

Helicobacter pylori – otpornost na antibiotike u Primorsko-goranskoj županiji

Helicobacter pylori resistance to antibiotics in Primorsko-goranska county

Marina Bubonja-Šonje^{1*}, Palmira Gregorović-Kesovija², Damir Ambrožić¹,

Blanka Pružinec-Popović², Maja Abram³

¹Klinički zavod za kliničku mikrobiologiju, KBC Rijeka, Rijeka

²Nastavni zavod za javno zdravstvo Primorsko-goranske županije, Rijeka

³Zavod za mikrobiologiju i parazitologiju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, Rijeka

Sažetak. Cilj: Niti za jednu bakterijsku infekciju ne postoji toliko različitih terapijskih opcija kao za infekciju koju uzrokuje bakterija *Helicobacter pylori* za koju još uvijek nije pronađen optimalan terapijski pristup. Preporučene terapijske sheme koje se primjenjuju u empirijskom liječenju ovise o otpornosti helikobaktera na antimikrobne lijekove u određenoj regiji. No, empirijsko liječenje infekcije uz sve veći porast otpornosti helikobaktera na antibiotike često ima za ishod terapijski neuspjeh. Cilj ovog rada bio je utvrditi proširenost i trend otpornosti helikobaktera na antibiotike na području Primorsko-goranske županije (PGŽ) u petogodišnjem razdoblju. **Metode:** Statistički su obrađeni i interpretirani rezultati testiranja osjetljivosti *H. pylori* na antibiotike u razdoblju od 2013. do 2017. godine. Podaci su dobiveni iz arhiva Kliničkog zavoda za kliničku mikrobiologiju Kliničkog bolničkog centra Rijeka te Mikrobiološkog odjela Nastavnog zavoda za javno zdravstvo PGŽ-a. **Rezultati:** Zabilježena je visoka stopa otpornosti *H. pylori* na klaritromicin i metronidazol, niska stopa otpornosti na levofloksacin i sporadična otpornost na rifampicin i amoksisilin. U petogodišnjem razdoblju nije izoliran niti jedan soj otporan na tetraciklin. **Zaključci:** Visoka stopa rezistencije na klaritromicin i metronidazol, uz dvojnju rezistencija na oba antibiotika koja je pronađena u četvrtini izolata ograničava korištenje ovih antibiotika u empirijskim terapijskim shemama. Uočena je i zabrinjavajuća pojava višestruke otpornosti na antibiotike prisutna u 10 % izolata koja dodatno otežava izbor odgovarajuće terapije. Praćenje i poznavanje antimikrobne otpornosti lokalnih izolata *H. pylori* neophodno je radi izrade odgovarajućih terapijskih smjernica.

Cljučne riječi: antibiotici; *Helicobacter pylori*; otpornost

Abstract. Aim: There is no bacterial infection with so many different therapeutic options as for infection caused by *Helicobacter pylori* for which an optimal therapeutic approach has not yet been found. Recommended therapeutic schemes depend on *H. pylori* resistance to antimicrobial drugs in a particular region, however, empirical treatment of infections along with increasing resistance to antibiotics often results in a therapeutic failure. The aim of this study was to determine the trend and the prevalence of helicobacter antibiotic resistance in Primorsko-goranska county during the five-year period. **Methods:** This study presents the results of *H. pylori* antimicrobial susceptibility testing from year 2013 to 2017. Data were obtained from the archives of the Department of Clinical Microbiology, Clinical Hospital Centre Rijeka and the Department of Microbiology, Teaching Institute of Public Health of Primorsko-Goranska County. **Results:** High-level resistance to clarithromycin and metronidazole was noticed. Rare resistance to levofloxacin was observed whereas resistance to rifampicin and amoxicillin was found sporadically. Resistance to tetracycline was not detected. **Conclusions:** The high resistance rate to metronidazole and clarithromycin as well as high dual resistance to both antibiotics observed in about a quarter clinical isolates can impair the efficacy of these antimicrobials in empirical eradication treatment. In addition, worrying appearance of multiple resistance to antibiotics in 10 % of isolates was observed. Surveillance of local antimicrobial resistance is necessary in order to establish the relevant treatment guidelines.

Key words: antibiotic resistance; antibiotics; *Helicobacter pylori*

***Dopisni autor:**

Izv. prof. dr. sc. Marina Bubonja-Šonje, dr. med.
Klinički zavod za kliničku mikrobiologiju,
KBC Rijeka
Krešimirova 42, 51 000 Rijeka
e-mail: marina.bubonja@medri.uniri.hr

<http://hrcak.srce.hr/medicina>

UVOD

Helicobacter pylori uzročnik je jedne od najčešćih bakterijskih infekcija u svijetu koji prema procjenama inficira preko 50 % odraslog stanovništva. Istraživanja seroprevalencije ove infekcije u Republici Hrvatskoj pokazuju zastupljenost u 64 % odrasle populacije, dok seropozitivnost u pacijenata s dispepsijom doseže 92 %¹. Otkriće australskih istraživača Marshalla i Warrena da *H. pylori* uzrokuje ulkus želuca dovelo je do dugogodišnje potrage za najučinkovitijom terapijom koja još uvijek nije završena². Niti za jednu drugu bakterijsku infekciju ne postoji toliko različitih terapijskih protokola kao što je to slučaj s infekcijom koju uzrokuje helikobakter. Naime, *H. pylori* prirodno je rezistentan na neke često korištene antibiotike, uključujući vankomicin, trimetoprim i sulfonamide, a kiseli medij želuca umanjuje djelotvornost potencijalno učinkovitih lijekova. Ispitivanja različitih terapijskih protokola pokazala su najveću djelotvornost kombinirane primjene jednog inhibitora protonske pumpe (IPP) i nekoliko različitih antibiotika tijekom 10 do 14 dana³. Inhibicija sekrecije želučane kiseline i porast pH dovode do porasta koncentracije antibiotika te povećanja populacije bakterija u diobi koje tako postaju osjetljivije na određene antibiotike. IPP također inhibiraju pokretljivost bakterija, što onemogućava kolonizaciju želuca. Nakon dokaza infekcije nekom od neinvazivnih dijagnostičkih metoda (ureja izdisajni test, dokaz antigena u stolici) najčešće se započinje s empirijskom terapijom prema smjernicama koje sastavljaju ekspertne radne skupine³. Antibiotici koji se koriste u eradikaciji infekcije helikobakterom podijeljeni su na lijekove prve linije (klaritromicin, metronidazol, amoksicilin) i druge linije (levofloksacin, preparati s bizmutom, tetraciklin). Ako ponovljeno liječenje rezultira neuspjehom, u trećem se pokušaju liječenja, nakon endoskopskog pregleda želuca, provodi kultivacija bioptata želuca i testira osjetljivost izolata. Tada izbor antibiotika ovisi o dobivenom antibiogramu. *H. pylori* je za kultivaciju zahtjevna, spororastuća bakterija koju nije lako izolirati, a sam postupak traje relativno dugo. Pored prethodno spomenutih antibiotika, u nekim se terapijskim protokolima koriste i rifabutin i furazolidon⁴. Generalne preporuke nalažu korištenje najdjelotvor-

njih lijekova iz pojedinih skupina antibiotika. Klaritromicin je makrolidni antibiotik koji ometa sintezu proteina u bakterijskoj stanici. Iako je godinama korišten u eradikaciji helikobaktera kao najučinkovitiji, dobro podnošljiv i siguran antibiotik, rastuća rezistencija na klaritromicin bitno je smanjila uspješnost standardne trojne terapije (IPP + klaritromicin + amoksicilin). Prethodna upotreba klaritromicina, ali i drugih makrolida kao što je azitromicin nosi rizik od razvoja rezistencije. Metronidazol je 5-nitroimidazolski anti-

Liječenje *H. pylori* infekcije u većini je slučajeva empirijsko i temelji se na vjerojatnoj osjetljivosti bakterije na antibiotike. Rastuća rezistencija pridonosi terapijskom neuspjehu. Istraživanja antibiotske osjetljivosti izolata unutar pojedinih zemljopisnih područja omogućavaju bolji odabir terapijske sheme za empirijsko liječenje *H. pylori* infekcije.

protozoarni lijek koji djeluje baktericidno na *H. pylori*. Nakon ulaska u mikroaerofilnu bakterijsku stanicu redukcijom nitro-skupine nastaju slobodni radikali koji oštećuju unutarstanične strukture bakterije uzrokujući letalne mutacija DNK-a⁵. Amoksicilin je beta laktamski antibiotik koji vezanjem na enzime u staničnoj stijenci bakterije (engl. *penicillin binding proteins*, PBP) ometa sintezu peptidoglikana, što dovodi do oštećenja i smrti bakterijske stanice. Na oba antibiotika detektirana je rezistencija *H. pylori*. Prema novijim istraživanjima u Italiji, Sloveniji, Španjolskoj i ostalim mediteranskim zemljama rezistencija na amoksicilin je sporadična, dok je rezistencija na metronidazol izražena⁶⁻⁹. Levofloksacin je fluorokinolon koji se uz amoksicilin i metronidazol koristi kao dio trojne terapije u drugoj liniji liječenja, nakon neuspjeha prve linije, a otpornost helikobaktera na fluorokinolone znatno varira u različitim regijama, ovisno o njihovoj primjeni. Tetraciklini su bakteriostatski antibiotici koji inhibiraju sintezu proteina vežući se na 30S podjedinicu bakterijskog ribosoma. Za razliku od klaritromicina i metronidazola koji potiču nastanak rezistencije, primjena tetraciklina i amoksicilina vrlo rijetko dovodi do razvoja otpornosti u helikobaktera. Rifabutin je pripadnik skupine rifampicina koji sprje-

čavaju sintezu bakterijskog RNK-a. Ovaj antituberkulotik u Hrvatskoj nije registriran za liječenje *H. pylori* infekcije, za koju se u nekim zemljama koristi u sklopu trojne terapije uz IPP i amoksicilin. Bizmut je teški metal s anti-*H. pylori* aktivnošću koji se uz IPP, metronidazol i tetraciklin koristi u sklopu četverostruke terapije zasnovane na bizmutu (engl. *bismuth quadruple therapy*; BQT)¹⁰. U Hrvatskoj je 2017. god. bizmut oksid uvršten na osnovnu listu lijekova Hrvatskog zavoda za zdravstveno osiguranje za drugu liniju liječenja *H. pylori* infekcije.

Ovim istraživanjem utvrđena je vrlo visoka otpornost helicobaktera na klaritromicin i metronidazol te visok stupanj dvojne otpornosti na iste antibiotike, čime se uklapamo u preporuku Europske smjernice za primjenu BQT eradikacijske terapije koja se odnosi na regije s rezistencijom helicobaktera na klaritromicin > 15 % i visokom dvojnomo rezistencijom.

Zabrinjava činjenica da je trend rezistencije *H. pylori* na djelotvorne antibiotike kao što su klaritromicin i metronidazol u porastu, a infekcija rezistentnim sojevima često rezultira terapijskim neuspjehom. Uspjeh liječenja ovisi o mnogim činiteljima kao što su primarna i sekundarna otpornost bakterije na antibiotik, koncentracija lijeka u sluznici, suradljivost pacijenata, nuspojave i cijena lijekova. Budući da prevalencija rezistentnih izolata u pacijenata varira ovisno o zemljopisnoj regiji, izbor terapijskog protokola morao bi između ostalog ovisiti i o regionalnoj (lokalnoj) otpornosti bakterije na antibiotike. U zemljama kao što je Hrvatska, gdje je prema dosadašnjim istraživanjima postotak pacijenata zaraženih sojevima *H. pylori* rezistentnim na klaritromicin > 15 %, klaritromicin se ne bi smio koristiti kao dio trojne empirijske terapije bez prethodno učinjenog antibiograma te se kao prva linija empirijske terapije preporučuje primjena BQT-a³.

S obzirom na uglavnom empirijsku terapiju infekcije i rastući trend rezistencije na pojedine antibiotike, javlja se potreba za novim lokalnim studijama antimikrobne otpornosti *H. pylori*. U članku je ispitana proširenost i trend otpornosti helicobaktera na antibiotike koji su izolirani iz bi-

optata sluznice želuca pacijenata s područja Primorsko-goranske županije (PGŽ) u petogodišnjem razdoblju (2013. do 2017.).

METODE

U radu su obrađeni rezultati testiranja osjetljivosti sojeva na antibiotike koji obuhvaćaju razdoblje od početka siječnja 2013. godine do kraja prosinca 2017. godine, a dobiveni su iz arhiva Kliničkog zavoda za kliničku mikrobiologiju Kliničkog bolničkog centra Rijeka te Mikrobiološkog odjela Nastavnog zavoda za javno zdravstvo PGŽ-a. U rutinskom su laboratorijskom radu sojevi uzgojeni na Columbia agaru (Liofilchem, UK), Mueller-Hinton Fastidious agaru (MH-F, Liofilchem, UK) s dodatkom 5 % konjske krvi i NAD (Himedia, India) te selektivnom Pylori agaru (bioMérieux, Francuska). Hranilišta su inkubirana 5 – 7 dana pri 35 °C u mikroaerofilnim uvjetima uz korištenje CampyPak vrećice (Becton Dickinson, SAD). Iz narasle kulture urađen je mikroskopski preparat obojen prema Gramu. Pripadnost vrsti *Helicobacter* je određena mikroskopskim nalazom karakterističnih gram-negativnih, nježnih, zavnutih bakterija uz pozitivni oksidaza test te dokazanu produkciju ureaze. Osjetljivost sojeva na antibiotike je određena metodom E-testa, korištenjem sljedećih antibiotika: amoksicilin, metronidazol, klaritromicin, levofloksacin, tetraciklin i rifampicin (bioMérieux, Francuska). Određene su minimalne inhibicijske koncentracije antibiotika (MIK), a osjetljivost sojeva je interpretirana prema važećem standardu (engl. *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*; EUCAST)¹¹. Analizirani su jedino primoizolati dok su tzv. "copy" sojevi helicobaktera izolirani tijekom kontrolnih pregleda isključeni iz istraživanja.

Statistika

Rezultati su prikazani deskriptivnom statistikom: relativnim frekvencijama, medijanom kao mjerom srednje vrijednosti i rasponom podataka kao mjerom raspršenosti podataka te slikovno (grafički). Za utvrđivanje statistički značajne razlike u otpornosti sojeva na pojedine antibiotike tijekom dvaju razdoblja (dvije skupine nezavisnih kvalitativnih podataka) korišten je Hi-kvadrat test na razini značajnosti od $p < 0,05$. Statistička analiza

rezultata provedena je primjenom programa Microsoft Excel 2010 i Statistica 12 (Stat. Soft. Inc., Tulsa, SAD).

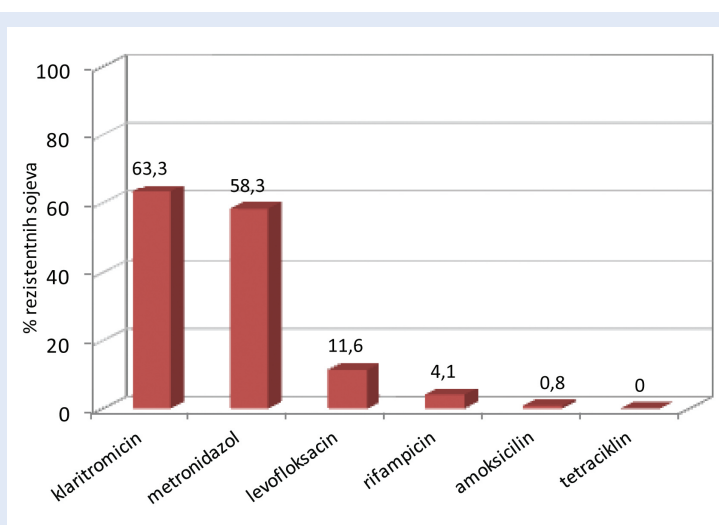
REZULTATI

U petogodišnjem je razdoblju ukupno napravljeno 225 pretraga bioptata želuca na *H. pylori*, koji je izoliran iz 120 kliničkih uzoraka (53 % pozitivnih nalaza). Nešto više od polovine pacijenata (56 %) čiji su bioptati analizirani bili su mlađi od 50 god. (rezultati nisu prikazani). Na slici 1 prikazani su rezultati osjetljivosti izolata na antibiotike u petogodišnjem razdoblju (2013. – 2017.). Može se uočiti izrazito visoka stopa rezistencije na klaritromicin (63,3 %) i metronidazol (58,3 %), dok je rezistencija na levofloksacin niža i iznosi 11,6 %, na rifampicin 4,1 %, na amoksisilin 0,8 %, a niti jedan izolat nije bio rezistentan na tetraciklin.

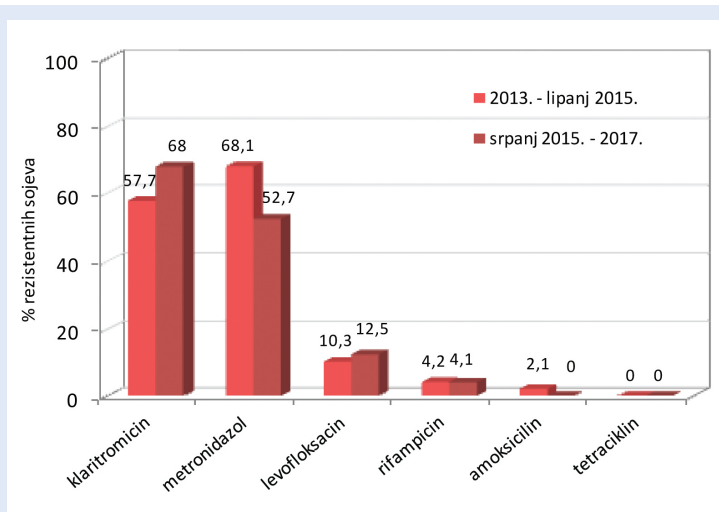
Tablica 1 prikazuje MIK-ove pojedinih antibiotika. Vrijednosti MIK₅₀ i MIK₉₀ klaritromicina su vrlo visoke te iznose 8 mg/l, odnosno 256 mg/l, dok su MIK₅₀ i MIK₉₀ metronidazola još viši i iznose 128 mg/l, odnosno 256 mg/l, što ukazuje na vrlo visok stupanj rezistencije na ove antibiotike. MIK₅₀ levofloksacina se nalazi u osjetljivom rasponu (0,064 mg/l) dok je MIK₉₀ u rezistentom rasponu i iznosi 32 mg/l. Vrijednosti MIK₅₀ i MIK₉₀ rifampicina, amoksisilina i tetraciklina su vrlo niske i nalaze se unutar osjetljivog raspona.

U dvoipolgodisnjem razdoblju od početka 2013. do lipnja 2015. god. izolirano je ukupno 47 sojeva, a u razdoblju od srpnja 2015. do kraja 2017. god. 73 soja. Slika 2 prikazuje usporedbu rezistencije izolata na pojedine antibiotike u navedenim razdobljima. Iako se rezistencija na klaritromicin povećala s 57,7 % na 68,0 %, razlika nije statistički značajna ($p = 0,238$). Udio sojeva rezistentnih na metronidazol smanjio se sa 68,1 % na 52,7 %, što također nije statistički značajno ($p = 0,097$). Niti porast rezistencije na levofloksacin s 10,3 na 12,5 % nije značajan ($p = 0,750$). Udio izolata rezistentnih na ostale antibiotike u uspoređenim dvoipolgodisnjim razdobljima je vrlo malen i nije se značajno mijenjao.

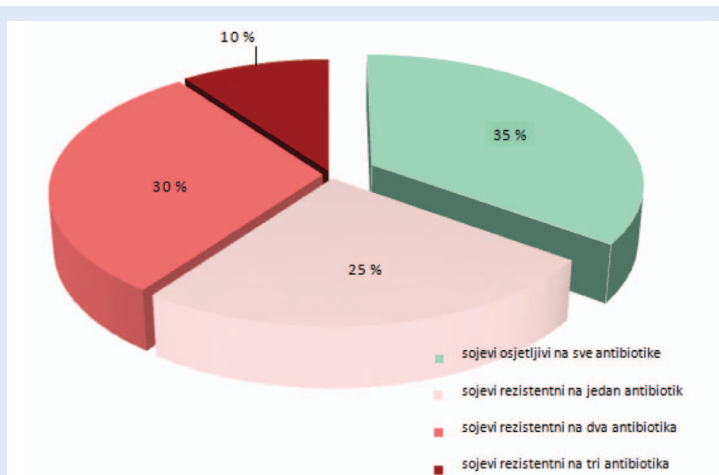
Nadalje, podaci su analizirani s obzirom na rezistenciju izolata na jedan ili više antibiotika (slika 3). Rezistencija bakterije na tri i više skupina anti-



Slika 1. Antibiotička rezistencija *H. pylori* u razdoblju od 2013. do 2017. god.



Slika 2. Usporedba rezistencije izolata na pojedine antibiotike u dvoipolgodisnjim razdobljima



Slika 3. Analiza osjetljivosti izolata *H. pylori*

Tablica 1. Minimalne inhibicijske koncentracije pojedinih antibiotika na *H. pylori*

| Antibiotik | MIK (mg/l) | | | Granične vrijednosti MIK-a (mg/l) R > |
|---------------|-------------------|-------------------|----------------|--|
| | MIK ₅₀ | MIK ₉₀ | raspon MIK-ova | |
| Klaritromicin | 8 | > 256 | 0,016 ≥ 256 | 0,5 |
| Metronidazol | 128 | > 256 | 0,016 ≥ 256 | 8 |
| Levofloksacin | 0,064 | 32 | 0,002 ≥ 32 | 1 |
| Rifampicin | 0,38 | 0,95 | 0,002 ≥ 32 | 1 |
| Amoksisilin | 0,016 | 0,047 | 0,016 – 0,25 | 0,125 |
| Tetraciklin | 0,023 | 0,094 | 0,016 – 0,125 | 1 |

R = otporan; S = osjetljiv; MIK = minimalna inhibicijska koncentracija; MIK₅₀ (medijan) = vrijednost MIK-a pri kojoj je 50 % izolata inhibirano; MIK₉₀ (90 percentila) = vrijednost MIK-a pri kojoj je 90 % izolata inhibirano

Tablica 2. Analiza osjetljivosti helikobaktera na pojedine antibiotike

| | Antibiotici | Postotak otpornih sojeva |
|--------------------------------|---|--------------------------|
| Monorezistencija | Klaritromicin | 15 |
| | Metronidazol | 10 |
| | Levofloksacin | 1 |
| Dvojna rezistencija | Klaritromicin + metronidazol | 26 |
| | Klaritromicin + levofloksacin | 3 |
| | Klaritromicin + rifampicin | 1 |
| Višestruka rezistencija | Klaritromicin + metronidazol + levofloksacin | 7 |
| | Klaritromicin + metronidazol + rifampicin | 2 |
| | Klaritromicin + metronidazol + levofloksacin + rifampicin | 1 |

biotika definirana je kao višestruka rezistencija. Nešto više od trećine izolata osjetljivo je na sve antibiotike, dok su dvije trećine izolata rezistentne na jedan ili više antibiotika. Četvrtina sojeva je rezistentna na jedan antibiotik, nešto veći udio sojeva je istovremeno rezistentan na dva antibiotika, dok je 10 % izolata rezistentno na tri ili čak četiri antibiotika. Iz tablice 2 može se uočiti da je među sojevima rezistentnim na samo jedan antibiotik najveći broj onih koji su rezistentni na klaritromicin, dok je nešto manji broj sojeva rezistentan samo na metronidazol. Nešto više od četvrtine izolata istovremeno je rezistentno na klaritromicin i metronidazol, 9 % izolata je uz klaritromicin i metronidazol rezistentno i na levofloksacin ili rifampicin dok 1 % sojeva pokazuje otpornost na sva četiri antibiotika.

RASPRAVA

Otpornost bakterija na antibiotike predstavlja globalnu prijetnju, a proširenost otpornosti helikobaktera na pojedine antibiotike varira u različitim zemljopisnim područjima i u izravnoj je korelaciji s upotrebom antibiotika u tim područjima. Razlog čestog neuspjeha eradikacije heliko-

baktera je empirijsko liječenje bez prethodnih podataka o osjetljivosti sojeva te sve veći porast rezistencije helikobaktera na antibiotike. Ovim je istraživanjem u petogodišnjem razdoblju utvrđena izrazito visoka otpornost helikobaktera izoliranih iz bioptata želuca pacijenata iz područja PGŽ-a na klaritromicin koja premašuje 60 %. Otpornost helikobaktera na klaritromicin je od osobitog kliničkog značaja i često ima za posljedicu terapijski neuspjeh. Protokoli liječenja klaritromicinom stoga se ne preporučuju kao prva linija eradikacijske terapije u regijama s klaritromicinskom rezistencijom > 15 % (u koju pripada i Hrvatska), a njegova je primjena opravdana samo ako se dokaže osjetljivost izolata. Do razvoja otpornosti na klaritromicin dolazi brzo jer je mehanizam nastanka točkasta mutacija u 23S rRNK genu koja rezultira stabilnom rezistencijom helikobaktera na sve makrolide¹².

Otpornost helikobaktera na antibiotike može biti primarna, što podrazumijeva njihovu neučinkovitost i prije pokušaja liječenja, tj. izlaganja bakterije lijeku ili sekundarna koja se razvija tijekom izloženosti antibiotiku. Europske i hrvatske smjernice ekspertnih skupina preporučuju empirijsko

eradikacijsko liječenje pacijenata s dispeptičnim tegobama koji su mladi od 50 godina, bez alarmantnih simptoma i s dokazanom infekcijom helikobakterom. Do 2017. god. u regijama s visokom primarnom rezistencijom na klaritromicin kao što je Hrvatska, za prvu liniju eradikacije bila je preporučena sekvencijska terapija (IPP s amoksicilinom, nakon čega slijedi IPP s klaritromicinom i metronidazolom) ili četverostruka konkomitantna terapija (IPP istovremeno sa sva tri navedena antibiotika)^{3,13}. Nešto više od polovine pacijenata čiji su klinički izolati *H. pylori* analizirani u ovom istraživanju bilo je mlađe od 50 godina, a podaci o prethodnoj eradikacijskoj terapiji ili uzimanju antibiotika nisu poznati, što je zapravo i ograničenje ove retrospektivne studije. S obzirom na prethodno navedene terapijske preporuke može se pretpostaviti da je veći broj pacijenata dobio empirijsku terapiju koja je uključivala antibiotike prve linije, te su nakon neuspjeha prvog, i eventualno drugog pokušaja liječenja upućeni na specijalistički pregled i biopsiju želuca da bi se učinio test osjetljivosti. Stoga možemo pretpostaviti da je većina izoliranih bakterija bila izložena klaritromicinu i metronidazolu nakon čega su razvili sekundarnu otpornost na navedene antibiotike. Ovim istraživanjem pacijenata s područja PGŽ-a utvrđeno je da rezistencija helikobaktera na metronidazol, lijek prve eradikacijske linije, gotovo doseže stupanj rezistencije na klaritromicin s izrazito visokim vrijednostima minimalne inhibicijske koncentracije MIK_{50} i MIK_{90} . Rezistencija na metronidazol se lako stječe, bilo kao posljedica smanjenog ulaska lijeka u bakterijsku stanicu ili zbog zadržavanja lijeka u njegovom neaktivnom obliku prekidom elektronskog transportnog lanca¹⁴. Inaktivacija NADPH nitroreduktaza gena (*rdxA*), koji je neophodan za unutarstaničnu aktivaciju metronidazola, predstavlja molekularnu osnovu za drugi i češći mehanizam rezistencije¹⁵. Istraživanja pokazuju da mutacije drugih gena, kao što je *frxA*, mogu u konačnici posredovati svoj učinak kroz smanjenu ekspresiju *rdxA* gena, čime autori objašnjavaju otpornost na metronidazol u sojeva bez mutacije u *rdxA* regiji¹⁶. Smjernice s posljednje Konsenzusne konferencije Europskog društva za proučavanje helikobaktera (engl. *The European Helicobacter Study Group*) "Maastricht V" iz 2017. god. za regije s visokom klaritromicinskom

rezistencijom kao što je Hrvatska preporučuju izbor terapije ovisno o proširenosti otpornosti na metronidazol te proširenosti dvojne otpornosti na klaritromicin i metronidazol. Ovim je istraživanjem na području PGŽ-a utvrđena dvojna rezistencija na ove antibiotike prve linije koja je viša od granične vrijednosti (15 %) za koju se smatra da rezultira terapijskim neuspjehom. Budući da visoka dvojna rezistencija rezultira neuspjehom u svim ne-BQT tretmanima u prvoj se liniji empirijske terapije preporučuje BQT³. Ipak, za razliku od rezistencije na klaritromicin, rezistencija na metronidazol može dijelom biti prevladana povećanjem doze antibiotika, što se onda koristi u nekim modifikacijama terapijskih protokola koji uključuju metronidazol¹⁷. Usporedbom rezistencije izolata u dvoipolgodisnjim razdobljima nije uočena promjena trenda, tj. trend rezistencije na klaritromicin i metronidazol u PGŽ-u je stabilan.

Pretpostavljamo da je petogodišnje razdoblje prekratko da bi se uočila promjena trenda koja bi se vjerojatno očitovala tijekom duljeg razdoblja. Dosadašnja istraživanja osjetljivosti *H. pylori* na antibiotike provedena u Hrvatskoj nisu obuhvatila područje PGŽ-a. Kada se petogodišnji podaci iz ove studije (otpornost na klaritromicin 63 %, otpornost na metronidazol 58 %) usporede sa studijom Bage i sur. koji su analizirali otpornost izolata na području središnje Hrvatske u razdoblju od 2005. do 2008. god. (otpornost na klaritromicin 10 %, otpornost na metronidazol 33 %), uočava se znatan porat trenda rezistencije na oba antibiotika¹⁸. Isto se može uočiti usporedbom dobivenih rezultata s rezultatima Tonkića i sur. koji su na području Splitsko-dalmatinske županije 2008. – 2010. god. utvrdili primarnu otpornost na klaritromicin od 21 % te otpornost na metronidazol od 10 %¹⁹. I dok je navedenom studijom provedenom prije deset godina u srednjoj Dalmaciji utvrđena otpornost na levofloksacin od 4 %, ovim istraživanjem je na području PGŽ-a utvrđena otpornost izolata na levofloksacin od 11 %¹⁹. Iako se eradikacijska terapija zasnovana na levofloksacinu smatra učinkovitijom od četverostruke konkomitantne terapije, pojavljuje se problem rastuće rezistencije. Ovaj antibiotik u Hrvatskoj još nije registriran za liječenje infekcije uzrokovane helikobakterom. Kao i ostali kinoloni levofloksacin inhibira enzim DNK girazu odgovo-

ran za sintezu bakterijskog DNK-a, a mutacije u *gyrA* ili *gyrB* genu koji kodiraju podjedinice enzima brzo dovode do otpornosti na levofloksacin i ostale lijekove iste skupine²⁰. Rezistencija na kinolone, antibiotike širokog spektra koji se koriste za liječenje različitih infekcija brzo se širi i sve je veća.

Amoksicilin se, između ostalog, nalazi u prvoj terapijskoj liniji infekcije helicobakterom zbog vrlo niske stope rezistencije. Prethodno navedenim istraživanjima primarne rezistencije *H. pylori* provedenim u drugim regijama Hrvatske nisu izolirani sojevi rezistentni na amoksicilin^{18,19}. Našim istraživanjem utvrđena je vrlo niska otpornost izolata na amoksicilin koja je iznosila < 1 %. Razvoj rezistencije na amoksicilin vrlo je složen, a otpornost se može izgubiti nakon smrzavanja bakterijskog soja, što je neobično, stoga se u literaturi češće naziva "intolerancijom". Glavni mehanizam rezistencije na amoksicilin su višestruke mutacije u *pbp* genu koje dovode do smanjenja afiniteta vezanja amoksicilina za PBP enzim²⁰.

Europske smjernice "Maastricht V" iz 2017. god. preporučuju BQT eradikacijsku terapiju koja uključuje tetraciklin za područja s rezistencijom na klaritromicin > 15 %. Naime, BQT terapija je najmanje ovisna o rezistenciji bakterija. Do sada nije opisana rezistencija *H. pylori* na preparate bizmuta, a primarna antibiotska rezistencija na tetraciklin je izuzetno rijetka i ne očekuje se da se razvije tijekom liječenja. Analizom izolata helicobaktera u petogodišnjem periodu na području PGŽ-a nije pronađen niti jedan soj rezistentan na tetraciklin, dok je 26 % sojeva imalo dvojnju rezistenciju na metronidazol i klaritromicin, što govori u prilog izbora BQT terapijske sheme. Ovom je studijom na području PGŽ-a utvrđena niska stopa rezistencije na rifampicin prisutna u 4,1 % izolata. Rifabutin je derivat rifampicina s istim mehanizmom rezistencije helicobaktera, a to je mutacija u B podjedinici enzima RNK polimeraze koja tako ima smanjeni afinitet za antibiotik²¹. Zbog niske prevalencije rezistencije i njezinog sporijeg razvoja, terapijske sheme s rifabutinom i amoksicilinom mogu biti korisna alternativa za liječenje infekcija uzrokovanih višestruko otpornim sojevima. Naime, zabrinjava činjenica da je u čak 10 % izolata *H. pylori* na području PGŽ-a utvrđena višestruka rezistencija, a

sojevi su uz klaritromicin i metronidazol bili rezistentni na levofloksacin ili rjeđe, rifampicin.

Optimalni izbor antibiotske sheme i trajanja liječenja ovisi o lokalnoj proširenosti rezistencije na pojedine antibiotike. Uspjeh liječenja ovisi o vjerojatnosti infekcije rezistentnim sojem i prethodnom uzimanju antibiotika. Terapijski protokol mora biti jednostavan, jeftin i dobro podnošljiv kako bi ga pacijent što lakše i potpunije proveo. Brojna istraživanja pokazuju da uzimanje probiotika smanjuje nuspojave antibiotika što utječe na veću suradljivost pacijenata pri uzimanju terapije³. Dodatno, sve je više podataka o povećanju uspješnosti eradikacije infekcije *H. pylori* primjenom probiotika²². Do potencijalnog razvoja novih antibiotika važeća terapija zasniva se na različitim kombinacijama poznatih antibiotika i antisekretornih lijekova. Ohrabruje razvoj novih dijagnostičkih metoda kao što su dokaz infekcije i antimikrobne osjetljivosti helicobaktera iz neinvazivnih uzoraka kao što je stolica^{23,24}.

Razvoj komercijalnih testova te uvođenje ovih molekularnih dijagnostičkih metoda u rutinsku dijagnostiku vjerojatno će u budućnosti učiniti dostupnijim terapijski pristup zasnovan na testiranju osjetljivosti sojeva.

ZAKLJUČCI

Prema dostupnim podacima ovo je prvo istraživanje osjetljivosti/rezistencije *H. pylori* na antibiotike na području PGŽ-a.

H. pylori je visoko rezistentan na klaritromicin i metronidazol (56 %, 52 %) s visokom dvojnju rezistencijom u 26 % izolata. Otpornost na levofloksacin je niska (13 %), a otpornost na amoksicilin i rifampicin sporadična, dok na tetraciklin nije zabilježena.

Zabrinjava podatak o višestrukoj rezistenciji u 10 % izolata *H. pylori* koji su uz klaritromicin i metronidazol otporni i na levofloksacin (rjeđe rifampicin) s obzirom na neizvjesnu skorašnju dostupnost novih antibiotika u liječenju ove infekcije.

Praćenje rezistencije *H. pylori* na regionalnoj (lokalnoj) razini važno je da bismo mogli odabrati učinkovit terapijski pristup liječenju ove kronične infekcije.

Izjava o sukobu interesa: autori izjavljuju da ne postoji sukob interesa.

LITERATURA

1. Marušić M, Presečki V, Katičić M, Bilić A, Jurčić D, Schwarz D. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* infection in dyspeptic patients. *Coll antropol* 2008;32:1149-53.
2. Marshall BJ, Warren RM. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1984;16:1311-5.
3. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain CA, Gisbert JP, Kuipers EJ, Axon AT et al. Management of *Helicobacter pylori* infection-the Maastricht V/Florence Consensus Report. *Gut* 2017;66:6-30.
4. Chey WD, Leontiadis GI, Howden CW, Moss SF. ACG Clinical Guideline: Treatment of *Helicobacter pylori* Infection. *Am J Gastroenterol* 2017;112:212-39.
5. Edwards DI. Nitroimidazole drugs-action and resistance mechanisms I. Mechanisms of action. *J Antimicrob Chemother* 1993;31:19-20.
6. Di Giulio M, Di Campi E, Di Bartolomeo S, Cataldi V, Marzio L, Grossi L et al. *In vitro* antimicrobial susceptibility of *Helicobacter pylori* to nine antibiotics currently used in central Italy. *Scand J Gastroenterol* 2016;51:263-9.
7. Tepes B, Kastelic M, Vujasinovic M, Lampic P, Seruga M, Brglez Jurecic N et al. *Helicobacter pylori* treatment results in Slovenia in the period 2013-2015 as a part of European Registry on *Helicobacter pylori* Management. *Radiol Oncol* 2017;52:1-6.
8. Macias-Garcia F, Llovo-Taboada J, Diaz-Lopez M, Baston-Rey I, Dominguez-Munoz JE. High primary antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* strains isolated from dyspeptic patients: A prevalence cross-sectional study in Spain. *Helicobacter* 2017; Forthcoming.
9. Abdoh Q, Kharraz L, Ayoub K, Khraim J, Awad W, Sbeah A et al. *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics at the An-Najah National University Hospital: a cross-sectional study. *Lancet* 2018; Forthcoming.
10. Dos Santos AA, Carvalho AA. Pharmacological therapy used in the elimination of *Helicobacter pylori* infection: a review. *World J Gastroenterol* 2015;21:139-54.
11. EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters (v8.0), 2018. [Internet] [cited 2018 Feb 1]. Available from: <http://www.eucast.org/>.
12. Versalovic J, Shortridge D, Kibler K, Griffi MV, Beyer J, Flamm RK et al. Mutations in 23S rRNA are associated with clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40:477-80.
13. Katičić M, Duvnjak N, Filipec Kanižaj T, Krznarić Ž, Marušić M, Mihaljević S et al. Hrvatski postupnik za dijagno-
- stiku i terapiju infekcije *Helicobacterom pylori*. *Liječ Vjesn* 2014;136:1-17.
14. Jenks PJ, Ferrero RL, Labigne A. The role of the *rdxA* gene in the evolution of metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. *J Antimicrob Chemother* 1999;43:753-8.
15. Matteo MJ, Perez CV, Domingo MR, Olmos M, Sanchez C, Catalano M. DNA sequence analysis of *rdxA* and *frxA* from paired metronidazole-sensitive and -resistant *Helicobacter pylori* isolates obtained from patients with heteroresistance. *Int J Antimicrob Agents* 2006;27:152-8.
16. Jenks PJ, Edwards DI. Metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. *Int J Antimicrob Agents* 2002;19:1-7.
17. Bardhan K, Bayerdorffer E, Veldhuyzen van Zanten SJ, Lind T, Megraud F, Delchier JC et al. The HOMER Study: the effect of increasing the dose of metronidazole when given with omeprazole and amoxicillin to cure *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 2000;5:196-201.
18. Bago J, Majstorović K, Bakula V, Troškot-Perić R, Marušić M, Belošić-Halle Ž et al. Primary antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* in patients with dyspepsia in Croatia over the period from March 2005 to July 2008. *Helicobacter* 2009;14:409-10.
19. Tonkić A, Tonkić M, Brnić D, Novak A, Puljiz Ž, Šimunić M. Time trends of primary antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* isolates in Southern Croatia. *J Chemother* 2012;24:182-4.
20. Mascellino MT, Porowska B, De Angelis M, Oliva A. Antibiotic susceptibility, heteroresistance, and updated treatment strategies in *Helicobacter pylori* infection. *Drug Des Devel Ther* 2017;28:2209-20.
21. Heep M, Beck D, Bayerdorffer E, Lehn N. Rifampin and rifabutin resistance mechanism in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:1497-9.
22. Hauser G, Salkic N, Vukelic K, Jajac Knez A, Stimac D. Probiotics for standard triple *Helicobacter pylori* eradication: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Medicine (Baltimore)* [Internet]. 2015;94 [cited 2018 Feb 1] Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4603068>.
23. Beckman E, Saracino I, Fiorini G, Clark C, Slepnev V, Patel D et al. A novel stool PCR test for *Helicobacter pylori* may predict clarithromycin resistance and eradication of infection at a high rate. *J Clin Microbiol* 2017;55:2400-5.
24. Redondo JJ, Keller PM, Zbinden R, Wagner KA. Novel RT-PCR for the detection of *Helicobacter pylori* and identification of clarithromycin resistance mediated by mutations in the 23S rRNA gene. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2018;90:1-6.