generate 2005 estimates. Geneva, Switzerland, 1-36.
12. Newman L, Rowley J, Vander Hoorn S, Wijesooriya NS, Unemo M, Low N, Stevens G, Gottlieb S, Kiarie J, Temmerman M. (2015) Global Estimates of the Prevalence and Incidence of Four Curable Sexually Transmitted Infections in 2012 Based on Systematic Review and Global Reporting. PLoS ONE, 10 (12): e0143304.
13. Creighton S, Tenant-Flowers M, Taylor CB, Miller R, Low N. (2003) Co-infection with gonorrhoea and chlamydia: how much is there and what does it mean? Int J STD AIDS, 14 (2):109-13.
14. Lim RB, Wong ML, Cook AR, Brun C, Chan RK, Sen P, Chio M. (2015) Determinants of Chlamydia, Gonorrhoea, and Coinfection in Heterosexual Adolescents Attending the National Public Sexually Transmitted Infection Clinic in Singapore. Sex Transm Dis, 42 (8):450-6.
15. European Centre for Disease Prevention and Control. (2012) Sexually transmitted infections in Europe, 1990-2010. Stockholm, ECDC, 13-50.
16. European Centre for Disease Prevention and Control. (2017) Gonorrhoea. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2015. Stockholm: ECDC, 1-9.
17. European Centre for Disease Prevention and Control. (2013) Annual Epidemiological Report 2013. Reporting on 2011 surveillance data and 2012 epidemic intelligence data. Stockholm: ECDC, 1-239.
18. European Centre for Disease Prevention and Control. (2016) Gonorrhoea. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2014. Stockholm: ECDC. Elérhető: <https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/gonorrhoea-annual-epidemiological-report-2016-2014-data>
19. Várkonyi V. Szexuális érintkezéssel közvetített fertőzések. In: Kárpáti S, Kemény L, Remenyik É. Bőrgyógyászat és venerológia, Medicina Könyvkiadó Zrt., Budapest, 2013: 161-164., 180-188.
20. Országos Epidemiológiai Központ. (2011) Szexuális úton terjedő betegségek Magyarországon. III. negyedév. Epiinfo, 3: 25-27.

21. Országos Epidemiológiai Központ. (2011) Szexuális úton terjedő betegségek Magyarországon. IV. negyedév. Epinfo, 11: 105-109.
22. Országos Epidemiológiai Központ. (2011) Szexuális úton terjedő betegségek-Magyarország. II. negyedév. Epinfo, 35: 409-414.
23. Országos Epidemiológiai Központ. (2012) Szexuális úton terjedő betegségek-Magyarország. IV. negyedév. Epinfo, 5: 53-57.
24. Országos Epidemiológiai Központ. (2012) Szexuális úton terjedő betegségek-Magyarország. II. negyedév. Epinfo, 33-34: 385-390.
25. Országos Epidemiológiai Központ. (2012) Szexuális úton terjedő betegségek-Magyarország. IV. negyedév. Epinfo, 4: 29-33
26. Országos Epidemiológiai Központ. (2012) Szexuális úton terjedő betegségek-Magyarország. I. negyedév. Epinfo, 19: 203-216.
27. Országos Epidemiológiai Központ. (2012) Szexuális úton terjedő betegségek-Magyarország. III. negyedév. Epinfo, 48: 557-563.
28. Országos Epidemiológiai Központ. (2013) Szexuális úton terjedő betegségek-Magyarország. I. negyedév. Epinfo, 26: 301-307.
29. Országos Epidemiológiai Központ. (2013) Szexuális úton terjedő betegségek-Magyarország. III. negyedév. Epinfo, 49: 545-551.
30. Országos Epidemiológiai Központ. (2013) Szexuális úton terjedő betegségek-Magyarország. II. negyedév. Epinfo, 38: 425-431.
31. Országos Epidemiológiai Központ. (2013) Szexuális úton terjedő betegségek-Magyarország. IV. negyedév. Epinfo, 5: 45-50.
32. Országos Epidemiológiai Központ. (2014) Szexuális úton terjedő betegségek-Magyarország. I. negyedév. Epinfo, 22: 249-256.
33. Országos Epidemiológiai Központ. (2016) Szexuális úton terjedő fertőzések, Magyarország, 2015. Epinfo, 19-20: 229-240.
34. Várkonyi V, Latkóczy K. Gonorrhoea. In: Várkonyi V. STD-atlasz gyakorló orvosoknak. Medicina Könyvkiadó Zrt., Budapest, 2006: 104-110.
35. Ádám É. Mikroorganizmusokkal szembeni védekezés. In: Ádám É: Mikrobiológia gyógyszerész- és fogorvostanhallgatók számára. Semmelweis Kiadó, Budapest, 2006: 103-129.

- 36.** Temesvári E, Daróczy J, Somlai B, Holló P, Marschalkó M. (2011) Bőrgyógyászati Útmutató. Bőrgyógyászati irányelvek és terápiás javaslatok/Klinikai Irányelvek Kézikönyve. Bőrgyógyászati Útmutató sorozat. Medition Kiadó, 8-35.
- 37.** Bőr-és Nemibetegségek Szakmai Kollégiuma. (2002) Módszertani levél a szexuális úton terjedő infekciók kivizsgálásához és kezeléséhez. Egészségügyi Közlöny, 52: 1509-1518.
- 38.** Bignell C, Unemo M. (2012) European Guideline on the Diagnosis and Treatment of Gonorrhoea in Adults. The International Union against Sexually Transmitted Infections (IUSTI), 1-24. Elérhető online: http://www.iusti.org/regions/Europe/pdf/2012/Gonorrhoea_2012.pdf
- 39.** Sherrard J, Barlow D. (1996) Gonorrhoea in men: clinical and diagnostic aspects. Genitourin Med, 72: 422-6.
- 40.** Országos Epidemiológiai Központ. (2012) A *Neisseria gonorrhoeae* antibiotikum-rezisztenciája az elmúlt években, Európában. Epiinfo, 29: 345-348.
- 41.** M Unemo and WM. Shafer. (2014) Antimicrobial Resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in the 21st Century: Past, Evolution, and Future. Clin Microbiol Rev, 27 (3): 587-613.
- 42.** Donà V, Low N, Golparian D, Unemo M. (2017) Recent advances in the development and use of molecular tests to predict antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. Expert Rev Mol Diagn, 17 (9): 845-859.
- 43.** Whiley DM, Trembizki E, Buckley C, Freeman K, Baird RW, Beaman M, Chen M, Donovan B, Kundu RL, Fairley CK, Guy R, Hogan T, Kaldor JM, Karimi M, Limnios A, Regan DG, Ryder N, Su JY, Ward J, Lahra MM. (2017) Molecular Antimicrobial Resistance Surveillance for *Neisseria gonorrhoeae*, Northern Territory, Australia. Emerg Infect Dis, 23 (9): 1478-1485.
- 44.** Eyre DW, De Silva D, Cole K, Peters J, Cole MJ, Grad YH, Demczuk W, Martin I, Mulvey MR, Crook DW, Walker AS, Peto TEA, Paul J. (2017) WGS to predict antibiotic MICs for *Neisseria gonorrhoeae*. J Antimicrob Chemother, 72 (7): 1937–1947.
- 45.** Bignell C, Garley J. (2010) Azithromycin in the treatment of infection with *Neisseria gonorrhoeae*. Sex Transm Infect, 86: 422-6.

46. Moran JS, Levine WC. (1995) Drugs of choice in the treatment of uncomplicated gonococcal infection. *Clin Infect Dis.* 20: 47-65.
47. GRASP 2010 Report. (2010) The Gonococcal Resistance to Antimicrobials Surveillance Programme. London. 1-24.
48. Furuya R, Nakayama H, Kanayama A, Saika T, Iyoda T, Tatewaki M, Matsuzaki K, Kobayashi I, Tanaka M. (2006) In vitro synergistic effects of double combinations of beta-lactams and azithromycin against clinical isolates of *Neisseria gonorrhoeae*. *J Infect Chemother*, 12: 172-6.
49. Golden M, Kerani R, Shafii T, Whittington W, Holmes K. (2009) Does azithromycin co-treatment enhance the efficacy of oral cephalosporins for pharyngeal gonorrhea? Presented at: 18th International Society for STD Research (ISSTD) Conference, London, UK.
50. C Bignell, M FitzGerald (Guideline Development Group). (2011) UK national guideline for the management of gonorrhoea in adults. *Int J STD AIDS*, 22 (10) : 541 – 547.
51. Tapsall JW, Schultz TR, Limnios EA, Donovan B, Lum G, Mulhall BP. (1998) Failure of azithromycin therapy in gonorrhoea and dis correlation with laboratory parameters. *Sex Trans Dis*, 25: 505-8.
52. Kirkcaldy RD, Soge O, Papp JR, Hook EW, III, del Rio C, Kubin G, Weinstock HS. (2015) Analysis of *Neisseria gonorrhoeae* azithromycin susceptibility in the United States by the Gonococcal Isolate Surveillance Project, 2005 to 2013. *Antimicrob Agents Chemother*, 59: 998–1003.
53. Kirkcaldy RD, Weinstock HS, Moore PC, Philip SS, Wiesenfeld HC, Papp JR, Kerndt PR, Johnson S, Ghanem KG, Hook EW. (2014) The Efficacy and Safety of Gentamicin Plus Azithromycin and Gemifloxacin Plus Azithromycin as Treatment of Uncomplicated Gonorrhea. *Clin Infect Dis*, 59 (8): 1083–1091.
54. Novalbos A, Sastre J, Cuesta J, De Las Heras M, Lluch-Bernal M, Bombín C, Quirce S. (2001) Lack of allergic cross-reactivity to cephalosporins among patients allergic to penicillins. *Clin Exp Allergy*, 31 (3):438-43.
55. Workowski KA, Bolan GA. (2015) Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR), Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines, 2015. 64: 1-137.

- 56.** Kimberly A, Workowski, Gail Bolan. (2014) Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines, 2014, 1-270.
- 57.** Australian Sexual Health Alliance (ASHA). (2015) Australian STI Management Guidelines. www.sti.guidelines.org.au/sexually-transmissible-infections/gonorrhoea
- 58.** Public Health Agency of Canada. (2013) Canadian Guidelines on Sexually Transmitted Infections. Gonococcal Infections Chapter. Elérhető: <https://www.canada.ca/en/public-health/services/publications/diseases-conditions/gonorrhoea-alternate-treatment.html>
- 59.** Lee H, Lee K, Chong Y. (2016) New treatment options for infections caused by increasingly antimicrobial-resistant *Neisseria gonorrhoeae*. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 14 (2): 243-56.
- 60.** Wind CM, Schim van der Loeff MF, van Dam AP, de Vries HJ, van der Helm JJ. (2017) Trends in antimicrobial susceptibility for azithromycin and ceftriaxone in *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Amsterdam, the Netherlands, between 2012 and 2015. *Euro Surveill*. 22 (1): 30431.
- 61.** Centers For Disease Control And Prevention. (2012) Update to CDC's Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines, 2010: Oral Cephalosporins No Longer a Recommended Treatment for Gonococcal Infections. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 61 (31): 590-594.
- 62.** Westrom L. (1980) Incidence, prevalence, and trends of acute pelvic inflammatory disease and its consequences in industrialized countries. *Am J Obstet Gynecol*, 138 (7): 880-892.
- 63.** Laga M, Manoka A, Kivuvu M, Malele B, Tuliza M, Nzila N, Goeman J, Behets F, Batter V, Alary M. (1993) Non-ulcerative sexually transmitted diseases as risk factors for HIV-1 transmission in women: results from a cohort study. *AIDS*, 7 (1): 95-102.
- 64.** Weston EJ, Wi T, Papp J. (2017) Strengthening Global Surveillance for Antimicrobial Drug-Resistant *Neisseria gonorrhoeae* through the Enhanced Gonococcal Antimicrobial Surveillance Program. *Emerg Infect Dis*, 23 (13).
- 65.** David A Lewis. (2010) The Gonococcus fights back: is this time a knock out? *Sex Transm Infect*, 86:415-421.
- 66.** Unemo M, Nicholas RA. (2012) Emergence of multidrug-resistant, extensively drug-resistant and untreatable gonorrhoea. *Future Microbial*, 7 (12): 1401-1422.

- 67.** Unemo M, Shafer WM. (2011) Antibiotic resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: origin, evolution, and lessons learned for the future. *Ann N Y Acad Sci*, 1230: 19–28.
- 68.** Tapsall JW, Ndowa F, Lewis DA, Unemo M. (2009) Meeting the public health challenge of multidrug- and extensively drug-resistant *Neisseria gonorrhoeae*. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 7: 821-34.
- 69.** S Zeitouni, O Collin, M Andraud, G Ermel, I Kempf. (2012) Fitness of Macrolide Resistant *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni*. *Microb Drug Resist*, 18 (2): 101-108.
- 70.** Dillon JA, Parti RP. (2012) Fluoroquinolone resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: fitness cost or benefit? *J Infect Dis*, 205: 1775–1777.
- 71.** Kampmeier RH. (1983) Introduction of Sulfonamide Therapy for Gonorrhea. *Sex Transm Dis*, 10: 81-4.
- 72.** Johnson SR, Morse SA. (1988) Antibiotic Resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: Genetics and Mechanisms of Resistance. *Sex Transm Dis*, 15: 217-224.
- 73.** Workowski KA, Berman SM, Douglas JM Jr. (2008) Emerging Antimicrobial Resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: Urgent Need to Strengthen Prevention Strategies. *Ann Intern Med*, 148 (8): 606-613.
- 74.** Percival A, Rowlands J, Corkill JE, Alergant CD, Arya OP, Rees E, Annels EH. (1976) Penicillinase-producing gonococci in Liverpool. *Lancet*, 2 (8000):1379-82.
- 75.** Centre For Disease Prevention And Control. (1982) Global distribution of penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* (PPNG). *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 31 (1-2):1-3.
- 76.** European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). (2011) Gonococcal antimicrobial susceptibility surveillance in Europe 2009. Stockholm: ECDC, 1-31.
- 77.** European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). (2012) Gonococcal antimicrobial susceptibility surveillance in Europe 2010. Stockholm: ECDC, 1-35.
- 78.** European Centre for Disease Prevention And Control (ECDC). (2013) Gonococcal antimicrobial susceptibility surveillance in Europe 2011. Stockholm: ECDC, 1-38.
- 79.** European Centre for Disease Prevention And Control (ECDC). (2012) Response plan to control and manage the threat of multidrug-resistant gonorrhoea in Europe. Stockholm: ECDC, 1-18.

- 80.** European Centre for Disease Prevention And Control (ECDC). (2014) Gonococcal antimicrobial susceptibility surveillance in Europe, 2012. Stockholm: ECDC, 1-16.
- 81.** European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). (2015) Gonococcal antimicrobial susceptibility surveillance in Europe, 2013. Stockholm: ECDC, 1-19.
- 82.** European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). (2016) Gonococcal antimicrobial susceptibility surveillance in Europe, 2014. Stockholm: ECDC, 1-16.
- 83.** European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). (2017) Gonococcal antimicrobial susceptibility surveillance in Europe, 2015. Stockholm: ECDC, 1-36.
- 84.** Kirkcaldy RD, Harvey A, Papp JR, Del Rio C, Soge OO, Holmes KK, Hook EW, Kubin G, Riedel S, Zenilman J, Pettus K, Sanders T, Sharpe S, Torrone ET. (2016) *Neisseria gonorrhoeae* Antimicrobial Susceptibility Surveillance -The Gonococcal Isolate Surveillance Project, 27 Sites, United States, 2014. *MMWR Surveill Summ*, 65 (7): 1-19.
- 85.** B. Suay-García, M. T. Pérez-Gracia. (2017) Drug-resistant *Neisseria gonorrhoeae*: latest developments. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 36 (7): 1065-1071.
- 86.** Lee H, Unemo M, Kim HJ, Seo Y, Lee K, Chong Y. (2015) Emergence of decreased susceptibility and resistance to extended-spectrum cephalosporins in *Neisseria gonorrhoeae* in Korea. *J Antimicrob Chemother*, 70 (9): 2536-42.
- 87.** Lee H, Hong SG, Seo Y, Yong D, Jeong SH, Lee K, Chong Y. (2011) Trends in antimicrobial resistance of *Neisseria gonorrhoeae* isolated from Korean patients from 2000 to 2006. *Sex Transm Dis*, 38 (11): 1082-6.
- 88.** Brown LB, Krysiak R, Kamanga G, Mapanje C, Kanyamula H, Banda B, Mhango C, Hoffman M, Kamwendo D, Hobbs M, Hosseinipour MC, Martinson F, Cohen MS, Hoffman IF. (2010) *Neisseria gonorrhoeae* antimicrobial susceptibility in Lilongwe, Malawi, 2007. *Sex Transm Dis*, 37: 169-72.
- 89.** S A Morse, S R Johnson, J W Biddle, M C Roberts. (1986) High-level tetracycline resistance in *Neisseria gonorrhoeae* is result of acquisition of streptococcal tetM determinant. *Antimicrob Agents Chemother*, 30 (5): 664-670.
- 90.** Deguchi T, Nakane K, Yasuda M, Maeda S. (2010) Emergence and spread of drug resistant *Neisseria gonorrhoeae*. *J Urol*, 184 (3): 851-8.
- 91.** Centre for Disease Prevention and Control (CDC). (2007) Update to CDC's Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines, 2006: Fluoroquinolones No

Longer Recommended for Treatment of Gonococcal Infections. *MMWR morb Mortal Wkly Rep*, 56: 332.

92. Centre for Disease Prevention and Control (CDC). (2004) Increases in fluoroquinolone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* among men who have sex with men--United States, 2003, and revised recommendations for gonorrhea treatment, 2004. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 53 (16): 335-8.

93. Waugh MA. (1993) Open study of the safety and efficacy of a single oral dose of azithromycin for the treatment of uncomplicated gonorrhoea in men and women. *J Antimicrob Chemother*, Suppl E: 193-8.

94. D Golparian, R Hadad, B Hellmark, H Fredlund, M Unemo. (2013) In Vitro Antimicrobial Synergy Testing, Using Etest Methodology of *Neisseria Gonorrhoeae* For Evaluation of Susceptibility When Using Dual Antimicrobial Therapy? *Sex Transm Infect*, 89: A114-A115.

95. Barbee, LA, Soge OO, Holmes KK, Golden MR. (2014) In vitro synergy testing of novel antimicrobial combination therapies against *Neisseria gonorrhoeae*. *J Antimicrob Chemother*, 69 (6): 1572–1578.

96. Kirkcaldy RD. (2013) Treatment of gonorrhoea in an era of emerging cephalosporin resistance and results of a randomized trial of new potential treatment options, abstr SO8.1 STI & AIDS World Congress 2013, Vienna, Austria.

97. Steingrimsdottir O, Olafsson JH, Thórarinnsson H, Ryan RW, Johnson RB, Tilton RC. (1994) Single dose azithromycin treatment of gonorrhoea and infections caused by *C. trachomatis* and *U. urealyticum* in men. *Sex Transm Dis*, 21: 107-11.

98. Takayama Y, Nakayama S, Shimuta K, Morita-Ishihara T, Ohnishi M. (2014) Characterization of azithromycin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* isolated in Tokyo in 2005-2011. *J Infect Chemother*, 20 (5): 339-41.

99. Sandoz Limited. (2013) SPC Azithromycin 500mg tablets. Elérhető: [http://www.medicines.org.uk/emc/medicine/21720/SPC/Azithromycin+500mg+Tablets+\(Sandoz+Limited\)/www.sandoz.com](http://www.medicines.org.uk/emc/medicine/21720/SPC/Azithromycin+500mg+Tablets+(Sandoz+Limited)/www.sandoz.com)

100. David Amrol. (2007) Single-dose azithromycin microsphere formulation: a novel delivery system for antibiotics. *Int J Nanomedicine*, 2 (1): 9–12.

101. Bignell C, Garley J. (2010) Azithromycin in the treatment of infection with *Neisseria gonorrhoeae*. *Sex Transm Infect*, 86 (6): 422-6.

- 102.** Tapsall JW, Shultz TR, Limnios EA, Donovan B, Lum G, Mulhall BP. (1998) Failure of azithromycin therapy in gonorrhea and disconnection with laboratory test parameters. *Sex Transm Dis*, 25 (10): 505-8.
- 103.** Public Health England. (2016) Surveillance of antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. Key findings from the Gonococcal Resistance to Antimicrobials Surveillance Programme (GRASP), 1-45.
- 104.** Chisholm SA, Dave J, Ison CA. (2010) High-level azithromycin resistance occurs in *Neisseria gonorrhoeae* as a result of a single point mutation in the 23S rRNA genes. *Antimicrob Agents Chemother*, 54 (9): 3812-6.
- 105.** Allen VG, Seah C, Martin I, Melano RG. (2014) Azithromycin resistance is coevolving with reduced susceptibility to cephalosporins in *Neisseria gonorrhoeae* in Ontario, Canada. *Antimicrob Agents Chemother*, 58 (5): 2528-34.
- 106.** S. Starnino, Stefanelli P, *Neisseria gonorrhoeae* Italian Study Group. (2009) Azithromycin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* strains recently isolated in Italy. *J Antimicrob Chemother*, 63: 1200-1204.
- 107.** Jiang FX, Lan Q, Le WJ, Su XH. (2017) Antimicrobial susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* isolates from Hefei (2014–2015): genetic characteristics of antimicrobial resistance. *BMC Infect Dis*, 17 (1): 366.
- 108.** I. Martin, P. Sawatzky, G. Liu, V Allen, B. Lefebvre, L. Hoang, S. Drews, G. Horsman, J. Wylie, D. Haldane, R. Garceau, S. Ratnam, T. Wong, C. Archibald, M.R. Mulvey. (2016) Decline in Decreased Cephalosporin Susceptibility and Increase in Azithromycin Resistance in *Neisseria gonorrhoeae*, Canada. *Emerg Infect Dis*, 22 (1): 65-7.
- 109.** Dudareva-Vizule S, Buder S, Jansen K, Loenenbach A, Nikisins S, Sailer A, Guhl E, Kohl PK, Bremer V. (2014) Antimicrobial resistance of *Neisseria gonorrhoeae* in Germany. Results from the Gonococcal Resistance Network (GORENET). Poster.
- 110.** Morita-Ishihara T, Unemo M, Furubayashi K, Kawahata T, Shimuta K, Nakayama S, Ohnishi M. (2014) Treatment failure with 2 g of azithromycin (extended-release formulation) in gonorrhoea in Japan caused by the international multidrug-resistant ST1407 strain of *Neisseria gonorrhoeae*. *J Antimicrob Chemother*, 69 (8): 2086-90.
- 111.** Unemo M, Golparian D, Hellmark B. (2014) First three *Neisseria gonorrhoeae* isolates with high-level resistance to azithromycin in Sweden: a threat to currently

available dual-antimicrobial regimens for treatment of gonorrhea? *Antimicrob Agents Chemother*, 58 (1): 624-5.

112. Bercot B, Belkacem A, Goubard A, Mougari F, Sednaoui P, La Ruche G, Cambau E. (2014) High-level azithromycin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* clinical isolate in France, March 2014. *Euro Surveill*, 19 (44): 20951.

113. Katz AR, Komeya AY, Soge OO, Kiaha MI, Lee MV, Wasserman GM, Maningas EV, Whelen AC, Kirkcaldy RD, Shapiro SJ, Bolan GA, Holmes KK. (2012) *Neisseria gonorrhoeae* with high-level resistance to azithromycin: case report of the first isolate identified in the United States. *Clin Infect Dis*, 54 (6): 841-3.

114. Zarantonelli L, Borthagaray G, Lee EH, Veal W, Shafer WM. (2001) Decreased susceptibility to azithromycin and erythromycin mediated by a novel *mtr(R)* promoter mutation in *Neisseria gonorrhoeae*. *J Antimicrob Chemother*, 47: 651-4.

115. McLean CA, Wang SA, Hoff GL, Dennis LY, Trees DL, Knapp JS, Markowitz LE, Levine WC. (2004) The emergence of *Neisseria gonorrhoeae* with decreased susceptibility to azithromycin in Kansas City, Missouri, 1999 to 2000. *Sex Transm Dis*, 31: 73-8.

116. Young H, Palmer HM. (2006) Gonococcal Antibiotic Surveillance in Scotland (GASS): prevalence, pattern and trends in 2005. *HPS Wkly*, 40: 54-5.

117. Chisholm SA, Neal TJ, Alawattagama AB, Birley HD, Howe RA, Ison CA. (2008) Emergence of high-level azithromycin resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in England and Wales. *Euro Surveill*, 13: 18832.

118. Arreaza L, Vázquez F, Alcalá B, Otero L, Salcedo C, Vázquez JA. (2003) Emergence of gonococcal strains with resistance to azithromycin in Spain. *J Antimicrob Chemother*, 51: 190e1.

119. Steingrimsdóttir O, Ólafsson JH, Þorarinsson H, Ryan RW, Johnson RB, Tilton RC. (1990) Azithromycin in the treatment of sexually transmitted disease. *J Antimicrob Chemother*, 25: 109-14.

120. Wind CM, de Vries E, Schim van der Loeff MF, van Rooijen MS, van Dam AP, Demczuk WHB, Martin I, de Vries HJC. (2017) Decreased Azithromycin Susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* Isolates in Patients Recently Treated with Azithromycin. *Clin Infect Dis*, 65 (1): 37-45.

- 121.** Cole MJ, Spiteri G, Jacobsson S, Woodford N, Tripodo F, Amato-Gauci AJ, Unemo M; Euro-GASP network. (2017) Overall Low Extended-Spectrum Cephalosporin Resistance but high Azithromycin Resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in 24 European Countries, 2015. *BMC Infect Dis*, 17: 617.
- 122.** Hook EW, Golden M, Jamieson BD, Dixon PB, Harbison HS, Lowens S, Fernandes P. (2015) A Phase 2 Trial of Oral Solithromycin 1200 mg or 1000 mg as Single-Dose Oral Therapy for Uncomplicated Gonorrhea. *Clin Infect Dis*, 61 (7): 1043-8.
- 123.** Unemo M, Golparian D, Hestner A. (2011) Ceftriaxone treatment failure of pharyngeal gonorrhoea verified by international recommendations, Sweden 2010. *Euro Surveill*, 16 (6): 19792.
- 124.** Ison CA, Hussey J, Sankar KN, Evans J, Alexander S. (2011) Gonorrhoea treatment failures to cefixime and azithromycin in England, 2010. *Euro Surveill*, 16 (14): 19833.
- 125.** Unemo M, Golparian D, Nicholas R, Ohnishi M, Gallay A, Sednaoui P. (2012) High-level cefixime- and ceftriaxone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* in France: novel penA mosaic allele in a successful international clone causes treatment failure. *Antimicrob Agents Chemother*, 56 (3): 1273-9.
- 126.** Monfort L, Caro V, Devaux Z, Delannoy AS, Brisse S, Sednaoui P. (2009) First *Neisseria gonorrhoeae* genotyping analysis in France: identification of a strain cluster with reduced susceptibility to Ceftriaxone. *Antimicrob Agents Chemother*, 47 (11): 3540-3545.
- 127.** Ison CA, Town K, Obi C, Chisholm S, Hughes G, Livermore DM, Lowndes CM; Grasp Collaborative Group. (2013) Decreased susceptibility to cephalosporins among gonococci: data from the Gonococcal Resistance to Antimicrobials Surveillance Programme (GRASP) in England and Wales, 2007-2011. *Lancet Infect Dis*, 13 (9): 762-768.
- 128.** Unemo M, Golparian D, Syversen G, Vestrheim D, Moi H. (2010) Two cases of verified clinical failures using internationally recommended first-line cefixime for gonorrhoea treatment, Norway, 2010. *Euro Surveill*, 15 (47): 1972.

- 129.** Unemo M, Golparian D, Stry A, Eigentler A. (2011) First Neisseria Gonorrhoeae Strain With Resistance to Cefixime Causing Gonorrhoea Treatment Failure in Austria. *Euro Surveill*, 16 (43): 19998.
- 130.** Carnicer-Pont D, Smithson A, Fina-Homar E, Bastida MT; Gonococcus Antimicrobial Resistance Surveillance Working Group. (2012) First cases of Neisseria gonorrhoeae resistant to ceftriaxone in Catalonia, Spain, May 2011. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 30 (4): 218-219.
- 131.** Ohnishi M, Saika T, Hoshina S, Iwasaku K, Nakayama S, Watanabe H, Kitawaki J. (2011) Ceftriaxone-resistant Neisseria gonorrhoeae, Japan. *Emerg Infect Dis*, 17 (1): 148-9.
- 132.** Ohnishi M, Golparian D, Shimuta K, Saika T, Hoshina S, Iwasaku K, Nakayama S, Kitawaki J, Unemo M. (2011) Is Neisseria gonorrhoeae initiating a future era of untreatable gonorrhoea?: detailed characterization of the first strain with high-level resistance to ceftriaxone. *Antimicrob Agents Chemother*, 55 (7): 3538-3545.
- 133.** Lahra MM, Enriquez RP; National Neisseria Network. (2016) Australian Gonococcal Surveillance Programme, 1 July to 30 September 2015. *Commun Dis Intell Q Rep*, 40 (1): E179-81.
- 134.** WHO, Department of Reproductive Health and Research. (2012) Global action plan to control the spread and impact of antimicrobial resistance in Neisseria gonorrhoeae. Geneva, Switzerland, 1-32.
- 135.** Ross JDC, Lewis DA. (2012) Cephalosporin resistant Neisseria gonorrhoeae: time to consider gentamicin? *Sex Transm Infect*, 88: 6-8.
- 136.** Dowell D, Kirkcaldy RD. (2012) Effectiveness of gentamicin for gonorrhoea treatment: systematic review and meta-analysis. *Sex Transm Infect*, 88 (8): 589-94.
- 137.** Brittain C, Childs M, Duley L, Harding J, Hepburn T, Meakin G, Montgomery AA, Tan W, Ross JD. (2016) Gentamicin versus ceftriaxone for the treatment of gonorrhoea (G-TOG trial): study protocol for a randomised trial. *Trials*, 17: 558.
- 138.** Hamasuna R, Ohnishi M, Matsumoto M, Okumura R, Unemo M, Matsumoto T. (2018, Epub 2017) In Vitro Activity of Sitafloxacin and Additional Newer Generation Fluoroquinolones Against Ciprofloxacin-Resistant Neisseria gonorrhoeae Isolates. *Microb Drug Resist*, 24 (1): 30-34.

- 139.** L Koeth and J Difranco-Fisher. (2013) In vitro Activity of Dalbavancin against *Neisseria gonorrhoeae* and Development of a Broth Microdilution Method. Poster Abstract Session: Diagnostic Microbiology; Antimicrobial Sensitivities.
- 140.** Unemo M, Golparian D, Limnios A, Whiley D, Ohnishi M, Lahra MM, Tapsall JW. (2012) In vitro activity of ertapenem vs. ceftriaxone against *Neisseria gonorrhoeae* isolates with highly diverse ceftriaxone MIC values and effects of ceftriaxone resistance determinants – ertapenem for treatment of gonorrhoea? *Antimicrob. Agents Chemother*, 56: 3603–3609.
- 141.** Wetzler LM. (2001) The development of a gonococcal vaccine: fact or fiction? *Int. J. STD AIDS*, 12 (Suppl. 2): 12.
- 142.** C Hauser, L Hirzberger, M Unemo, H Furrer, and A Endimiani. (2015) In Vitro Activity of Fosfomycin Alone and in Combination with Ceftriaxone or Azithromycin against Clinical *Neisseria gonorrhoeae* Isolates. *Antimicrob Agents Chemother*, 59 (3): 1605–1611.
- 143.** Kirkcaldy RD. (2013) Treatment of Gonorrhoea in an Era of Emerging Cephalosporin Resistance and Results of a Randomised Trial of New Potential Treatment Options. *Sex Transm Infect*, 89: A14-A15.
- 144.** Martin IM, Ison CA, Aanensen DM, Fenton KA, Spratt BG. (2004) Rapid sequence-based identification of gonococcal transmission clusters in a large metropolitan area. *J Infect Dis*, 189 (8): 1497-505.
- 145.** Martin I, Sawatzky P, Allen V, Hoang L, Lefebvre B, Mina N, Wong T, Gilmour M. (2012) Emergence and characterization of *Neisseria gonorrhoeae* isolates with decreased susceptibilities to ceftriaxone and cefixime in Canada: 2001-2010. *Sex Transm Dis*, 39 (4): 316-23.
- 146.** WHO, Department of Reproductive Health and Research. Global strategy for the prevention and control of sexually transmitted infections: 2006 - 2015. Breaking the chain of transmission. Geneva, WHO. 2007.
- 147.** O'Rourke M, Ison CA, Renton AM, Spratt BG. (1995) Opa-typing: a high-resolution tool for studying the epidemiology of gonorrhoea. *Mol Microbiol*, 17 (5): 865-75.
- 148.** EUCAST, European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. (2012) Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters.

- 149.** Zuckerkandl E, Pauling L. (1965) Molecules as documents of evolutionary history. *J Theor Biol*, 8 (1): 357–366.
- 150.** Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipiński A, Kumar S. (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol Biol Evol*, 30 (12): 2725–2729.
- 151.**
[http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch&PROG_DEF=blastn
 &BLAST_PROG_DEF=megaBlast&BLAST_SPEC=blast2seq](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch&PROG_DEF=blastn&BLAST_PROG_DEF=megaBlast&BLAST_SPEC=blast2seq).
- 152.** Espinosa K, Park JA, Gerrity JJ, Buono S, Shearer A, Dick C, Mak ML, Teramoto K, Klausner JD, Pandori M, Hess D. (2015) Fluoroquinolone resistance in *Neisseria gonorrhoeae* after cessation of ciprofloxacin usage in San Francisco: using molecular typing to investigate strain turnover. *Sex Transm Dis*, 42 (2): 57–63.
- 153.** Fingerhuth SM, Bonhoeffer S, Low N, Althaus CL. (2016) Antibiotic-Resistant *Neisseria gonorrhoeae* Spread Faster with More Treatment, Not More Sexual Partners. *PLoS Pathog*, 12 (5): e1005611.
- 154.** European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). (2015) Antimicrobial consumption interactive database (ESAC-Net). Summary of the latest data on antibiotic consumption in the European Union. Elérhető:
<https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/antibiotics-consumption-EU-data-2015.pdf>
- 155.** Horn NN, Kresken M, Körber-Irrgang B, Göttig S, Wichelhaus C, Wichelhaus TA. (2014) Working Party Antimicrobial Resistance of the Paul Ehrlich Society for Chemotherapy. Antimicrobial susceptibility and molecular epidemiology of *Neisseria gonorrhoeae* in Germany. *Int J Med Microbiol*, 304 (5-6): 586-91.
- 156.** Petrovay F, Balla E, Németh I, Gönczöl E. (2009) Genotyping of *Chlamydia trachomatis* from the endocervical specimens of high-risk women in Hungary. *J Med Microbiol*, 58 (6): 760-4.
- 157.** T Regnath, T Mertes, and R Ignatius. (2016) Antimicrobial resistance of *Neisseria gonorrhoeae* isolates in south-west Germany, 2004 to 2015: increasing minimal inhibitory concentrations of tetracycline but no resistance to third-generation cephalosporins. *Euro Surveill*, 21 (36): 30335.

10. Saját publikációk jegyzéke

A disszertációhoz kapcsolódó közlemények:

1. Brunner A, Nemes-Nikodem E, Mihalik N, Marschalko M, Karpati S and Ostorhazi E. (2014) Incidence and antimicrobial susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* isolates from patients attending the national *Neisseria gonorrhoeae* reference laboratory of Hungary. *BMC Infect Dis*, 14:433. **IF: 2,613**
2. Nemes-Nikodém E, Brunner A, Pintér D, Mihalik N, Lengyel Gy, Marschalkó M, Kárpáti S, Szabó D, Ostorházi E. (2014) Antimicrobial Susceptibility And Genotyping Analysis Of Hungarian *Neisseria Gonorrhoeae* Strains In 2013. *Acta Microbiol Immunol Hung*, 61 (4): 435–445. **IF: 0,778**
3. Brunner A, Nemes-Nikodem E, Jeney Cs, Szabo D, Marschalko M, Karpati S, Ostorhazi E. (2016) Emerging azithromycin-resistance among the *Neisseria gonorrhoeae* strains isolated in Hungary. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 15(1):53. **IF: 2,376**
4. Nemes-Nikodém E, Brunner A, Tóth B., Tóth V., Bánvölgyi A., Ostorházi E. (2015) *Neisseria gonorrhoeae* törzsek rezisztencia adatai Magyarországon, *Orv. Hetil.*, 156(1): 25–28. **IF: 0,291**

11. Köszönetnyilvánítás

Elsősorban köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Ostorházi Eszternek a lehetőségért, hogy az általa vezetett kutatásokban részt vehettem, valamint hogy mindvégig támogatta munkámat, és segített a tudományos kutatáshoz szükséges gondolkodásmód és képességek kifejlesztésében.

Külön köszönöm Nemes-Nikodém Évának, hogy segítette a módszerek elsajátítását. Továbbá köszönettel tartozom a Mikrobiológia laboratórium összes dolgozójának, ill. a Genetika laboratóriumnak, hogy segítették munkámat.

Köszönöm az STD ambulancia munkatársainak, különösen Marschalkó Márta Professzor Asszonynak a segítségét a kutatás során.

Köszönettel tartozom Szabó Dóra Professzor Asszonynak támogatásáért, illetve Dr. Jeney Csabának a filogenetikai vizsgálatok elsajátításában nyújtott segítségéért.

Emellett szeretnék köszönetet mondani Kárpáti Sarolta Professzor Asszonynak, hogy lehetővé tette, hogy TDK munkát és PhD tanulmányokat kezdhessek a SE Bőr-, Nemikórtani és Bőronkológiai Klinikán, illetve Dr. Sárdy Miklós Professzor Úrnak, hogy támogatta PhD tanulmányaim elvégzését.

Nem utolsó sorban őszinte hálával tartozom családtagjaimnak, hogy mindvégig mellettem álltak.

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Incidence and antimicrobial susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* isolates from patients attending the national *Neisseria gonorrhoeae* reference laboratory of Hungary

Alexandra Brunner^{1†}, Eva Nemes-Nikodem^{1†}, Noemi Mihalik¹, Marta Marschalko¹, Sarolta Karpati¹ and Eszter Ostorhazi^{1,2*}

Abstract

Background: The Hungarian national guidelines for the treatment of gonorrhoea were published in 2002 but are now widely considered to be outdated. Improved knowledge is needed with respect to the epidemiology and antimicrobial susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* strains currently circulating in Hungary not least for the construction of updated local recommendations for treating gonorrhoea. European guidelines are based mostly on western European data raising concerns locally that recommended treatments might not be optimised for the situation in Hungary. We report our recent study on the distribution of antibiotic resistance in various Hungarian (East European) *Neisseria gonorrhoeae* strains isolated from patients with gonorrhoea over the past four years.

Methods: Between January 2010 and December 2013, isolates of *N. gonorrhoeae* were obtained from sexually active individuals during medical examination at the STD Center of Semmelweis University in Budapest. The minimal inhibitory concentrations (MIC) of azithromycin, cefixime, ceftriaxone, ciprofloxacin, penicillin, tetracycline and spectinomycin were determined to establish the antimicrobial susceptibility of the strains currently circulating in patients that attend our clinic.

Results: Among the 9097 patients tested, 582 had an *N. gonorrhoeae* infection as detected by culture. The isolates were all sensitive to ceftriaxone and spectinomycin and 581/582 strains were sensitive to cefixime. In contrast, the number of detected strains with elevated azithromycin MIC did increase over the time period examined to approximately 16% in 2013. There was a high percentage of detected resistance to penicillin (77%), tetracycline (86%), and ciprofloxacin (66%) in the isolates examined in this study.

Conclusion: Current European guidelines recommend 2 g azithromycin in addition to 500 mg ceftriaxone as first choice therapy for gonorrhoea. For the purposes of revising the Hungarian national treatment guidelines, apparent increasing resistance to azithromycin during the last four years should be accounted for. It is also clear that penicillin, tetracycline and ciprofloxacin are inappropriate treatment measures at least locally. We also recommend that culture should form part of the diagnostic pathway of gonorrhoea, followed by antibiotic susceptibility testing with MIC determination. This will provide valuable continued monitoring of antibiotic resistance development in strains of *Neisseria gonorrhoeae* circulating in Hungary.

Keywords: *Neisseria gonorrhoeae*, Antimicrobial resistance, Incidence, MIC, Hungary

* Correspondence: droeszter@gmail.com

†Equal contributors

¹Department of Dermatology, Venerology and Dermatocology, Semmelweis University, Mária u. 41, 1085 Budapest, Hungary

²Institute of Medical Microbiology, Semmelweis University, Nagyvárad tér 4, 1089 Budapest, Hungary

Background

N. gonorrhoeae infections represent 106 million of the estimated 498 million new cases of curable sexually transmitted infection (STI) that occur globally every year [1]. In 2008, the World Health Organization (WHO) estimated 3.4 million cases among adults in the European Union (EU) [1]. Gonorrhoea remains the second most commonly reported bacterial STI after chlamydia infection [2]. Gonococcal infection, depending on the anatomic site of exposure can cause acute urethritis, cervicitis, proctitis or pharyngitis. However, most cervical, pharyngeal and rectal infections are asymptomatic. Untreated or inadequately treated gonorrhoea can cause serious reproductive complications in women. This includes pelvic inflammatory disease, infertility and ectopic pregnancy.

Hungary has a population of 10 million people and is served by 135 sexual health care units that are financed by the government. There are also more than 300 private venerologists available to help patients with STDs. In Hungary, gonorrhoeal infection cases must be notified to the National Epidemiological Center regardless of whether they were detected with nucleic acid amplification tests (NAATs), culture or only microscopically. The notification contains the age, gender and sexual orientation of the patient, the anatomical sites of the infection and the region of the country where the infection was detected.

The Hungarian national guidelines on the diagnosis and treatment of gonorrhoea [3] were published in 2002. These guidelines recommend 1x 250 mg ceftriaxone i.m. or 400 mg ofloxacin per os as first choice treatment, or 400 mg cefixime per os or 500 mg ciprofloxacin per os can be administered in cases of uncomplicated gonorrhoeal urethritis or cervicitis. The guidelines also allow diagnosis of gonorrhoeal urethritis in symptomatic men based only on a Gram stain of the male urethral specimen and a demonstration of the presence of polymorphonuclear leukocytes with intracellular Gram-negative diplococci. While this test is fast to administer and typically very reliable, it limits any opportunities to monitor the development of antibiotic resistance in *N. gonorrhoeae* – a phenomenon that is causing widespread concern globally.

In 2013, *N. gonorrhoeae* infections were notified in 1563 cases in Hungary [4]. However no reliable data with respect to antimicrobial resistance (AMR) exists because most diagnoses were based on microscopic analysis or NAATs and did not include any culturing (which is required for determining AMR). The National Reference Laboratory of *N. gonorrhoeae*, a part of the STD Center of Semmelweis University, receives patients and samples from all over the country. At our centre, diagnosis of gonorrhoea is made by culture, meaning that AMR development within Hungary can be monitored retrospectively.

The aims of this study were therefore to investigate *N. gonorrhoeae* infection rates according to gender, age and anatomic location of the symptoms, and to determine phenotypic AMR of the isolates obtained from patients with gonorrhoea who visited our clinic over the previous four years. A specific objective of the study was to understand the appropriateness of current Hungarian treatment recommendations especially with respect to suspected local development of AMR in circulating *N. gonorrhoeae* strains.

Methods

All studies were carried out at the STD Center of Department of Dermatology, Venereology and Dermatocology of Semmelweis University, Budapest, Hungary. Over a four-year period (January 2010 to December 2013), *N. gonorrhoeae* isolates were obtained from patients attending medical examinations for a suspected STI. During medical examination by a physician, patient data was also collected with respect to their age, sex, sexual orientation and anatomic site of infection. The isolates were cultured from consecutively symptomatic gonorrhoea patients and from their asymptomatic contacts. All isolates were collected as part of standard patient care and patients gave and signed informed consent. Patient data was analysed according to law 1997/CLIV 26§ taking into account maximum privacy rights and anonymity of patients [5]. Ethical approval signed by the Semmelweis University Regional and Institutional Committee of Science and Research Ethics was not required for the study because all used methods were not more than normally needed for diagnosis and treatment.

For the identification of *N. gonorrhoeae*, cervical, anal, urethral and pharyngeal swabs were taken and cultured on preheated VCA3 agar (Biomérieux, Budapest, Hungary) and on non-selective PVX chocolate agar (Biomérieux, Budapest, Hungary). Cultures were incubated for 24-48 hours at a temperature of 36.5°C with 5% carbon dioxide, and their identification and penicillinase production was confirmed using NH-API strip tests (Biomérieux, Budapest, Hungary).

Minimum inhibitory concentrations (MIC; mg/L) of cefixime, ceftriaxone, penicillin, tetracycline, azithromycin, spectinomycin and ciprofloxacin were determined on PVX chocolate agar (Biomérieux, Budapest, Hungary) using MIC strip tests (Liofilchem® s.r.l., Roseto degli Abruzzi, Italy), according to the manufacturer's instructions, and by using a direct colony suspension equivalent to a 0.5 McFarland standard. Testing conditions also included incubation at 36.5°C and 5% carbon dioxide for 24 hours. All results were interpreted by using breakpoints for susceptibility and resistance according to the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) (Table 1) [6]. To ensure the quality of the culture media

Table 1 *N. gonorrhoeae* MIC breakpoints for susceptibility and resistance according to the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)

	Sensitive (mg/L)	Resistant (mg/L)
penicillin	≤ 0,06	> 1
cefixime	≤ 0,12	> 0,12
ceftriaxone	≤ 0,12	> 0,12
ciprofloxacin	≤ 0,03	> 0,06
azithromycin	≤ 0,25	> 0,5
tetracycline	≤ 0,5	> 1
spectinomycin	≤ 64	> 64

Source: [http://www.who.int/drugresistance/Antimicrobial_resistance_in_Neisseria_gonorrhoeae.pdf].

and susceptibility tests, *N. gonorrhoeae* ATCC 49226 was used as a control strain. Isolates were classified as having a presumed high level of resistance to tetracycline (TRNG) if MIC was ≥16 mg/L, and as having a presumed plasmid-mediated resistance to penicillin (PPNG) if they were β-lactamase positive [7].

Results

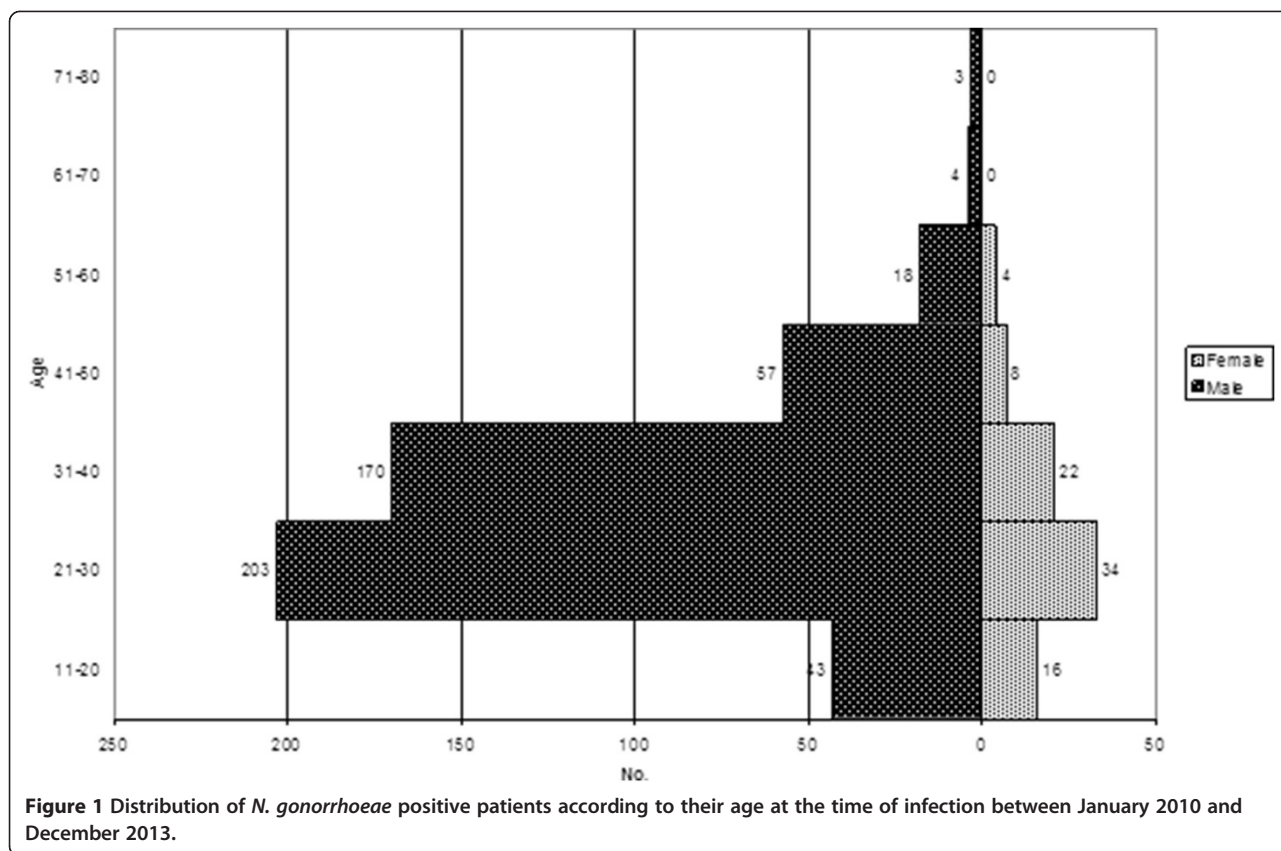
We examined the prevalence of *N. gonorrhoeae* infection in 9097 sexually active patients attending the Hungarian National STD Center between January 2010 and December 2013. A total of 26383 swab samples were collected during the study period. These samples, taken from urethra, cervix, anus, pharynx or conjunctiva were examined by culture. Over the period of the four years of the study the number of patients who visited the STD Center increased by 10.0% (Table 2). Depending on the symptoms observed, gender and anamnesis, one to five swab samples were collected for culturing. There was a concurrent increase in the number of samples collected of 8.7% over the study period (Table 2). The ratio of *N. gonorrhoeae* positive samples to total samples collected increased from 1.9% at the beginning of 2010 to 3.2% by the end of 2013. The ratio of positive patients to total patients examined increased from 5.2% in 2010 to 7.8% by the end of 2013 (Table 2). Out of the total number of samples collected, *N. gonorrhoeae* infection was confirmed in 673 samples and 582 patients (of both sexes). This included 16 samples taken from five patients who had returned to the clinic with new infections.

In terms of total population studied the majority of patients attending the clinic were male in all years of the study. Specifically, the male to female ratio of patients attending the STD Center were 62/38%, 58/42%, 57/43% and 61/39% in 2010, 2011, 2012 and 2013 respectively. On average over the study period 86% (498/582) of cases examined that were subsequently determined to be positive for *N. gonorrhoeae* were men, with the balance of cases (14% (84/582)) female. 86% (96/112), 85.5% (106/144), 84% (133/159) and 87% (163/187) were male patients in 2010, 2011, 2012 and 2013, respectively. Ages ranged from 14 to 76 years with an average of 31.7 years for male and 26.7 years for female patients (Figure 1). Among the infected male patients, 19% (95/498) declared that they were men who have sex with men (MSM), while 81% (403/495) declared they were heterosexual. The dominant anatomical site of gonococcal infections was urethra in male (80%, 437/548) and cervix in female patients (62%, 77/125). Pharyngeal and anal infections were identified both separately and in parallel with the dominant urethral infection in men or cervical infection in female patients. Only one extragenital *N. gonorrhoeae* infection causing conjunctivitis was detected in a male patient, who had gonorrhoeal urethritis and pharyngitis at the same time (Table 3).

We performed antimicrobial susceptibility tests on all 673 isolates. We found that isolates from different anatomical sites of the same patients did not differ in terms of MICs for the antibiotics we tested. Based on this observation, calculated percentages are based on data from single isolates (as in one strain) per patient (582 samples in total). The antimicrobial susceptibility rates of *N. gonorrhoeae* to azithromycin, cefixime, ceftriaxone, ciprofloxacin, penicillin, tetracycline and spectinomycin are given in Table 4. Almost all isolates were susceptible to ceftriaxone, cefixime (MIC ≤ 0.12 mg/L) and spectinomycin (MIC ≤ 64 mg/L). However there were small increases in the MIC averages for ceftriaxone, cefixime and spectinomycin between the beginning of 2010 and the end of 2013. These were 0.002 mg/L to 0.019 mg/L for ceftriaxone, 0.016 mg/L to 0.047 mg/L for cefixime and 2 mg/L to 8 mg/L for spectinomycin. In the last case, we did identify two isolates with an MIC of 48 mg/L. In 2013 we also observed for the first time (in our laboratory) three strains that exceeded breakpoints: two strains with a

Table 2 Number of patients, samples for culture, *N. gonorrhoeae* positive samples and *N. gonorrhoeae* infected patients at the STD Centre of Semmelweis University, 2010-2013

	2010	2011	2012	2013	Total
Number of patients	2167	2229	2317	2384	9097
Number of tested samples	6397	6350	6682	6954	26383
<i>N. gonorrhoeae</i> positive samples (Number/%)	129/1.9%	144/2.2%	178/2.7%	222/3.2%	673/2.5%
<i>N. gonorrhoeae</i> infected patients (Number/%)	112/5.2%	124/5.6%	159/6.9%	187/7.8%	582/6.4%



cefixime MIC of 0.125 mg/L and one strain with a cefixime MIC of 0.19 mg/L. In strict accordance with EUCAST recommendations this means 0.51% of the strains had a cefixime MIC just above the resistant breakpoint. Resistance to azithromycin (MIC > 0.5 mg/L) increased from 0 to 15.86% of strains tested during the four years of the study.

The prevalence of ciprofloxacin and tetracycline resistance varied year to year but was consistently high for both antibiotics (66% and 86%, respectively) (see Table 4). The prevalence of penicillin resistance appeared to slowly increase from 75 to 79% in the four years of the study. PPNG was detected in 16.2% of the isolates and

TRNG in 23%, whereas 14.8% of the isolates presented both phenotypes (PPNG/TRNG).

Discussion

In Hungary, as is the case in many other countries, the control of gonococcal infections mostly relies on an effective single-dose antibiotic therapy given at the first clinical presentation of the patient. Prior knowledge of the antimicrobial susceptibility pattern of the particular strain infecting the patient is routinely not established however. With increasing evidence of antimicrobial resistance in gonococcal infections there is therefore a real risk of treatment failure and development of further resistance

Table 3 Distribution of specimens cultured for *N. gonorrhoeae* strains between January 2010 and December 2013

Samples	Men	%	Women	%
Cervix	0	0	77	61.6
Pharynx	22	4.0	11	8.8
Anus	88	16.1	10	8.0
Urethra	437	79.7	27	21.6
Conjunctiva	1	0.2	0	0
Total	548	100	125	100

Table 4 Distribution of antibiotic resistant *N. gonorrhoeae* strains (%) in Hungary

Resistance to antibiotics/year	2010	2011	2012	2013
Azithromycin	0	0.8	6.9	15.9
Cefixime	0	0	0	0.2
Ceftriaxone	0	0	0	0
Ciprofloxacin	70.5	61.7	64.6	67.2
Penicillin	75.4	76.2	77.3	79.5
Spectinomycin	0	0	0	0
Tetracycline	88.1	87.5	82.9	85.5

to antibiotics. Current Hungarian guidelines for the diagnosis and treatment of gonorrhoea date from 2002 and are based on bygone national and international data of gonococcal resistance. Our study therefore sought to understand ongoing resistance trends with respect to gonorrhoea in Hungary, and to ultimately contribute to the preparation of new guidelines to ensure the success of any therapies targeting gonorrhoea. Our data, based on sampling over the previous four years highlight that there appears to be continued antimicrobial resistance in circulating strains of *N. gonorrhoeae* strains to a variety of common antibiotics (including high rates of resistance to ciprofloxacin, which is one of the antibiotics recommended in the national Hungarian guidelines) and that there may be developing resistance to others (including azithromycin and penicillin and possibly even cefixime) in this part of eastern Europe.

Over the last 70–80 years treatment options have diminished due to the emergence and spread of resistance to all drugs recommended for treatment of gonorrhoea. Plasmid-mediated resistance mechanisms have been described for penicillins (PPNG) and tetracyclines (TRNG), but not for sulphonamides, macrolides, spectinomycin, aminoglycosides, quinolones and cephalosporines. In these cases only chromosomal mutations have been described as the reason for resistance [8]. Since *N. gonorrhoeae* is naturally competent for the uptake and recombination of external DNA during its entire life cycle, the transfer of chromosomally encoded resistance genes is both rapid and extensive in comparison to uptake of plasmid-mediated resistance genes [9]. Resistance may initially emerge in the commensal *Neisseria spp.* inhabiting the human body as these are exposed more frequently to antimicrobials than the transiently acquired gonococci. The commensal *Neisseria spp.* can act as a reservoir of resistance genes that can be transferred to gonococci through transformation. In our study *N. gonorrhoeae* was detected in pharyngeal swab samples of symptomatic or asymptomatic infected patients in 4 and 8% of male and female patients, respectively. This may be significant as the pharynx may be an ideal anatomic site to provide the opportunity for chromosomally encoded resistance development. Pharyngeal gonorrhoea is mostly asymptomatic meaning that commensal *Neisseria spp.* and *N. gonorrhoeae* can co-exist for extended time periods in the pharynx and share genetic material [10-12]. This is likely to include the transfer of antibiotic resistance genes and therefore the development of antibiotic resistance in *N. gonorrhoeae*. As humans appear to be the obligate host of *N. gonorrhoeae* it would appear that control of resistance lies in appropriate treatment regimes and that includes correct usage of antibiotics. The emergence and spread of antimicrobial resistance in *N. gonorrhoeae* all over the world requires the control of incidence of

gonorrhoea through education and appropriate sexual practices and control of antimicrobial resistance through appropriate antibiotic usage. This is particularly the case in Hungary where both incidence of gonorrhoea and antibiotic resistance appear to be increasing in recent years.

According to data from the National Epidemiological Center the incidence of *N. gonorrhoeae* infection appears to be increasing in Hungary - the number of the reported (notified) cases was 1158 in 2010, 1369 in 2011, 1491 in 2012 and 1563 in 2013 [4]. In the report of the National Epidemiological Center, 75-82% of the infections were detected in male patients and the dominant site of infection was urethra in male (81%), and cervix in female (62%) (in this time period in Hungary). About 10% of the notifiable infections were diagnosed at the STD Center of Semmelweis University during this period, and the distribution according to gender, age and location of the symptoms was the same as the national results.

To our knowledge the only available data relating to the distribution of resistance against different antibiotics of the Hungarian *N. gonorrhoeae* strains exist in the surveillance reports of EURO-GASP (European Gonococcal Antimicrobial Surveillance Programme) [13,14]. In these projects 14 and 13 *N. gonorrhoeae* strains were collected from Hungary in 2010 and 2011. These data were collected from a sentinel laboratory based on the report of a selected group of physicians [13,14]. In these reports there were no Hungarian *N. gonorrhoeae* strains with PPNG property. All these strains were susceptible to azithromycin, and 79% or 61.5% were resistant to ciprofloxacin in 2010 and 2011, respectively. These data contained no occurrence of cefixime resistant strains in 2010, but 1% of the isolates had decreased susceptibility to cefixime in 2011.

In our work we processed 582 *N. gonorrhoeae* strains, which corresponds to approximately 10% of the total number of notified infections in Hungary during the period between the beginning of 2010 and the end of 2013. This provides a more representative assessment of antimicrobial resistance to *N. gonorrhoeae* than any other previous survey carried out in Hungary.

Among our 582 *N. gonorrhoeae* isolates generally no resistance occurred against ceftriaxone, cefixime and spectinomycin. These results were interpreted using breakpoints for susceptibility and resistance according to the EUCAST [6]. All the measured MICs were not higher than their respective resistance breakpoints, with the exception of three strains isolated in 2013, which showed slightly raised resistance towards cefixime. Year on year there was a small increase in MIC averages for ceftriaxone, cefixime and spectinomycin. These averages did not exceed resistance breakpoints with the exception of the three cases mentioned above. We also found a small increase in the number of penicillin resistant

strains during the study period. The rate of PPNG strains was stable at around 16%, which suggests different chromosomal mutations may be reasonably assumed for this type of resistance development. The acquisition of a mosaic *penA* gene encoding a remodelled penicillin binding protein (PBP2) and overproduction of an efflux pump in *N. gonorrhoeae* appears to be responsible for reduced susceptibility to cephalosporins [15]. Since the first ceftriaxone-resistant isolates were identified in Japan (2009), France (2010), and Spain (2011) [16-18], a real threat now exists that extensively resistant strains of *N. gonorrhoeae* may emerge and spread worldwide. Enhanced surveillance for resistance against other anti-gonococcal agents is therefore warranted.

According to the EUCAST interpretations all of the strains were susceptible to spectinomycin with a MIC lower than 64 mg/L. The average spectinomycin MIC increased during the study period and we did identify two isolates with clearly elevated (48 mg/L) MICs, suggesting that only intermediate sensitivity can be assured (according to the recommendation of Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) [19]). Verified resistance to spectinomycin is exceedingly rare worldwide with only five spectinomycin-resistant isolates (all between 1988 and 1990) identified in the US Gonococcal Isolate Surveillance Project [20] using the CLSI recommendation. In comparison no spectinomycin-resistant isolates have been identified in the EURO-GASP in 2010-2011 [13,14].

The very common occurrence (82-88% in Hungary over the past four years in our study) of tetracycline resistant strains is not unique in comparison to other countries. Despite some exceptions (in the USA, tetracycline resistance rates are only 22.5% [21] while rates in South America and the Caribbean decreased from a level of 61.1% of isolates tested in 2001 to 21.8% in 2010 [22]), high prevalence of tetracycline resistance has been detected in some countries in South East Asia. Bhutan and Indonesia reported a resistance rate of more than 95% between 2009 and 2012 [23], and a rate of 92.8% tetracycline resistance was noted in North Africa in 2009 [24]. This high percentage of detected resistance to tetracycline indicates that this antibiotic is certainly not appropriate for gonorrhoea treatment in Hungary and probably elsewhere.

Furthermore, the effectiveness of the quinolone antibiotics appears to be equally limited. For example, the prevalence of ciprofloxacin resistant strains that we detected in this study was between 61-70% over the previous four years. In comparison, prevalence of ciprofloxacin resistance in the USA was 13.5% [21], while in Latin America and the Caribbean ciprofloxacin rates increased from 1.6% of isolates tested in 1997 to 42.1% in 2010 [21]. Rates of ciprofloxacin resistance have decreased continuously since 2009 in the participant

countries of EURO-GASP, but still remained as high as 52.7% and 48.7% in 2010 and 2011, respectively [13,14]. The usage of ciprofloxacin, which was previously recommended in gonorrhoea treatment in Hungary, is no longer suitable according to the rates of resistance we observed in recent years.

Resistance to azithromycin (MIC > 0.5 mg/L) increased from 0 to 15.86% during the four years of our study. The Centers for Disease Control and Prevention [25] and the International Union against Sexually Transmitted Infections (IUSTI) [26] published global and European guidelines for diagnosis and/or treatment of *N. gonorrhoeae* to combat and mitigate the spread of multidrug-resistant gonorrhoea. Their new treatment guidelines revised the recommended treatment to be 250 mg or 500 mg ceftriaxone im combined with 1 g or 2 g azithromycin per os, respectively. However, based on past and current data reported in this study, *N. gonorrhoeae* may continue to emerge with azithromycin resistance in our country, especially as increased usage of this antibiotic is expected. The World Health Organization has suggested that an antimicrobial should not be used when >5% of strains demonstrate resistance [27]. If our data can be verified it would appear that this cut-off has already been passed in Hungary. In addition to complying with the new recommendations it is necessary to also adequately run antimicrobial surveillance programmes. It would be advisable to now include surveillance for ceftriaxone and azithromycin resistance, not least to control the emergence of extremely drug resistant strains.

Conclusion

Our study contributes large amounts of data on the current antimicrobial susceptibility rates of circulating *N. gonorrhoeae* strains in Hungary in the period between the beginning of 2010 and up to the end of 2013. It is clear that there are considerable levels of antimicrobial resistance in circulating strains and in some cases resistance may be emerging. Of concern is that such resistance may be emerging towards antibiotics that are currently recommended as first line treatments for gonorrhoea in Hungary. Current diagnosis approaches typically only utilise Gram staining techniques, which while regarded as highly accurate, do not allow antibiotic resistance to be monitored routinely. Based on our observations we are now of the opinion that culture and susceptibility testing are indispensable in the currently developing situation of multidrug resistance among the *N. gonorrhoeae* strains. It is somewhat reassuring that during the previous four years, resistance has not been identified towards the recommended treatment of ceftriaxone in Hungary. However, in Europe extensively drug resistant *N. gonorrhoeae* strains have emerged and we believe it is only a matter of time before this occurs in Hungary if appropriate control

measures and surveillance are not implemented soon. This emergence of resistance should prompt revision of our national diagnosis and treatment guidelines. The recommendations of IUSTI and other international organisations involved in developing advice and treatment approaches for gonorrhoea should be considered. However in Hungary the incidence of azithromycin resistance appears to have increased over recent years and this should be taken into account in developing any new guidelines.

Abbreviations

AMR: Antimicrobial resistance; CLSI: Clinical and laboratory standards institute; EUCAST: European committee on antimicrobial susceptibility testing; EURO-GASP: European gonococcal antimicrobial surveillance programme; IUSTI: International union against sexually transmitted infections; MIC: Minimal inhibitory concentrations; MSM: Men who have sex with men; PBP: Penicillin binding protein; PPNG: Penicillinase producing *Neisseria gonorrhoeae*; TRNG: Tetracycline resistant *Neisseria gonorrhoeae*.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

BA, NNE collected the retrospective data. OE wrote the manuscript. BA, NNE, MN and OE conducted the review of the literature relevant to the paper. MN, MM and SK examined and treated the patients. BA, NNE and OE performed identification and susceptibility testing of the strains. All authors contributed suggestions to the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

We would like to acknowledge the technical assistance of Ildikó Bencze Győriné and Elvira Vörös. We would also like to thank Max Bingham, PhD (freelance editor, Rotterdam, The Netherlands) for technical writing and editorial assistance prior to submission.

Received: 12 March 2014 Accepted: 30 July 2014
Published: 6 August 2014

References

- World Health Organization (WHO), Department of Reproductive Health and Research: **Global action Plan to Control the Spread and Impact of Antimicrobial Resistance in Neisseria Gonorrhoeae**. In Geneva: WHO; 2012:1–36 [http://www.who.int/reproductivehealth/publications/rtis/9789241503501/en/]. ISBN 978 92 4 150350 1.
- European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC): **Response Plan to Control and Manage the Threat of Multi-Drug Resistant Gonorrhoea in Europe**. In Stockholm: ECDC; 2012:1–23. doi:10.2900/60053 [http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/publications/1206-ecdc-mdr-gonorrhoea-response-plan.pdf]. ISBN 978 92 9193 375 4.
- Bőr- és Nemi Betegségek Szakmai Kollégiuma/ Skin and Venereal Diseases Professional College: **Módszertani ajánlás a szexuális úton terjedő infekciók kivizsgálására és kezelésére/ Methodological letter of detection of sexually transmitted infections and treatment**. *Egészségügyi Közlöny/Health Bulletin* 2002, **52**:1509–1518 [http://www.otszonline.hu/cikk/modszertani_ajanlas_a_szexualis_uton_terjedo_infekciok_kivizgalasara_es_kezelesere]
- Országos Epidemiológiai Központ (OEK)/ National Epidemiological Center: **Szexuális úton terjedő betegségek Magyarországon/Sexually transmitted diseases in Hungary 2013**. IV. *Epinfo* 2014, **5**:45–50 [www.oek.hu/oekfile.pl?fid=3813]
- Magyar Országgyűlés/ Parliament of Hungary: **Hatályos jogszabályok gyűjteménye /Collection of existing legislation**. [http://net.jogtar.hu/jr/gen/hjegy_doc.cgi?docid=99700154.TV]
- The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing: **Breakpoint Tables for Interpretation of MICs and Zone Diameters**. 2014 [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/Breakpoint_table_v_4.0.pdf]
- Tapsall JW: **Antibiotic resistance in *Neisseria gonorrhoeae***. *Clin Infect Dis* 2005, **41**(Supplement 4):S263–S268. doi:10.1086/430787.
- Lewis DA, Lukehart SA: **Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* and *Treponema pallidum*: evolution, therapeutic challenges and the need to strengthen global surveillance**. *Sex Transm Infect* 2011, **87**:ii39–ii43. doi:10.1136/sti.2010.047712.
- Unemo M, Shafer WM: **Antibiotic resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: origin, evolution, and lessons learned for the future**. *Ann NY Acad Sci* 2011, **1230**:E19–E28. doi:10.1111/j.1749-6632.2011.06215.x.
- Unemo M, Nicholas RA: **Emergence of multidrug-resistant, extensively drug-resistant and untreatable gonorrhoea**. *Future Microbiol* 2012, **7**:1401–1422. doi:10.2217/fmb.12.117.
- Furuya R, Onoye Y, Kanayama A, Saika T, Iyoda T, Tatewaki M, Matsuzaki K, Kobayashi I, Tanaka M: **Antimicrobial resistance in clinical isolates of *Neisseria subflava* from the oral cavities of a Japanese population**. *J Infect Chemother* 2007, **13**:302–304. doi:10.1007/s10156-007-0541-8.
- Saika T, Nishiyama T, Kanayama A, Kobayashi I, Nakayama H, Tanaka M, Naito S: **Comparison of *Neisseria gonorrhoeae* isolates from the genital tract and pharynx of two gonorrhoea patients**. *J Infect Chemother* 2001, **7**:175–179. doi:10.1007/s101560100031.
- European Centre for Disease Prevention and Control: **Gonococcal Antimicrobial Susceptibility Surveillance in Europe — 2010**. 2012. [http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/1206-Gonococcal-AMR.pdf] (Accessed 18 Apr 2013).
- European Centre for Disease Prevention and Control: **Gonococcal Antimicrobial Susceptibility Surveillance in Europe 2011**. 2013. [http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/gonococcal-antimicrobial-susceptibility-surveillance-27-mar-2013.pdf] (accessed 18 Apr 2013).
- Ito M, Deguchi T, Mizutani KS, Yasuda M, Yokoi S, Ito S, Takahashi Y, Ishihara S, Kawamura Y, Ezaki T: **Emergence and spread of *Neisseria gonorrhoeae* clinical isolates harboring mosaic-like structure of penicillin-binding protein 2 in Central Japan**. *Antimicrob Agents Chemother* 2005, **49**:137–143. doi:10.1128/AAC.49.1.137-143.2005.
- Ohnishi M, Golparian D, Shimuta K, Saika T, Hoshina S, Iwasaku K, Nakayama S, Kitawaki J, Unemo M: **Is *Neisseria gonorrhoeae* initiating a future era of untreatable gonorrhoea? Detailed characterization of the first strain with high-level resistance to ceftriaxone**. *Antimicrob Agents Chemother* 2011, **55**:3538–3545. doi:10.1128/AAC.00325-11.
- Unemo M, Golparian D, Nicholas R, Ohnishi M, Gally A, Sednaoui P: **High-level cefixime- and ceftriaxone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* in France: novel *penA* mosaic allele in a successful international clone causes treatment failure**. *Antimicrob Agents Chemother* 2012, **56**:1273–1280. doi:10.1128/AAC.05760-11.
- Cámara J, Serra J, Ayats J, Bastida T, Carnicer-Pont D, Andreu A, Ardanuy C: **Molecular characterization of two high-level ceftriaxone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* isolates detected in Catalonia, Spain**. *J Antimicrob Chemother* 2012, **67**:1858–1860. doi:10.1093/jac/dks162.
- Clinical and Laboratory Standards Institute: **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Informational Supplement. CLSI Document M100-S21 (ISBN 1-56238-742-1)**. 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087 USA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2011.
- Gorwitz RJ, Nakashima AK, Moran JS, Knapp JS: **Sentinel Surveillance for Antimicrobial Resistance in *Neisseria gonorrhoeae* - United States, 1988-1991: the gonococcal isolate surveillance project study group**. *MMWR CDC Surveill Summ* 1993, **42**:29–39 [http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00021562.htm]
- Kirkcaldy RD, Kidd S, Weinstock HS, Papp JR, Bolan GA: **Trends in antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in the USA: the Gonococcal Isolate Surveillance Project (GISP), January 2006-June 2012**. *Sex Transm Infect* 2013, **89**:5–10. doi:10.1136/sextrans-2012-050472.
- Dillon JA, Trecker MA, Thakur SD: **Gonococcal Antimicrobial Surveillance Program Network in Latin America and Caribbean 1990-2011: two decades of the gonococcal antimicrobial surveillance program in South America and the Caribbean: challenges and opportunities**. *Sex Transm Infect* 2013, **89**:36–41. doi:10.1136/sextrans-2012-050905.
- Bala M, Kakran M, Singh V, Sood S, Ramesh V: **Monitoring antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in selected countries of the WHO South-East Asia Region between 2009 and 2012: a retrospective analysis**. *Sex Transm Infect* 2013, **89**:28–35. doi:10.1136/sextrans-2012-050904.
- Hançali A, Ndowa F, Bellaji B, Bennani A, Kettani A, Charof R, El Aouad R: **Antimicrobial resistance monitoring in *Neisseria gonorrhoeae* and strategic use of funds from the Global Fund to set up a systematic**

Moroccan gonococcal antimicrobial surveillance programme. *Sex Transm Infect* 2013, **89**:24–27. doi:10.1136/sextrans-2013-051166.

25. Workowsky KA, Berman S, Centers for Disease Control and Prevention (CDC): **Sexually transmitted diseases treatment guidelines 2010**. *MMWR Recomm Rep* 2010, **59**:1–116.
26. Bignell C, Unemo M, European STI, Board GE: **European guideline on the diagnosis and treatment of gonorrhoea in adults**. *Int J STD AIDS* 2012, **2013**(24):85–92.
27. Tapsall J: *Antimicrobial Resistance in Neisseria gonorrhoeae*. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2001:1–58.

doi:10.1186/1471-2334-14-433

Cite this article as: Brunner *et al.*: Incidence and antimicrobial susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* isolates from patients attending the national *Neisseria gonorrhoeae* reference laboratory of Hungary. *BMC Infectious Diseases* 2014 **14**:433.

**Submit your next manuscript to BioMed Central
and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY AND GENOTYPING ANALYSIS OF HUNGARIAN *NEISSERIA GONORRHOEAE* STRAINS IN 2013

ÉVA NEMES-NIKODÉM¹, ALEXANDRA BRUNNER¹, DÓRA PINTÉR¹,
NOÉMI MIHALIK¹, GYÖRGY LENGYEL², MÁRTA MARSCHALKÓ¹,
SAROLTA KÁRPÁTI¹, DÓRA SZABÓ³ and ESZTER OSTORHÁZI^{1,3*}

¹Department of Dermatology, Venerology and Dermatooncology,
Semmelweis University Budapest, Hungary

²Research Institute of Military Health Centre, Hungarian Defence Forces Budapest, Hungary

³Institute of Medical Microbiology, Semmelweis University, Budapest, Hungary

(Received: October 10, 2014; accepted: October 28, 2014)

Purpose: Emergence and spread of antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* is a major public health concern worldwide. The current study aims to determine the antimicrobial resistance in *N. gonorrhoeae* and associated molecular typing to enhance gonococcal antimicrobial surveillance in Hungary. *Methods:* In the National *N. gonorrhoeae* Reference Laboratory of Hungary 187 *N. gonorrhoeae* infections were detected in 2013, antibiograms were determined for all the isolated strains, and 52 (one index strain from every sexually contact related group) of them were also analyzed by the *N. gonorrhoeae* multi-antigen sequence typing (NG-MAST) method. *Results:* Twenty-two different NG-MAST sequence types (STs) were identified, of which 8 STs had not been previously described. In Hungary, the highly diversified gonococcal population displayed high resistance to penicilline, ciprofloxacin and tetracycline (the antimicrobials previously recommended for gonorrhoea treatment). Resistance to the currently recommended extended spectrum cephalosporines were rare: only two of the expected strains, an ST 1407 and an ST 210, had cefixime MIC above the resistance breakpoint. By the revision of our National Treatment Guideline, it must be considered, that the azithromycin resistance is about 60% among the four most frequently isolated STs in Hungary.

Keywords: *Neisseria gonorrhoeae*, sequence typing, antimicrobial susceptibility, Hungary

* Corresponding author; E-mail: droeszter@gmail.com

Introduction

Over the last few years, the number of gonorrhoea cases has increased regularly in Europe [1]. The need for effective treatment and control of gonococcal infections are evident, given the serious complications of gonorrhoea, such as epididymitis, pelvic inflammatory disease, infertility, ectopic pregnancy, early abortion and perinatal infections, furthermore a fivefold increased risk for human immunodeficiency virus (HIV) acquisition and transmission [2]. Knowledge of local susceptibility patterns combined with incidence of various molecular types of *N. gonorrhoeae* is essential to establish the best regional treatment guideline. Among the currently available sequence-based methods *N. gonorrhoeae* multi-antigen sequence typing (NG-MAST) is one of the most advantageous, because it generates a simple numerical sequence type based on the combined sequences of two genes (*porB* and *thpB*). In addition, an internationally accessible web database allows strain comparison worldwide [3]. Several studies have applied NG-MAST to characterise gonococci exhibiting resistance to the third generation cephalosporins [4–6], and the European Gonococcal Antimicrobial Resistance Surveillance Programme (EURO-GASP) made the first study to supplement a regional antimicrobial resistance surveillance programme with molecular typing. This Programme provided novel information on NG-MAST STs circulating in 21 European countries and also provided insight into the dissemination of antimicrobial resistant gonococcal clones within Europe [7]. As Hungary did not participate in EURO-GASP in 2009, only very low numbers (17) of *N. gonorrhoeae* were available from 2010 for inclusion. Our recent work complements the European database with the results of molecular epidemiological surveillance of consecutive isolates of all antimicrobial phenotypes in Hungary in 2013. The presence of regional surveillance data about antimicrobial resistance of *N. gonorrhoeae* is a good approach to estimate the global burden of resistance of this microorganism as well as to establish the strategies to apply the best empirical treatment

Materials and Methods

Bacterial isolates

From January to December 2013 *N. gonorrhoeae* strains were obtained from patients in the National *Neisseria gonorrhoeae* Reference Laboratory at the Centre of Sexually Transmitted Diseases, Department of Dermatology, Venereology and Dermatooncology of Semmelweis University Budapest, Hungary. The

isolates were cultured and stored from consecutive symptomatic gonorrhoea patients and from their asymptomatic contacts. All isolates were collected as part of standard patient care and patients gave and signed informed consent. Patient data was analysed according to law 1997/CLIV 26§ taking into account maximum privacy rights and anonymity of patients (Parlament of Hungary, 1997). The Semmelweis University Regional and Institutional Committee of Science and Research Ethics have approved the analysis (TUKÉB: 161/2014). For the identification of *N. gonorrhoeae* cervical, anal, urethral and pharyngeal swabs were taken and cultured on preheated VCA3 agar (Biomérieux, Hungary). Cultures were incubated for 48 hours at a temperature of 36.5 °C with 5% carbon dioxide, and their identification and penicillinase production was confirmed by NH-API strip tests (Biomérieux, Hungary). The selection criteria for genotyping analysis were the follows: we used only one isolate from one patient, and only isolates from the index patients were included for genotyping analysis. Contacts from the index case were excluded.

Antimicrobial susceptibility testing

The minimum inhibitory concentration (MIC; mg/l) of cefixime, ceftriaxone, penicillin, tetracycline, azithromycin, spectinomycin and ciprofloxacin were determined on PVX chocolate agar (Biomérieux, Hungary) using MIC strip tests (Liofilchem, Italy), according to the manufacturer's instructions, using a direct colony suspension equivalent to a 0.5 McFarland standard. Testing conditions included incubation at 36.5 °C, 5% carbon dioxide for 24 hours. All results were interpreted by using breakpoints for susceptibility and resistance according to the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) [5]. The isolates were classified as having a presumed high level resistance to tetracycline (TRNG) if MIC was ≥ 16 $\mu\text{g/mL}$, and as having a presumed plasmid-mediated resistance to penicillin (PPNG) if they were β -lactamase positive [6].

Isolation of genomic DNA

N. gonorrhoeae strains were retrieved from storage at -80 °C on Cryobank breads (Mast Diagnostica, Germany), cultured on PVX chocolate agar, and incubated overnight at 36.5 °C with 5% carbon dioxide. A turbid suspension of the

gonococcal subculture was made in PCR water and DNA was isolated with GeneAll Ribospin extraction kit (Geneall Biotechnology, Korea).

Molecular epidemiological typing

N. gonorrhoeae multiantigen sequence typing (NG-MAST) was performed as previously described [6]. Briefly we determined the sequences of the 52 *N. gonorrhoeae* *porB* and *tbpB* PCR products, after their preliminary purification by the Exosap IT purification kit (Affymetrix, USA) we used the BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies, USA) and the same forward and reverse primers as for the *porB* and *tbpB* PCR methods. Last purification was made by NucleoSEQ Column PCR Purification Kit (Macherey-Nagel, Germany). Nucleotide sequences were determined by capillary electrophoresis, with 50 cm capillary and POP-7 polymer on ABI 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

NG-MAST allele numbers of the more variable segments of *porB* and *tbpB*, and STs including the new alleles and STs were assigned using the NG-MAST website [3].

Results

From January to December 2013 a total of 222 *N. gonorrhoeae* strains were obtained from 187 patients, 29 patients had *N. gonorrhoeae* infection on more than one anatomical site. The number of the sexual contacts of the patients ranged from 1 to 12, with an average of 3.9 in a half year prior the gonorrhoea infection. During the contact research the 187 patients were tabulated in 52 sexually contacted network groups. Every network group contained only the patients who mutually and independently admitted to have sexual contact with a member of the group. The *N. gonorrhoeae* strains isolated from patients attending to the same network group all had a group specific antibiotic resistance pattern. The first symptomatic patient was selected as index patient from every network group. After selection 52 *N. gonorrhoeae* isolates from the index patients were examined according to the antibiotic susceptibility and molecular epidemiological typing.

Among the 52 patients 5 were female and 47 were male. More than half, 24 of the men were heterosexual, 2 were bisexual, and 21 declared that they were men who have sex with men (MSM). Ages of the examined patients ranged from

15 to 64 years. The dominant anatomical site of infection was urethra, 43 strains were isolated from urethra, 3 from cervix, 2 from pharynx and 4 from anus.

Based on NG-MAST, the 52 isolates were subdivided into 22 different STs. The eight new STs, which had not been previously described in other parts of the world, were assigned as ST 10081 to ST 10088 using the NG-MAST website. ST 10081 and ST 10082 have new *porB* alleles, *porB* 5921 and *porB* 5922 combined with the common *tbpB* alleles, *tbpB* 29 and *tbpB* 110, respectively. STs 10083 to 10088 contain known alleles in new combinations. The 14 other common STs were found in the NG-MAST database, they were described previously in other parts of the world as well. The majority (61.5%) of the strains belongs to four frequently isolated STs; ST 2992 was represented by 10 (19.2%) isolates, ST 1407 and ST 4995 by 9 (17.3%) isolates each and ST 225 by 4 (7.7%) isolates. ST 8517 and ST 359 were present in 2 (3.8%) isolates each. All the other STs were detected in single (1.9%) isolates.

The frequency and antibiotic susceptibility patterns of the 22 STs are summarized in Table I. Only two isolates showed susceptibility to all tested antibiotics; these isolates attend to ST 387 and ST 9901. The other 50 isolates were resistant to at least one antibiotic.

Only 6/52 (11.5%) isolates were sensitive to penicillin, among the 46/52 (88.5%) penicillin resistant strains 7 (15%) were penicillinase producers. Forty-nine of the 52 strains (94%) were resistant to tetracycline and among the tetracycline resistant strains 9/49 (18,4%) were TRNG. Twenty-nine of the 52 strains (56%) were resistant to ciprofloxacin. All the 52 strains were sensitive to spectinomycin. The azithromycin MIC was above 0.5 mg/l in 20 strains (38%) and are declared as resistant to azithromycin according to the EUCAST [5] recommendation. This MIC was equal or lower as 0.25 mg/l in 27 (52%) of isolations, which were sensitive to azithromycin. Five strains had an elevated azithromycin MIC of 0.38 mg/l. Among the isolations representing the most common four STs (ST2992, ST1407, ST4995, ST225) 19/32 (60%) were not sensitive to azithromycin. All the isolates were sensitive to ceftriaxone, and only two isolates were resistant to cefixim from ST1407 and ST210. More than half of the strains had elevated ceftriaxone and cefixim MIC (0.023mg/L = ceftriaxone MIC = 0.064mg/L, 0.023mg/L = cefixim MIC=0.19mg/L) in ST1407, ST225 and ST210. The distribution of MIC values of the different STs is summarized in Table II.

Table I

Incidence and antimicrobial susceptibility of NG-MAST STs detected in Hungary in 2013.
S = Sensitive, R = resistant, I = elevated MIC

NG-MAST ST	Incidence (%)	Antimicrobial-susceptibility						
		Penicillin	Ciprofloxacin	Tetracycline	Spectinomycin	Azithromycin	Cefixime	Ceftriaxone
2992	19.2	20% S 80% R	S	10% S, 90% R	S	30% S, 30% I, 40% R	S	S
1407	17.3	100% R	R	R	S	22% S, 22% I, 56% R	89% S, 11% R	S
4995	17.3	11% S 89% R	R	R	S	78% S, 22% R	S	S
225	7.7	100% R	R	R	S	50% S, 50% R	S	S
359	3.8	S	S	R	S	S	S	S
8517	3.8	R	S	R	S	S	S	S
210	1.9	R	R	R	S	S	R	S
387	1.9	S	S	S	S	S	S	S
995	1.9	R	S	R	S	S	S	S
2212	1.9	R	R	R	S	S	S	S
2569	1.9	R	R	R	S	R	S	S
6155	1.9	R	S	R	S	S	S	S
8343	1.9	R	R	R	S	S	S	S
9901	1.9	S	S	S	S	S	S	S
10081	1.9	R	R	R	S	R	S	S
10082	1.9	R	R	R	S	S	S	S
10083	1.9	R	R	R	S	S	S	S
10084	1.9	R	S	R	S	S	S	S
10085	1.9	R	S	R	S	S	S	S
10086	1.9	R	S	R	S	R	S	S
10087	1.9	R	S	R	S	R	S	S
10088	1.9	R	S	R	S	R	S	S

Discussion

Surveillance programs monitoring the antimicrobial susceptibility and molecular characteristics of *N. gonorrhoeae* are essential to implement adequate empirical treatment guidelines. The last national guideline on the diagnosis and treatment of gonorrhoea [11] was published in Hungary in 2002. Due to this guideline 1 × 250 mg ceftriaxone i.m. or 400 mg ofloxacin per os is recommended as first

Table II

Distribution of MIC of cefixime and ceftriaxon among the different *Neisseria gonorrhoeae* STs isolated in Hungary in 2013
The lowest detectable cefixim (CFM) and ceftriaxone (CRO) MICs are 0.016 and 0.002 mg/l, respectively.

ST	Anti-Num-ber of isolates with cefixim and ceftriaxon MIC (mg/L)											
		microbial	≤0.002	0.012	≤0.016	0.023	0.032	0.047	0.064	0.094	0.125	0.19
2992	CFM				10							
	CRO	10										
1407	CFM					2	1	3	1	1		
	CRO	1	2	1	1	2	1	1				
4995	CFM				9							
	CRO	9										
225	CFM				1		1		1	1		
	CRO					3		1				
Other STs	CFM				17	2	1	1				1 (ST210)
	CRO	15	4	1					1 (ST210)			

choice, or 400 mg cefixim per os or 500 mg ciprofloxacin per os can be administered in the cases of uncomplicated gonorrhoeal urethritis or cervicitis. In Hungary, gonorrhoeal infection cases must be notified to the National Epidemiological Center regardless of whether they were detected with nucleic acid amplification tests (NAATs), culture or only microscopically. Publication about Hungarian gonococcal incidence data is available only in Hungarian in the Report of the National Epidemiological Center, but neither antibiotic resistance nor molecular typing results are included [12]. About 14% (222/1563) of the notifiable infections were diagnosed at the STD Center of Semmelweis University during this period, and the distribution according to gender, age and location of the symptoms was the same as the national results. Among our index patients men was much more than women, it may simply indicate the likely order in which cases were identified, men are more likely to be symptomatic. The National Reference Laboratory of *N. gonorrhoeae*, as a part of the STD Center of Semmelweis University, receives patients from all over the country. At our centre, diagnosis of gonorrhoea is made by culture, meaning that AMR development within Hungary can be monitored retrospectively.

The EURO-GASP demonstrated antibiotic resistance and molecular characterization results but only about 17 *N. gonorrhoeae* isolations collected in 2010 in Hungary [7]. The present study describes the first internationally reported gonococcal AMR data together with the first molecular characterization of

N. gonorrhoeae isolates in Hungary. This study shows the antimicrobial susceptibility and the NG-MAST results of *N. gonorrhoeae* single strains, isolated from 52 patients assumed that they were not linked to each other. The 52 isolates were subdivided into 22 different STs, but more than 60% of the highly diverse bacterium population belonged to 4 STs, ST2992, ST1407, ST4995 and ST225, previously described in other parts of the world [3]. The EURO-GASP study [7] pointed out that 12 of the 17 isolations collected from Hungary in 2010 belonged to the genogroup1407 (10 strains to ST5332 and 2 strains to ST1407), but among these isolates neither ST2992, nor ST4995 nor ST225 were found. This discrepancy may be explained by the facts that very low numbers of isolates were available for inclusion in the EURO-GASP study, or that our isolates were collected 3 years later, in 2013. In 2010 ST4995 was not described, but our other 3 frequent STs were the most frequent STs in EURO-GASP as well. Between 2010 and 2012 G1407 was currently the most frequently detected genogroup worldwide from Canada to Japan [13, 14], in Europe 23% of the isolates belonged to G1407, 10% to G225 and 8% o isolate belonged to G2992 [15]. In Hungary in 2013 the most frequently isolated ST was ST2992 (19%) followed by ST1407 and ST4995 (in 17% each), and ST225 was isolated in 7%. The relative high incidence of ST4995 is unique; no international publication about the importance of ST4995 was found.

In addition from a personal communication we know that nineteen of 1445 (1.3%) typed gonorrhoea episodes in Scotland in 2013 were ST4995. All Scottish patients identified with ST4995 were male, suggesting circulation in networks of men who have sex with men, although sexual orientation data was not available. The isolates from Scotland were resistant to ciprofloxacin (MICs ranged from 3–12 mg/L by Etest) and had high-level tetracycline resistance characteristic of plasmid-mediated resistance. Seven of 12 isolates were PPNG. Isolates were susceptible to ceftriaxone, cefixime, spectinomycin and azithromycin by agar dilution [Kirstine Eastick, Director of Scottish Bacterial STI Reference Laboratory personal communication].

Among our isolates high prevalence of resistance was observed for previously recommended antimicrobials such as tetracycline (94%), ciprofloxacin (56%) or penicillin (88.5%), in accordance with other international data [7, 13–18]. These results clearly show that the use of these three antibiotics for the empirical treatment of gonococcal infections is no longer safe. The use of antibiotic treatments without performing sensitivity tests generates treatment failures [19–21] even with the antibiotics currently proposed as first choice antibiotics. The extensive use of antibiotics also leads to a positive selective pressure for specific international multidrug resistant (MDR) clones such as G1407, or for resis-

tance against an often used antibiotic, as we found only 52% azithromycin sensitivity among our isolates. G1407 isolates circulating currently in Europe are ciprofloxacin resistant, strongly associated with decreased susceptibility or resistance to cefixime and show raised MICs for ceftriaxone and azithromycin [7]. Despite the fact that no ceftriaxone resistant isolates were identified in our study, the proportion of isolates with a ceftriaxone MIC = 0.016 mg/L was significantly lower among our ST1407 and ST225 strains than in other STs. Furthermore, among our ST1407 and ST225 isolates the proportion of strains with a cefixime MIC = 0.032 mg/L was also decreased in contrast with other STs. Isolates with an extended spectrum cephalosporine (ESC) MIC of 0.125 mg/L have resulted in treatment failures with ESCs [22,23]. Accordingly, we considered an ST1407 isolate as having at least a decreased susceptibility to cefixime. Furthermore, we found an ST210 isolate with a cefixime MIC of 0.19 mg/L associated with a ceftriaxone MIC of 0.064 mg/L, therefore this ST might have a great chance to become a successfully selected MDR clone. Spectinomycin remains an antibiotic still effective in treatment against MDR *N. gonorrhoeae* strains. However, adoption of spectinomycin as the routinely used drug of choice was soon followed by reports of spectinomycin resistance [24]. All our isolates regardless of represented STs were sensitive to spectinomycin in consistence with the results of other authors [7, 16–18].

This is the first study describing antimicrobial resistance and NG-MAST clonality of gonococcal isolates detected in Hungary. *N. gonorrhoeae* strains isolated in Hungary in 2013 showed a high genetic diversity but also showed a dominance of 4 internationally known clones. Due to the spread of these MDR clones the antibiotic susceptibility of our isolates is decreased, meaning either resistance to the worldwide previously recommended antibiotics as penicillin, ciprofloxacin or tetracycline, or elevated MICs of the recently recommended therapeutic options such as ESCs or azithromycin. In this context, it is essential to increase numbers of cultures in gonococcal infections in Hungary to study and monitor resistance patterns and molecular clonality. We emphasize the urgent need for promptly revision of the National Treatment Guideline of gonorrhoea in Hungary; the present study provides an evidence base for this recommendation. The European Guideline recommends 500 mg ceftriaxon combined with 2 g azithromycin as first choice therapy, but by the revision of our National Treatment Guideline, it must be considered, that the azithromycin resistance is about 60% among the four most frequently isolated STs in Hungary.

Acknowledgement

The skillful technical assistance of Ildikó Bencze Győriné and Elvira Vörös is highly appreciated. We would like to express our appreciation to Kirstine Eastick who shared the Scottish data with us in personal communication, and gave us the possibility to complete this manuscript.

Conflict of interest

On behalf of all authors, the corresponding author states that there is no conflict of interest.

References

1. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC): Sexually Transmitted Infections in Europe, 1990–2010. Stockholm: ECDC; 2012. Available from: <http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/201206-Sexually-Transmitted-Infections-Europe-2010.pdf>
2. Fleming, D.T., Wasserheit, J.N.: From epidemiological synergy to public health policy and practice: the contribution of other STD to sexual transmission of HIV infection. *Sex Transm Infect* **75**, 3–17 (1999).
3. www.ng-mast.net
4. Golparian, D., Hellmark, B., Fredlund, H., Unemo, M.: Emergence, spread and characteristics of *Neisseria gonorrhoeae* isolates with in vitro decreased susceptibility and resistance to extended-spectrum cephalosporins in Sweden Daniel Golparian, Bengt Hellmark, Hans Fredlund, Magnus Unemo. *Sex Transm Infect* **86**, 454–460 (2010).
5. Carannante, A., Prignano, G., Cusini, M., Matteelli, A., Dal Conte, I., Ghisetti, V., D'Antuono, A., Cavrini, F., Antonetti, R., Stefanelli, P.: Cefixime and ceftriaxone susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* in Italy from 2006 to 2010. *Clin Microbiol Infect* **8**, 558–564 (2012).
6. Camara, J., Serra, J., Ayats, J., Bastida, T., Carnicer-Pont, D., Andreu, A., Ardanuy, C.: Molecular characterization of two high-level ceftriaxone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* isolates detected in Catalonia, Spain. *J Antimicrob Chemother* **67**, 1858–1860 (2012).
7. Chisholm, S.A., Unemo, M., Quaye, N., Johansson, E., Cole, M.J., Ison, C.A., Van de Laar, M.J.: Molecular epidemiological typing within the European Gonococcal Antimicrobial Resistance Surveillance Programme reveals predominance of a multidrug-resistant clone. *Euro Surveill* **18**, 20358 (2013).
8. www.eucast.org
9. Tapsall, J.W.: Antibiotic resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. *Clin Infect Dis* **41**, 263–268 (2005).
10. Martin, I.M., Ison, C.A., Aanensen, D.M., Fenton, K.A., Spratt, B.G.: Rapid sequence-based identification of gonococcal transmission clusters in a large metropolitan area. *J Infect Dis* **189**, 1497–1505 (2004).

11. Módszertani ajánlás a szexuális úton terjedő infekciók kivizsgálására és kezelésére/ Methodological letter of detection of sexually transmitted infections and treatment. Egészségügyi Közlöny/Health Bulletin **52**, 1509–1518 (2002).
12. Országos Epidemiológiai Központ (OEK)/National Epidemiological Center: Szexuális úton terjedő betegségek Magyarországon/Sexually transmitted diseases in Hungary 2013. IV. Epinfo **5**, 45–50 (2014).
13. Shimuta, K., Unemo, M., Nakayama, S., Morita-Ishihara, T., Dorin, M., Kawahata, T., Ohnishi, M.: Antimicrobial resistance and molecular typing of *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Kyoto and Osaka, Japan, 2010 to 2012: Intensified surveillance after identification of the first strain (H041) with high-level ceftriaxone resistance. Antimicrob Agents Chemother **57**, 5225–5232 (2013).
14. Martin, I., Sawatzky, P., Liu, G., Allen, V., Lefebvre, B., Hoang, L., Lovgren, M., Haldane, D., Caesele, P.V., Horsman, G., Garceau, R., Ratnam, S., Wong, T., Gilmour, M.: Antimicrobial susceptibilities and distribution of sequence types of *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Canada: 2010. Can J Microbiol **59**, 671–678 (2013).
15. European Centre for Diseases Prevention and Control (ECDC): Technical Report. Molecular typing of *Neisseria gonorrhoeae*. Results from a Pilot Study 2010–2011. Stockholm, 2012. ECDC, 2012.
16. Endimiani, A., Guilarte, Y.N., Tinguely, R., Hirzberger, L., Selvini, S., Lupo, A., Hauser, C., Furrer, H.: Characterization of *Neisseria gonorrhoeae* isolates detected in Switzerland (1998–2012): Emergence of multidrug-resistant clones less susceptible to cephalosporins. BMC Infect Dis **25**, 106 (2014).
17. Mlynarczyk-Bonikowska, B., Serwin, A.B., Golparian, D., Walter de Walthoffen, S., Majewski, S., Koper, M., Malejczyk, M., Domeika, M., Unemo, M.: Antimicrobial susceptibility/resistance and genetic characteristics of *Neisseria gonorrhoeae* isolates from Poland, 2010–2012. BMC Infect Dis **14**, 65 (2014).
18. Olsen, B., Lan, P.T., Golparian, D., Johansson, E., Tran, H.K., Unemo, M.: Antimicrobial susceptibility and genetic characteristics of *Neisseria gonorrhoeae* isolates from Vietnam, 2011. BMC Infect Dis **13**, 40 (2013).
19. Unemo, M., Golparian, D., Stary, A., Eigentler, A.: First *Neisseria gonorrhoeae* strain with resistance to cefixime causing gonorrhoea treatment failure in Austria, 2011. Euro Surveill **16**(43), 19998 (2011).
20. Unemo, M., Golparian, D., Syversen, G., Vestrheim, D.F., Moi, H.: Two cases of verified clinical failures using internationally recommended first-line cefixime for gonorrhoea treatment, Norway, 2010. Euro Surveill **15**(47), 19721 (2010).
21. Ison, C.A., Hussey, J., Sankar, K.N., Evans, J., Alexander, S.: Gonorrhoea treatment failures to cefixime and azithromycin in England, 2010. Euro Surveill. **16**(14), 19833 (2011).
22. Allen, V.G., Mitterni, L., Seah, C., Rebbapragada, A., Martin, I.E., Lee, C., Siebert, H., Towns, L., Melano, R.G., Low, D.E.: *Neisseria gonorrhoeae* treatment failure and susceptibility to cefixime in Toronto, Canada. JAMA **309**, 163–170 (2013).
23. Tapsall, J., Read, P., Carmody, C., Bourne, C., Ray, S., Limnios, A., Sloots, T., Whiley, D.: Two cases of failed ceftriaxone treatment in pharyngeal gonorrhoea verified by molecular microbiological methods. J Med Microbiol **58**, 683–687 (2009).
24. Boslego, J.W., Tramont, E.C., Takafuji, E.T., Diniega, B.M., Mitchell, B.S., Small, J.W., Khan, W.N., Stein, D.C.: Effect of spectinomycin use on the prevalence of spectinomycin-resistant and of penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae*. N Engl J Med **317**, 272–278 (1987).

Neisseria gonorrhoeae törzsek rezisztenciaadatai Magyarországon

Nemes-Nikodém Éva ■ Brunner Alexandra ■ Tóth Béla dr.
Tóth Veronika dr. ■ Bánvölgyi András dr. ■ Ostorházi Eszter dr.

Semmelweis Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Bőr-, Nemikórtani és Bőronkológiai Klinika, Budapest

Bevezetés: A *Neisseria gonorrhoeae*-infekciók kezelésére kiadott európai ajánlás elsősorban a nyugat-európai adatok alapján készült, és nem egyértelműen használható a magyarországi helyzet ismeretében. **Célkitűzés:** A szerzők 2011. január és 2014. június közötti időszakban a Semmelweis Egyetem Bőr-, Nemikórtani és Bőronkológiai Klinika Országos Szexuális Úton Terjedő Fertőzések Centrumában izolált *Neisseria gonorrhoeae* törzsek rezisztenciaadatait összevetették az izolált törzsek molekuláris tipizálási eredményeivel, azzal a céllal, hogy pontos adatokat kapjanak a hazánkban előforduló *Neisseria gonorrhoeae* törzsek antimikrobiális rezisztenciájáról. **Módszer:** Az antibiotikumrezisztencia-meghatározás minimális inhibitor-koncentráció-méréssel, a szekvenciameghatározás a *Neisseria gonorrhoeae* Multi Antigen Sequence Typing módszerrel történt. **Eredmények:** A jelenleg terápiának ajánlott széles spektrumú cefalosporinok elleni rezisztencia ritka, az utóbbi években az azithromycinrezisztencia előfordulása viszont rohamosan növekedett. **Következtetések:** Az új terápiás irányelvek készítésekor figyelembe kell venni, hogy a gyakran fertőzést okozó molekuláris típusba sorolható törzsek között kiemelkedően magas az azithromycinrezisztensek aránya. *Orv. Hetil.*, 2015, 156(1), 25–28.

Kulcsszavak: *Neisseria gonorrhoeae*, szekvenciatípus, antibiotikumrezisztencia

Antimicrobial resistance of *Neisseria gonorrhoeae* strains in Hungary

Introduction: European guidelines on the treatment of *Neisseria gonorrhoeae* are based mostly on Western European data, although these recommendations may not be optimised for the circumstances in Hungary. **Aim:** The aim of the authors was to assess current antimicrobial resistance of *Neisseria gonorrhoeae* strains in order to enhance gonococcal antimicrobial surveillance in Hungary. *Neisseria gonorrhoeae* strains were isolated at the National Center of Sexually Transmitted Infections at the Department of Dermatology, Venerology and Dermatocology of Semmelweis University in the period between January 2011 and June 2014. **Method:** Antimicrobial resistance was determined with minimum inhibitory concentration measurement. *Neisseria gonorrhoeae* Multiantigen Sequence typing was used as molecular typing method. **Results:** Resistance to the currently recommended extended spectrum cephalosporins is rare in Hungary, but there is an emerging azithromycin resistance among the *Neisseria gonorrhoeae* strains. **Conclusions:** Revision of the national treatment guideline must consider that the most frequent sequence types of *Neisseria gonorrhoeae* strains causing infections in Hungary are mainly resistant to azithromycin.

Keywords: *Neisseria gonorrhoeae*, sequence types, antibiotic resistance

Nemes-Nikodém, É., Brunner, A., Tóth, B., Tóth, V., Bánvölgyi, A., Ostorházi, E. [Antimicrobial resistance of *Neisseria gonorrhoeae* strains in Hungary]. *Orv. Hetil.*, 2015, 156(1), 25–28.

(Beérkezett: 2014. október 20.; elfogadva: 2014. november 13.)

Rövidítések

EUCAST = (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) Európai Antimikrobiális Érzékenységi Vizsgáló Bizottság; EURO-GASP = (European Gonococcal Anti-

microbial Resistance Surveillance Programm) Európai Gonococcus Antimikrobiális Rezisztencia Felügyeleti Program; IUSTI = (International Union Against Sexually Transmitted Infections) Szexuális Úton Terjedő Betegségek Elleni

Nemzetközi Szervezet; MIC = (minimum inhibitory concentration) minimális gátlókoncentráció; NAATs = (nucleic acid amplification tests) nukleinsav-amplifikációs teszt; Ng-MAST = (*Neisseria gonorrhoeae* Multi Antigen Sequence Typing) *Neisseria gonorrhoeae* multiantigénszekvencia-típezálás; PCR = (polymerase chain reaction) polimeráz láncreakció; PID = (pelvic inflammatory disease) kismedencei gyulladással megbetegedés; ST = (sequence type) szekvenciatípus; STD = (sexually transmitted disease) szexuális úton terjedő megbetegedés; WHO = (World Health Organization) Egészségügyi Világszervezet

Az Egészségügyi Világszervezet (WHO) 498 millióra becsüli a gyógyítható, szexuális úton terjedő új fertőzések megjelenését világszerte évente, és ezeknek a fertőzéseknek több mint egyötöd részénél, 106 millió esetben a *Neisseria gonorrhoeae* baktérium jelentkezik kórokozóként [1]. Tekintettel a gonorrhoeafertőzés súlyos lehetséges következményeire (például: epididymitis, kismedencei gyulladással betegség [PID], méhen kívüli terhesség stb.) nagyon fontos, hogy hatékony kezelési módszert tudjon a kezelőorvos választani. Biztosan célzott terápia csak abban az esetben indítható, ha az adott kórokozótörzs antibiotikumérzékenysége ismert, az antibiogram elkészítéséhez viszont elengedhetetlen a kórokozó tenyésztése. A *N. gonorrhoeae* baktérium rendkívül tápigényes, és a tenyésztés egyéb körülményeit (hőmérséklet, 5% CO₂) tekintve is fokozottan érzékeny, a vizsgálati minta laboratóriumba szállítása gyakran nehézkes. Világszerte azt a tendenciát lehet látni, hogy a diagnózisok felállításakor, az eseteknek csak töredék részében történik meg a kórokozó tenyésztése és antibi-

1. táblázat | 2011. január 1. és 2014. június 30. közötti időszakban a Semmelweis Egyetem Bőr-, Nemikórtani és Bőronkológiai Klinika Országos STD Centrumában izolált *N. gonorrhoeae* törzsek antibiotikumrezisztenciája (összes izolátum, előforduló rezisztens törzs száma, százalékos arány)

Antibiotikummal szembeni rezisztens törzsek (száma), %	Év/izolált <i>N. gonorrhoeae</i> törzs száma	2011	2012	2013	2014. 1. fél év
Azithromycin		(1) 0,8%	(13) 6,9%	(35) 15,9%	(47) 40,5%
Cefixim		(0) 0%	(0) 0%	(1) 0,5%	(2) 1,7%
Ceftriaxon		(0) 0%	(0) 0%	(0) 0%	(0) 0%
Ciprofloxacín		(88) 61,7%	(115) 64,6%	(149) 67,2%	(45) 38,8%
Penicillin		76,2%	77,3%	79,5%	nem vizsgált adat
Spectinomycin		(0) 0%	(0) 0%	(0) 0%	(0) 0%
Tetracyclin		(126) 87,5%	(148) 82,9%	(190) 85,5%	(100) 86,2%

otikumérzékenységének meghatározása. Férfiak urethritise esetén a váladékból készített Gram-kenet is egyértelműen igazolhatja a baktérium jelenlétét, de bármely anatómiai helyen megjelenő fertőzés kimutatásának legérzékenyebb módszere a nukleinsav-amplifikációs tesztek (NAATs) használata. A NAATs közül legelterjedtebben használt polimeráz láncreakció (PCR) multiplex formában is elérhető, egyidejűleg egy vizsgálati mintából több kórokozó kimutatására is alkalmas. Hazánkban is elterjedt a multiplex PCR-vizsgálatok használata a diagnosztikában, amelyek kiemelkedő előnye, hogy gyors eredményt adnak, és a kezelőorvost a koinfekciók meglétéről is tájékoztatják, de, sajnos, a kórokozó baktériumok antibiotikumérzékenységét nem tudják megadni. A helyes empirikusterápia-ajánlások készítésekor figyelembe kell venni az adott földrajzi területen leggyakrabban megjelenő baktériumtörzsek rezisztenciaviszonyait. Molekuláris típezáló módszerek alkalmazásával a baktériumtörzsek szekvenciatípusok (ST) szerint csoportosíthatóak, így az adott földrajzi területen meg lehet állapítani, hogy melyik ST a legsikeresebb, leggyakrabban fertőzést okozó törzs. A különböző ST-kbe tartozó törzsek antibiotikus érzékenységének ismeretében kimondható, hogy az adott régióban melyik antibiotikumtól várható leginkább a sikeres kezelés.

Módszer

A Semmelweis Egyetem Bőr-, Nemikórtani és Bőronkológiai Klinika Országos STD Centrumában az elmúlt három és fél év során (2011. január–2013. június) megjelent betegekben kitenyésztett *N. gonorrhoeae* törzsek érzékenységét vizsgáltuk cefixim, ceftriaxon, tetracyclin, ciprofloxacín, azithromycin és spectinomycin antibiotikumokra, minimális inhibitor-koncentráció- (MIC-) meghatározással. A MIC-értékek interpretációja az Európai Antimikrobiális Érzékenységi Vizsgálatok Bizottság (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – EUCAST) [2] ajánlás alapján történt. A 2013. év során izolált törzseken *Neisseria gonorrhoeae* Multi Antigen Sequence Typing (Ng-MAST) [3] típezálást végeztünk, megvizsgáltuk a különböző gyakran előforduló törzsek antibiogramját.

Eredmények

A vizsgált időszakban a különböző antibiotikumokkal szemben rezisztens törzsek száma és százalékos eloszlása az 1. táblázatban látható. A Semmelweis Egyetem Bőr-, Nemikórtani és Bőronkológiai Klinika Országos STD Centrumában évről évre növekedett az izolált *N. gonorrhoeae* törzsek száma. A béta-laktám antibiotikumok közül a penicillinrezisztencia évek óta 70% fölötti értéket mutatott, 2014-ben már nem vizsgáltuk ennek a szernek az érzékenységét. 2013-ban már megjelent a saját vizsgálati anyagunkban is egy cefiximrezisztens törzs, és 2014 első fél évében már két ilyen izolátumot találtunk,

ugyanakkor ceftriaxonrezisztens törzs még nem került azonosításra. Érdekes adat, hogy a kinolonrezisztencia 2014 első fél évében izolált törzsekben jelentősen alacsonyabb előfordulása, mint az eddigi években volt. Nagyon gyakori továbbra is (közel 90%) a tetraciklinekkel szembeni rezisztencia. Az elmúlt három és fél év alatt rohamosan növekedett (0,8%-ról 40,5%-ra) az azithromycinrezisztens törzsek száma. Az izolátumok között nem találtunk spectinomycinrezisztens törzset.

A 2013. év *N. gonorrhoeae*-izolátumainak Ng-Mast tipizálási eredményeit a 2. táblázat foglalja össze. Közel azonos mennyiségben fordult elő három szekvenciatípus (ST), 20%-ban ST 2992, 18%-ban ST 1407 és ST 4995 típusba voltak besorolhatóak a törzseink. Az ST 225 típus 8%-ban, az ST 8517 típus és az ST 359 típus 4-4%-ban fordultak elő. További 16 ST típus került még vizsgálati anyagunkban kimutatásra, de ezek csak 1% körüli előfordulási gyakorisággal.

2. táblázat | Leggyakrabban előforduló (%) Ng-Mast szekvenciatípusok (ST) Európában [4] és Magyarországon a Semmelweis Egyetem Bőr-, Nemikórtani és Bőronkológiai Klinika vizsgálati anyagában

Előfordulás sorrendje	Európai ST (%)	Semmelweis Egyetem ST
1.	1407 (23%)	2992 (20%)
2.	2992 (7%)	1407 (18%)
3.	225 (5%)	4995 (18%)
4.	25 (2%)	225 (8%)
5.	387 (1%)	8517 (4%)
6.	359 (1%)	359 (4%)

A leggyakrabban izolált 3 ST résztvevőiről elmondható, hogy az azithromycinrezisztencia meglete ezekben a törzsekben gyakori, ST 2992-ben 70%-ban, ST 1407-ben 78%-ban, ST 4995-ben pedig 22%-ban láthatjuk a makrolidrezisztencia előfordulását. A cefiximrezisztens törzs az ST 1407 típusba tartozott, ebben a csoportban gyakori volt a még érzékeny tartományba eső, de az átlagosnál magasabb ceftriaxon-MIC megjelenése is.

Megbeszélés

Az empirikus terápiás javaslatok útmutatójának kialakításakor feltétlenül szükséges ismerni az adott földrajzi területen előforduló kórokozók rezisztenciaviszonyait. 2009–2010-ben az Európai Gonococcus Antimikrobiális Rezisztencia Felügyeleti Program (European Gonococcal Antimicrobial Resistance Surveillance Programme – EURO-GASP) Európa számos országából *N. gonorrhoeae* törzseket gyűjtött össze, elvégezte a törzsek antibiogrammeghatározását és Ng-Mast tipizálását. Az EURO-GASP felmérése keresett először összefüggést a

siker, gyakran előforduló klónok ST-típusa és rezisztenciaadottságai között [4]. A 2. táblázatban látható, hogy saját adataink és az Európában előforduló ST-típusok között van ugyan átfedés, de Magyarországon a sikeresnek mondható törzsek magasabb arányban fordulnak elő, valamint a Magyarországon 18%-ban megjelenő ST 4995 az európai felmérésben nem jelent meg. Ennek lehet a különböző földrajzi elhelyezkedés az oka, vagy az időbeni eltolódás, hiszen az általunk vizsgált törzsek 3 évvel később kerültek izolálásra. Az EURO-GASP adatai alapján az International Union Against Sexually Transmitted Infections (IUSTI, Szexuális Úton Terjedő Betegségek Elleni Nemzetközi Szervezet) elkészítette az új európai kezelési útmutatót [5]. Az IUSTI-ajánlás szerint az Európában is egyre gyakrabban előforduló cefiximrezisztencia és terápiás sikertelenségek miatt az orálisan adott cephalosporinterápia már nem ajánlott, a leggyakrabban előforduló ST-típusok emelkedett ceftriaxon-MIC-értéke miatt pedig a ceftriaxon egyszeri im. dózist is felemelték 500 mg-ra. Ugyanakkor az európai törzsek esetében 2009–2010-ben az azithromycinrezisztencia ritkán fordult elő, így kiegészítő terápiának még 2000 mg per os egyszeri dózis azithromycin ajánlást is tartalmaz az IUSTI-útmutató. Az azithromycin kiegészítő terápiát a koinfekcióként gyakran jelentkező *Chlamydia trachomatis* miatt is indokoltan tartja az IUSTI. A jelenleg készülő új magyarországi irányelv megalkotásában viszont figyelembe kell venni, hogy a közelmúltban izolált *N. gonorrhoeae* törzseink azithromycinrezisztencia-előfordulása ugrásszerűen megnövekedett. A 2014-ben izolált törzsek Ng-Mast tipizálása után megállapítható lesz, hogy a már korábban is sikeres azithromycinrezisztens ST-klónok szaporodtak el még inkább az azithromycinhasználat pozitív szelekciós nyomására, vagy új sikeres azithromycinrezisztens ST-csoportok jelentek meg idén Magyarországon.

Anyagi támogatás: A közlemény megírása, illetve a kapcsolódó kutatómunka anyagi támogatásban nem részesült.

Szerzői munkamegosztás: T. B., T. V., B. A.: A betegek vizsgálata. O. E., N. N. É.: Izolálták és identifikálták a törzseket, elvégezték az antibiogrammeghatározást. B. A.: A retrospektív adatok összegyűjtése. B. A., N. N. É.: Elvégezték a molekuláris szekvencia típusmeghatározását. N. N. É.: Az adatok feldolgozása és rendszerezése. O. E.: A kézirat megírása.

Érdekltségek: A szerzőknek nincsenek érdekltségeik.

Irodalom

- [1] World Health Organization (WHO), Department of Reproductive Health and Research: Global action plan to control the spread and impact of antimicrobial resistance in *Neisseria Gonorrhoeae*. Geneva: WHO, 2012, 1–36. <http://www.who>

int/reproductivehealth/publications/rtis/9789241503501/en/

[2] www.eucast.org

[3] *Martin, I. M., Ison, C. A., Aanensen, D. M., et al.*: Rapid sequence-based identification of gonococcal transmission clusters in a large metropolitan area. *J. Infect. Dis.*, 2004, *189*(8), 1497–1505.

[4] *Chisholm, S. A., Unemo, M., Quaye, N., et al.*: Molecular epidemiological typing within the European Gonococcal Antimicro-

bial Resistance Surveillance Programme reveals predominance of a multidrug-resistant clone. *Euro Surveill.*, 2013, *18*(3), 20358.

[5] *Bignell, C., Unemo, M., European STI Guidelines Editorial Board*: 2012 European Guideline on the Diagnosis and Treatment of Gonorrhoea in Adults. *Int. J. STD AIDS*, 2013, *24*(2), 85–92.

(Ostorházi Eszter dr.,
Budapest, Mária u. 41., 1085
e-mail: droeszter@gmail.com)

RESEARCH

Open Access



Emerging azithromycin-resistance among the *Neisseria gonorrhoeae* strains isolated in Hungary

Alexandra Brunner¹, Eva Nemes-Nikodem², Csaba Jeney³, Dora Szabo³, Marta Marschalko¹, Sarolta Karpati¹ and Eszter Ostorhazi^{3*}

Abstract

Background: In the 1990s, azithromycin became the drug of choice for many infectious diseases but emerging resistance to the drug has only been reported in the last decade. In the last 5 years, the National *Neisseria gonorrhoeae* Reference Laboratory of Hungary (NNGRLH) has also observed an increased number of *N. gonorrhoeae* strains resistant to azithromycin. The aim of this study was to determine the most frequent sequence types (ST) of *N. gonorrhoeae* related to elevated levels of azithromycin MIC (minimal inhibitory concentration). Previously and currently isolated azithromycin-resistant strains have been investigated for the existence of molecular relationship.

Methods: Maldi-Tof technic was applied for the identification of the strains isolated from outpatients attending the reference laboratory. Testing antibiotic susceptibility of azithromycin, cefixime, ceftriaxone, tetracycline, spectinomycin and ciprofloxacin was carried out for all the identified strains, using MIC strip test Liofilchem[®]. *N. gonorrhoeae* multiantigen sequence typing (NG-MAST) was performed exclusively on azithromycin-resistant isolates. A phylogenetic tree was drawn using MEGA6 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0) Neighbour-Joining method.

Results: Out of 192 *N. gonorrhoeae* isolates, 30.0 % (58/192) proved resistant to azithromycin (MIC > 0.5 mg/L). Of the azithromycin-resistant isolates, ST1407, ST4995 and ST11064 were the most prevalent. Based on the phylogenetic analysis, the latter two STs are closely related.

Conclusions: In contrast to West-European countries, in our region, resistance to azithromycin has increased up to 30 % in the last 5 years, so the recommendation of the European Guideline –500 mg of ceftriaxone combined with 2 g of azithromycin as first choice therapy against *N. gonorrhoeae*- should be seriously considered in case of Hungary.

Keywords: Azithromycin-resistance, *Neisseria gonorrhoeae*, Sequence types, Phylogenetic tree

Background

The treatment of gonorrhoea infection poses a continuous problem as *Neisseria gonorrhoeae* has developed resistance to each antimicrobials used in the past 70 years [1]. Therefore, it is necessary to enhance the surveillance of gonococcal antimicrobial resistance, especially for the drugs of first choice: ceftriaxone and azithromycin [2]. In Hungary, resistance to ceftriaxone has not yet

been reported. In contrast, the appearance and spread of azithromycin-resistance have been observed in the last 4 years [3].

Since the 1990s, azithromycin has become the drug of choice for many infections, such as sexually transmitted diseases (STDs), community-acquired pneumonia, acute bacterial sinusitis, otitis media, tonsillitis, pharyngitis, skin infections or acute bacterial exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease [4]. Of STDs, azithromycin is used to treat uncomplicated gonorrhoea in patients with cephalosporin allergy, *Chlamydia trachomatis* coinfection, *Haemophilus ducreyii*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma genitalium* infections. This antibiotic

*Correspondence: ostorhazi.eszter@med.semmelweis-univ.hu

³ Institute of Medical Microbiology, Semmelweis University, 4 Nagyvárad Square, Budapest, Hungary

Full list of author information is available at the end of the article

revolutionised the therapy as it shortened treatment time from 7–14 days to 1–5 days and improved patient compliance due to high tissue levels and long half-life. New administration formulations such as sustained-release microspheres allowed higher doses to be administered and reduced gastrointestinal side-effects, so azithromycin seemed to be capable of approaching the concept of an ideal antibiotic [5]. However, recently decreased antimicrobial susceptibility to azithromycin may disprove this assumption.

According to the data of the European Surveillance of Antimicrobial Consumption (ESAC), in Hungary the outpatient consumption of antimicrobials was 16.0 defined daily doses (DDD) per 1000 inhabitants per day. This number can be subdivided into major antibiotic classes such as penicillins topping the list by DDD of 7.19, macrolides taking the second place with DDD of 2.94 and, finally, cephalosporins with DDD of 2.13 [6].

Nevertheless, at the National *Neisseria gonorrhoeae* Reference Laboratory of Hungary (NNGRLH), we observed the appearance and rapid spread of azithromycin-resistance in Hungary between 2010 and 2013. We aimed to survey the antimicrobial susceptibility in 2014 and compare it with the data of the last 4 years and characterise the azithromycin-resistant strains by NG-MAST.

Molecular evolutionary analysis was conducted and genetic relationships were estimated between the STs spreading in Hungary in 2014.

Methods

Bacterial strains and medical records

The NNGRLH at the STD Centre in the Department of Dermatology, Venerology and Dermatocology of Semmelweis University, Budapest, Hungary collected samples from consecutive symptomatic gonorrhoea patients and from their asymptomatic contacts in 2014. The samples were cultured, characterised and stored on Cryobank breads (Mast Diagnostic, Germany) at -80°C . Clinical data such as sex, age, sexual orientation, anatomic site of infection were recorded. *C. trachomatis* co-infection was also screened. Patients' data were analysed according to law 1997/CLIV 26§ taking into account maximum privacy rights and anonymity of patients [7].

Antibiotic susceptibility

Clinical samples -cervical, anal, urethral and pharyngeal swabs- were obtained and grown on preheated VCA3 agar (Biomérieux, Budapest, Hungary) and on non-selective PVX chocolate agar (Biomérieux, Budapest, Hungary) at 37°C in an atmosphere of 5 % of carbon dioxide for 24–48 h. Minimum inhibitory concentrations (MIC; mg/L) were determined for azithromycin, cefixime, ceftriaxone, tetracycline, spectinomycin and ciprofloxacin

on PVX chocolate agar (Biomérieux, Budapest, Hungary) using MIC strip tests (Liofilchem® s.r.l., Roseto degli Abruzzi, Italy) according to the manufacturer's instructions, using a direct colony suspension equivalent to McFarland standard of 0.5. Testing conditions also included incubation at 36.5°C and 5 % of carbon dioxide for 24 h. All results were interpreted by using breakpoints for susceptibility and resistance according to the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) [8]. Concerning the MIC breakpoints of azithromycin, strains with MICs over 0.25 mg/L but below 0.5 mg/L were considered to be of intermediate resistance. Isolates with MICs higher than 0.5 mg/L were considered resistant. *N. gonorrhoeae* ATCC 49226, with an azithromycin MIC of 0.12 mg/L, was used as a control strain to ensure the quality of the susceptibility tests.

Molecular methods

Out of the 58 resistant and 42 intermediately resistant strains 29 and 21 were selected for *N. gonorrhoeae* multiantigen sequence typing (NG-MAST) according to a previously described method [9]. The sequences of *porB* and *tbpB* PCR products were determined after their preliminary purification by the Exosap IT purification kit (Affymetrix, USA). BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies, USA) was used and the same forward and reverse primers were applied as for *porB* and *tbpB* PCR methods. Last purification was carried out by NucleoSEQ Column PCR Purification Kit (Macherey–Nagel, Germany). Nucleotide sequences were determined by capillary electrophoresis, with a capillary length of 50 cm and POP-7 polymer on ABI 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

NG-MAST STs including the new alleles and STs were assigned on the NG-MAST website (www.ng-mast.net).

Phylogenetic tree was constructed by MEGA6 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0) Neighbour-Joining algorithm, using maximum composite likelihood model [10]. The degree of similarity was determined using the highly similar sequence (Megablast) BLASTN Program of the National Library of Medicine of the National Center for Biotechnology Information [11].

Results

In 2014, 192 *N. gonorrhoeae* strains were isolated at the STD Centre of the Department of Dermatology, Venerology and Dermatocology of Semmelweis University, Budapest, Hungary. The number of patients attending our STD centre makes up about 10 % of the total number of notified gonorrhoea infections in Hungary year by year. However, the ratio of *N. gonorrhoeae* positive patients to total patients examined increased from 7.8 %

in 2013 to 10.85 % by the end of 2014. Of the 192 *N. gonorrhoeae*, 85 % were isolated from male patients (median age 32 years); the remaining strains were collected from females (median age 26 years).

Urethritis was found in 77.3 % of male patients, while in females the dominant anatomical site of infection was the urethra (68.9 %) and cervix (65.5 %). Symptomatic infections or asymptomatic carrier states were detected in the anus (20.2 %/44.8 %) and in the pharynx (17.9 %/24.1 %) in male/female patients, respectively.

All the 192 isolates were susceptible to ceftriaxone and spectinomycin. The prevalence of ciprofloxacin and tetracycline resistance –39.8 and 70 %, respectively–remained as high as in previous years in Hungary. However, the MIC averages of ceftriaxone and cefixime have increased in the last few years. Cefixime MIC exceeded the resistant breakpoints in 1.57 % of the strains.

Of the 192 strains, 92 (48 %) were susceptible to azithromycin and 100 (52 %) exhibited reduced susceptibility. Fifty-eight of these 100 strains –30.0 % of all the strains– were resistant to azithromycin, according to the breakpoints of EUCAST. The percentage of azithromycin resistance showed a significant increase from 15.9 % in 2013 to 30.0 % in 2014 ($\chi^2 = 11.4437$, P value is 0.000717, $P < 0.001$). Concerning the strains with reduced susceptibility to azithromycin, we can say that the ratio of female/male patients was 1–7.3. MICs of ≥ 1 mg/L for azithromycin were observed in 7.0 % (13/192) of the isolated *N. gonorrhoeae* strains out of which three had an MIC of 1.5 mg/L (Additional file 1: Figure S1).

The prevalence of *C. trachomatis* infection detected by multiplex RT-PCR was only 6.7 % in 2014 at the NNGLRH, but *N. gonorrhoeae* positivity was found in 12.2 % of cases. Only 14.7 % of the gonorrhoea-positive samples were co-infected with *C. trachomatis*.

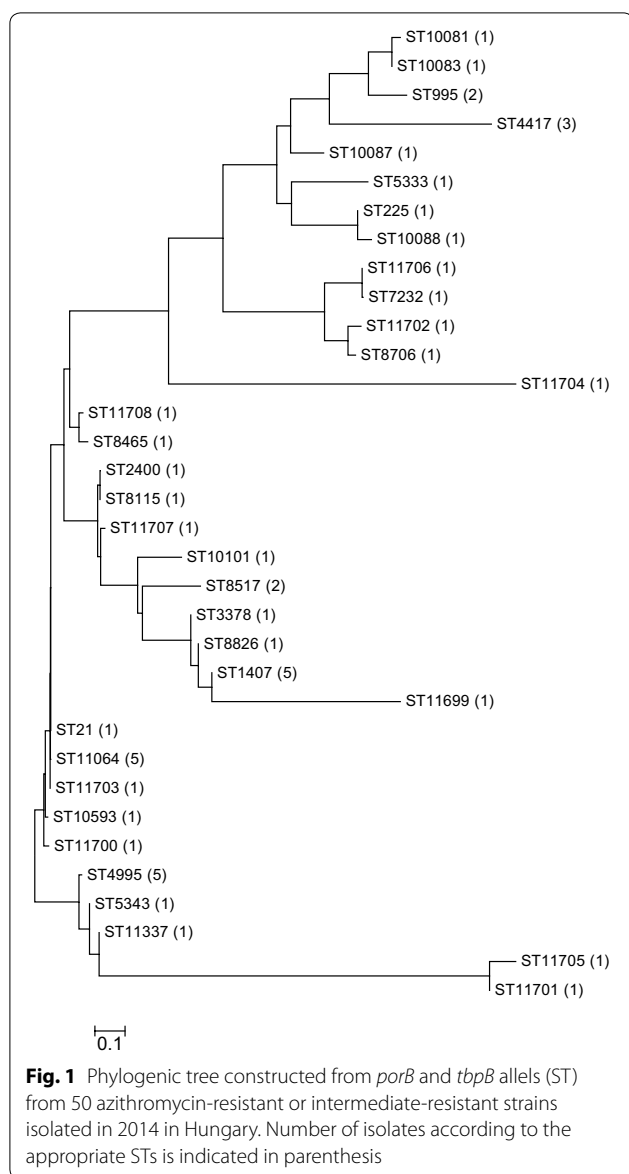
The 50 *N. gonorrhoeae* resistant or intermediate-resistant isolates to azithromycin were divided into 34 NG-MAST sequence types, and a unique NG-MAST sequence type was found for 10 isolates. The three dominant strains were ST1407, ST4995 and ST11064, each represented by 5 isolates (10–10 %). Regarding frequency, these were followed by ST 4417 represented by 3 isolates, then by ST 995 and ST 8517, each represented by 2 isolates. The 29 other STs were represented by only one isolate. Ten new STs, which had not been previously described in the world, were assigned as ST 11699 to ST 11708 on NG-MAST website. Four of them, ST 11703, 11706–11708, due to new allele combinations of known *porB* and *tbpB* alleles, were assigned on the website. The other 6 new STs had new *porB* or *tbpB* alleles (Table 1).

According to the phylogenetic tree in Fig. 1, the azithromycin-resistant and intermediately resistant strains isolated in NNGLRH in 2014 were divided into three major

Table 1 Incidence of sequence types, *porB* and *tbpB* alleles among azithromycin-resistant or intermediate-resistant *N. gonorrhoeae* strains isolated in Hungary in 2014

ST	<i>porB</i> allele	<i>tbpB</i> allele	Number of strains	Azithromycin susceptibility category, number of strains	
				I	R
10081	5921	29	1	1	–
10083	3031	29	1	1	–
995	28	29	2	–	2
4417	2707	894	3	1	2
10087	35	29	1	–	1
5333	3229	137	1	–	1
225	4	4	1	–	1
10088	2700	4	1	1	–
11706	1183	1388	1	–	1
7232	1489	1388	1	–	1
11702	6870	1582	1	1	–
8706	35	1582	1	1	–
11704	6871	2003	1	–	1
11708	1183	18	1	–	1
8465	4864	18	1	–	1
2400	1489	563	1	–	1
8115	3942	563	1	–	1
11707	4864	563	1	–	1
10101	4160	110	1	1	–
8517	1142	1531	2	1	1
3378	2043	110	1	1	–
8826	5213	110	1	–	1
1407	908	110	5	2	3
11699	6867	138	1	1	–
21	14	33	1	–	1
11064	14	1131	5	2	3
11703	1582	1131	1	1	–
10593	581	1131	1	1	–
11700	6868	1131	1	1	–
4995	3031	33	5	3	2
5343	6195	1131	1	–	1
11337	6630	1131	1	–	1
11705	6872	2004	1	1	–
11701	6869	1131	1	–	1
Σ=			50	21	29

groups based on closer relationship. From the most prevalent STs, the first group contained ST225; ST1407 belonged to the second group, whereas the third group contained ST4995 and ST11064. A similarity of at least 96 % can be shown for all members of the third group. The biggest similarity–99 %– was detected between ST21, ST11064 and ST11703. A 98 % similarity between



ST11703 and ST10593, or between ST10593 and ST11700 was detected, but ST11700 and ST11703 demonstrated only a 97 % similarity. With the latter two STs, ST4995 showed a similarity of 96 %. Between ST 4995 and ST5343 or ST11337 a similarity of 97 % was detected.

Discussion

For the treatment of gonorrhoea, the European Guideline, published in 2012, recommends 500 mg of ceftriaxone combined with 2 g of azithromycin as first choice therapy [2]. This dual therapy is supported by European epidemiological surveys, mostly based on western European data. These European epidemiological surveys demonstrate that *C. trachomatis* co-infection is so common in young heterosexual patients under 30 and in MSM

with gonorrhoea that 1 g of azithromycin administered orally as a single dose or 100 mg of doxycycline administered orally twice daily for 7 days should be given unless co-infection has been excluded by NAAT testing.

Since resistance to azithromycin increased from 0 to 30 % in Hungary in the last 5 years, and WHO recommended [1] that an antimicrobial should not be used when >5 % of the strains are resistant, we aimed to conduct an active surveillance to detect recent emergence in Hungary. Our theory for the increasing azithromycin resistance is that, according to ESAC, azithromycin has become the second most commonly used antimicrobial in Hungary. Hence, patients might have been treated previously with azithromycin for an infection, microbiome in the pharynx or anus, could have been exposed to this antibiotic several times, could have acquired resistance and acted as reservoirs of genes [12]. Azithromycin-resistant samples were frequently isolated from the pharynx (21 %) or the anus (32.5 %), which may refer to the fact that the asymptomatic carrier state provides an opportunity for commensal microbiome and *N. gonorrhoeae* to exchange their resistance genes, resulting in a hyperexpression of the efflux pump MtrCDE or mutation in the 23S rRNA [13, 14]. The high percentage of infections in the pharynx and anus do not only involve the risk of acquiring resistance, but also the risk of developing a disseminated infection and the spread of asymptomatic gonorrhoea.

Previously, the most frequent isolated STs were ST2992, ST1407, ST4995 and ST225 in Hungary [15]. In our recent study, three groups of STs based on closer relationship, were observed among azithromycin-resistant or intermediate-resistant *N. gonorrhoeae* strains isolated in Hungary in 2014. The first group contains the previously described ST225; ST1407 belongs to the second group, while ST4995 and ST11064 are included in the third group (Fig. 1). The latter two STs represent the 20 % of the azithromycin-resistant strains but, according to the data of Table 1 and Fig. 1, it can be presumed that more than 30 % of the azithromycin-resistant isolates are closely related in the third group of STs (similarity is at least 96 %). The previously described uniquely high prevalence of ST4995 in Hungary confirms the theory that the isolates of the third neighbourhood group are successful strains in this country, and may cause therapeutic failure in our region in the future. Nevertheless, based on the exact definition of genogroup—one identical allele is shared and the other allele shows a similarity of ≥ 99 % [16]—only ST21, ST11064 and ST11703 make up a genogroup. This genogroup is named G11064, since ST11064 is the predominant ST within the group.

The other prevalently isolated strains in the second group of neighbourhood are associated with ST1407, i.e.

the ST previously described as resistant to ciprofloxacin, tetracycline and strongly associated with decreased susceptibility to cephalosporins [16, 17]. Poorly controlled use of antibiotics may promote the selection and spread of multidrug-resistant strains from this group [18].

The rapid selection of azithromycin-resistant strains in Hungary shows that azithromycin might not be optimised for the treatment of gonorrhoea, neither in monotherapy nor in dual therapy. On the one hand, the question is whether the combination of cephalosporins with azithromycin decreases the MICs of cephalosporins or not. There are some studies which report in vitro synergy between third-generation cephalosporins and azithromycin [19], but others do not [20]. The clinical efficacy of the dual therapy with ceftriaxone and azithromycin could be lower than ceftriaxone monotherapy since the combination was less bactericidal as ceftriaxone alone in a time-kill experiment [21].

On the other hand, we have to investigate the prevalence of *C. trachomatis* co-infection. In Europe, according to ECDC's data, *Chlamydia* is the most frequently reported STD. In 2011, 346911 cases were notified in 25 European countries, and 39179 cases of gonorrhoea were registered. By contrast, in our laboratory twice as many gonorrhoea infections were identified as *Chlamydia* infections; 6.7 % of the samples of the STD centre were *Chlamydia*-positive and 12.2 % were gonorrhoea-positive. These data correlate with those of the National Epidemiological Laboratory, where 1077 cases of *Chlamydia* and 1525 cases of gonorrhoea were recorded in 2013. While the surveys of IUSTI refer to the common prevalence of co-infection, in our laboratory only 14.7 % of the gonorrhoea-positive samples were co-infected with *C. trachomatis*. This also raises the question whether combination therapy is the appropriate treatment in Hungary for gonorrhoea infection. Furthermore, as the increasing azithromycin-resistance and also the emerging cefixime and ceftriaxone MICs threaten the currently recommended therapies for gonorrhoea, it would be essential to replace these antimicrobials with novel ones which have not been used before for gonorrhoea infection in our country. The use of solithromycin, gentamicin, gemifloxacin might be a short term solution, but developing novel antimicrobials is essential [22, 23].

Conclusions

In Hungary, the treatment of gonorrhoea infections relies on the combination therapy of ceftriaxone and azithromycin, recommended by the international guidelines. However, the data of this study should not only draw attention to caution in the use of azithromycin as the sole treatment for gonorrhoea but also to that in the use of combination therapy in Hungary. This study indicates

that the rate of azithromycin-resistant strains is growing in our country year by year. We observed a unique emergence of azithromycin-resistant *N. gonorrhoeae* strains the amount of which has doubled in a period of 1e year. Besides, the strains being the most common in Hungary in 2013, also appeared in 2014 and were associated with azithromycin-resistance. This experience restricts the usefulness of this antibiotic recommended as first-line treatment for gonorrhoea worldwide and argues for regular surveillance to determine azithromycin-susceptibility.

Additional file

Additional file 1: Figure S1. Distribution of azithromycin MIC among *N. gonorrhoeae* strains in 2014.

Abbreviations

ECDC: European Centre for Disease Prevention and Control; ESAC: European Surveillance of Antimicrobial Consumption; EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing; DDD: defined daily doses; IUSTI: International Union against Sexually Transmitted Infections; NG-MAST: *N. gonorrhoeae* multiantigen sequence typing; MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0; MIC: minimal inhibitory concentration; MSM: men who have sex with men; NNGRL: National *Neisseria gonorrhoeae* Reference Laboratory of Hungary; ST: sequence type; STD: sexually transmitted diseases.

Authors' contributions

BA, OE wrote the manuscript. BA, NNE conducted the review of the literature relevant to the paper. MM and SK examined and treated the patients. NNE and OE performed identification and susceptibility testing of the strains. BA, JCS and SZD made the molecular examinations of the strains and prepared the phylogenetic tree. Each author contributed suggestions to the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Author details

¹ Department of Dermatology, Venerology and Dermatocology, Semmelweis University, 41 Mária Street, Budapest, Hungary. ² Department of Laboratory Medicine, Semmelweis University, 41 Mária Street, Budapest, Hungary. ³ Institute of Medical Microbiology, Semmelweis University, 4 Nagyvárad Square, Budapest, Hungary.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests and no specific funding was provided for this study.

Availability of data and materials

Presented in the main paper.

Received: 19 February 2016 Accepted: 13 September 2016

Published online: 20 September 2016

References

1. Tapsall JW. Antibiotic resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. *Clin Infect Dis*. 2005;41:263–8.
2. Bignell C, Unemo M, European STI Guidelines Editorial Board. European guideline on the diagnosis and treatment of Gonorrhoea in adults. *Int J STD AIDS*. 2013;24:85–92.
3. Brunner A, Nemes-Nikodem E, Mihalik N, Marschalko M, Karpati S, Ostorhazi E. Incidence and antimicrobial susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* isolates from patients attending the national *N. gonorrhoeae* reference laboratory of Hungary. *BMC Infect Dis*. 2014;14:433.

4. Steingrímsson O, Ólafsson JH, Þorarinsson H, Ryan RW, Johnson RB, Tilton RC. Azithromycin in the treatment of sexually transmitted disease. *J Antimicrob Chemother.* 1990;25:109–14.
5. Amrol D. Single-dose azithromycin microsphere formulation: a novel delivery system for antibiotics. *Int J Nanomed.* 2007;2:9–12.
6. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Antimicrobial consumption interactive database (ESAC-Net). 2015. http://www.ecdc.europa.eu/en/healthtopics/antimicrobial_resistance/esac-net-database/Pages/database.aspx.
7. Országos Epidemiológiai Központ (OEK)/National Epidemiological Centre. Szexuális úton terjedő betegségek Magyarországon/Sexually transmitted diseases in Hungary 2013. IV. Epiinfo. 2014;5:45–50.
8. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 4.0. 2014. <http://www.eucast.org>.
9. Martin IM, Ison CA, Aanensen DM, Fenton KA, Spratt BG. Rapid sequence-based identification of gonococcal transmission clusters in a large metropolitan area. *J Infect Dis.* 2004;189:1497–505.
10. Tamura K, Stecher G, Peterson D, FilipSKI A, Kumar S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis Version 6.0. *Mol Biol Evol.* 2013;30:2725–9. http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch&PROG_DEF=blastn&BLAST_PROG_DEF=megaBlast&BLAST_SPEC=blast2seq.
11. Kenyon C, Osbak K. Certain attributes of the sexual ecosystem of high-risk MSM have resulted in an altered microbiome with an enhanced propensity to generate and transmit antibiotic resistance. *Med Hypotheses.* 2014;83:196–202.
12. Starnino S, Stefanelli P. *Neisseria gonorrhoeae* Italian Study Group. Azithromycin-resistant *N. gonorrhoeae* strains recently isolated in Italy. *J Antimicrob Chemother.* 2009;63:1200–4.
13. Ng LK, Martin I, Liu G, Bryden L. Mutation in 23S rRNA associated with macrolide resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46:3020–5.
14. Nemes-Nikodém É, Brunner A, Pintér D, Mihalik N, et al. Antimicrobial susceptibility and genotyping analysis of Hungarian *Neisseria gonorrhoeae* strains in 2013. *Acta Microbiol Immunol Hung.* 2014;61:435–45.
15. Chisholm SA, Unemo M, Quaye N, et al. Molecular epidemiological typing within the European gonococcal antimicrobial resistance surveillance programme reveals predominance of a multidrug-resistant clone. *Euro Surveill.* 2013;18:20358.
16. Palmer HM, Young H, Graham C, Dave J. Prediction of antibiotic resistance using *Neisseria gonorrhoeae* multi-antigen sequence typing. *Sex Transm Infect.* 2008;84:280–4.
17. Chisholm SA, Wilson J, Alexander S, Tripodo F, Al-Shahib A, Schaefer U, Lythgow K, Fifer H. An outbreak of high-level azithromycin resistant *Neisseria gonorrhoeae* in England. *Sex Transm Infect.* 2015;92:365–7. doi:10.1136/sextrans-2015-052312.
18. Furuya R, Nakayama H, Kanayama A, et al. *In vitro* synergistic effects of double combinations of beta-lactams and azithromycin against clinical isolates of *Neisseria gonorrhoeae*. *J Infect Chemother.* 2006;12:172–6.
19. Barbee LA, Soge OO, Holmes KK, Golden MR. *In vitro* synergy testing of novel antimicrobial combination therapies against *Neisseria gonorrhoeae*. *J Antimicrob Chemother.* 2014;69:1572–8.
20. Hauser C, Hirzberger L, Unemo M, Furrer H, Endimiani A. *In vitro* activity of fosfomicin alone and in combination with ceftriaxone or azithromycin against clinical *Neisseria gonorrhoeae* isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59:1605–11.
21. Ross JDC, Lewis DA. Cephalosporin resistant *Neisseria gonorrhoeae*: time to consider gentamicin? *Sex Transm Infect.* 2012;88:6–8.
22. Lewis DA. Global resistance of *Neisseria gonorrhoeae*: when theory becomes reality. *Curr Opin Infect Dis.* 2014;27:62–7.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

