

Primarna odpornost bakterije *Helicobacter pylori*

Primary resistance of *Helicobacter pylori*

Samo Jeverica,¹ Bojan Tepeš,² Alojz Ihan,¹ Miha Skvarč¹

¹ Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, MF Ljubljana

² Abakus Medico, Diagnostični center Rogaška

Korespondenca/ Correspondence:

asist. Samo Jeverica, dr. med., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, MF Ljubljana, Zaloška 4, 1000 Ljubljana, e-naslov: samo.jeverica@mf.uni-lj.si

Ključne besede:

Helicobacter pylori, primarna odpornost

Key words:

Helicobacter pylori, primary resistance

Citirajte kot/Cite as:

Zdrav Vestn 2010; 79: 25–30

Prispelo: 3. jun. 2009,
Sprejeto: 2. dec. 2009

Izvleček

Izhodišča: Odpornost bakterije *Helicobacter pylori* proti antibiotikom, posebej metronidazolu in klaritromicinu, je eden izmed glavnih vzrokov neuspešnosti začetnega eradikacijskega zdravljenja. Uspešnost zdravljenja je v večini držav nižja od 80 %, tako je tudi v Sloveniji. S študijo smo želeli izmeriti primarno odpornost proti tarčnim antibiotikom, ki jih uporabljamo za zdravljenje okužbe.

Metode: Med letoma 2007 in 2009 smo osamili 97 zaporednih izolatov pri nezdravljenih bolnikih. Fenotipsko smo določili občutljivost na tipične antibiotike z uporabo Etestov in mejne agar dilucijske metode. Rezultate smo prikazali z deležem odpornosti in s pomočjo porazdelitve profilov odpornosti posameznih fenotipov bakterije.

Rezultati: V naši skupini izolatov smo ugotovili 18,6-odstotno odpornost proti metronidazolu in 17,5-odstotno odpornost proti klaritromicinu. Ugotovili smo, da je kombinirana odpornost proti metronidazolu in klaritromicinu 4,1 %. Odpornosti proti amoksicilinu in tetraciklinu nismo zaznali. Odpornost proti ciprofloksacinu znaša 3,1 %.

Zaključki: Menimo, da je potrebno sistematično spremljati primarno odpornost bakterije *Helicobacter pylori*, saj bomo le tako lahko uspešno prilagajali naša priporočila glede začetnega eradikacijskega zdravljenja. Potrebno je zagotoviti ustrezne vire, da bo takšno spremljanje mogoče.

Abstract

Background: Antimicrobial resistance, particularly against metronidazole and clarithromycin, is the leading cause for treatment failure of *Helicobacter pylori* infection. Eradication rates of primary therapy have fallen below 80% in the majority of states including Slovenia. The aim of the study was to assess primary resistance to key antibiotics used for eradication treatment.

Patients and methods: Between 2007 and 2009 we isolated 97 strains of *Helicobacter pylori* from the treatment naive patients who have not previously underwent eradication treatment. Antimicrobial susceptibility testing was done using phenotypical methods, Etests and breakpoint agar dilution method for metronidazole. We analyzed resistance profiles of the isolated bacteria and presented distribution of different phenotypes of *Helicobacter pylori*.

Results: The primary antimicrobial resistance for metronidazole and clarithromycin was 18.6% and 17.5%, respectively. Combined resistance for both metronidazole and clarithromycin was 4.1%. In our group of isolates we did not find any resistance against amoxicillin and tetracycline. 3.1% of isolates were ciprofloxacin resistant.

Conclusions: Systematic surveillance of antimicrobial resistance of *Helicobacter pylori* is mandatory to adjust primary and subsequent eradication therapy. Performing antimicrobial susceptibility testing is a costly method and that is why it is important to find resources to make it possible.

Uvod

Okužbe z bakterijo *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) v marsičem ne obravnavamo kot običajno bakterijsko okužbo. Za običajne bakterijske okužbe velja, da njihovo zdravljenje temelji na rezultatih protimikrobne občutljivosti. V začetni fazi bolezni zdravimo izkustveno, na podlagi zbirnih antibiogramov, v kasnejši fazi bolezni pa usmerjeno, na podlagi specifičnega antibiograma za bolnikov izolat. Začetno zdravljenje tako temelji na čim večji verjetnosti, da bomo z izbranim antibiotikom pokrili najverjetnejšega povzročitelja okužbe. Kadar nismo uspešni z izbranim izkustvenim zdravljenjem, antibiotik prilagodimo glede na rezultate specifičnega antibiograma. Stopnja odpornosti, ki antibiotik največkrat izključi iz priporočil za izkustveno zdravljenje, je v večini primerov postavljena na 10 %.

V primeru okužbe z bakterijo *H. pylori* antibiotično zdravljenje temelji na uspešnosti posameznih antibiotičnih shem, ki so bile preizkušene v različnih kliničnih poskusih in večinoma temeljijo tudi na zbirnih podatkih o občutljivosti bakterije. Le izjemoma pred začetnim zdravljenjem opravimo kulturo in antibiogram ter temu prilagodimo začetno zdravljenje. Priporočene sheme začetnega zdravljenja so v zgodnjem obdobju zdravljenja okužbe dosegale visoko stopnjo uspešnosti, vsaj 90 %. Uspešnost zdravljenja je danes večinoma nižja od 80 %.^{1,2} Tritirna shema, ki vključuje zaviralec protonske črpalke (ZPČ) in amoksicilin v kombinaciji s klaritromicinom ali metronidazolom, je ob predpostavki, da primarna odpornost bakterije *H. pylori* proti klaritromicinu in metronidazolu ni višja od 15–20 % in 40 %, še vedno priporočena shema v veljavnih priporočilih Maastricht III.³ Uspešnost omenjene tritirne sheme danes v večini držav ne presega uspešnosti, ki bi bila večja od 80 %¹ in je v nekaterih študijah nižja od 60 %.² Vzrok padanja uspešnosti izkoreninjenja bakterije največkrat razlagamo z vse večjo stopnjo odpornosti bakterije *H. pylori* proti antibiotikom, predvsem proti klaritromicinu in metronidazolu,^{1–3} ki spada skupaj z amoksicilinom med tri ključne antibiotike za uspešno zdravljenje te okužbe.

Čeprav je okužba z bakterijo *Helicobacter pylori* v razvitem svetu vse redkejša, njen pomen v etiologiji kroničnega gastritisa, ulkusne bolezni želodca in večine primerov raka želodca ostaja nesporen.⁴ V Sloveniji smo v zadnjih petnajstih letih opazili prepolovitev prevalence okužbe, ki po nekaterih podatkih v povprečju znaša dobrih 25 %, v populaciji starejših od 60 let pa dobrih 50 %.⁵ Kljub omejenim indikacijam za zdravljenje in vse redkejši okužbi s to bakterijo, pa še vedno veliko ljudi tudi v današnjem času potrebuje antibiotično zdravljenje. Ocenjujejo, da je takšnih bolnikov približno 20 %.⁶ Kakršno koli zdravljenje pa mora temeljiti na preverjenih podatkih o stopnji odpornosti bakterije *H. pylori* in uspešnosti eradikacijskega zdravljenja.

Metode

V obdobju med letoma 2007 in 2009 smo vsem bolnikom, pri katerih je bila indicirana gastroskopija v okviru rutinske diagnostike, odvzeli biopsijo želodčne sluznice za kulturo in določitev občutljivosti. Biopete smo vložili v transportno gojišče Portagerm pylori (Biomerieux, Francija) in ga z običajno pošto poslali na Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo MF Ljubljana. Za kulturo smo uporabili najmanj dve obogateni gojišči, po eno selektivno in eno neselektivno. Kulturo smo inkubirali dvakrat 72 ur v mikroaerofilni atmosferi na 35 °C. V primeru pozitivne kulture smo določili občutljivost bakterije proti petim antibiotikom: amoksicilinu, ciprofloksacinu, klaritromicinu, metronidazolu in tetraciklinu. Občutljivost smo izvedli z Etesti (Biomerieux, Francija) na agarju Mueller Hinton z dodano 5-odstotno staro ovčjo krvjo. Rezultate smo interpretirali v skladu s CLSI standardi M100–S19 za klaritromicin, ki postavlja mejo za odpornost na $\geq 1 \mu\text{g/mL}$. Amoksicilin, metronidazol in tetraciklin smo interpretirali po navodilih proizvajalca z mejnimi vrednostmi za odpornost ≥ 4 , ≥ 16 in $\geq 16 \mu\text{g/mL}$. Za ciprofloksacin smo upoštevali mejno vrednost za odpornost $\geq 1 \mu\text{g/mL}$. Občutljivost proti metronidazolu smo dodatno preverjali z mejno agar dilucijsko metodo z vsebnostjo metronidazola $8 \mu\text{g/mL}$. V primeru ponovljivega neujemanja rezultata za me-

Tabela 1: Primarna in sekundarna odpornost bakterije *H. pylori* med letoma 2007 in 2009

Antibiotik	Primarna odpornost			Sekundarna odpornost		
	N	%R	% R 95 % I.Z.	N	%R	% R 95 % I.Z.
Amoksisilin	97	0	0.0–4.7	372	0	0–1.3
Ciprofloksacin	97	3.1	0.1–6.5	371	13.7	10.2 – 17.9
Klaritromicin	97	17.5	9.9 – 25.1	369	90.8	88.0–93.6
Metronidazole	97	18.6	10.8 – 26.3	370	86.5	83.0 – 90.0
Tetraciklin	97	0	0.0–4.7	370	0	0–1.3

R odporen, 95 % I.Z. 95-odstotni interval zaupanja

tronidazol med obema metodama smo upoštevali vrednost agar dilucijske metode. Seve smo po končanem testiranju shranili na -80°C za morebitna dodatna testiranja. Zbirne rezultate odpornosti na testirane antibiotike in analizo fenotipov izoliranih sevov smo naredili s pomočjo računalniškega programa WHONET 5.4.

Raziskavo je odobrila Republiška komisija za medicinsko etiko.

Rezultati

V naši skupini 97 izolatov opazamo popolno občutljivost bakterije *Helicobacter pylori* na amoksisilin in tetraciklin. V testiranem obdobju nismo osamili niti enega izolata, ki bi bil na katerega od njiju odporen. Odpornost na klaritromicin in metronidazol znaša 18,6 % in 17,5 %. Ko smo v naši skupini izolatov analizirali porazdeljenost odpornosti proti klaritromicinu in metronidazolu, smo ugotovili, da sta pri primarnih izolatih največkrat porazdeljeni ločeno. Izolati so bili večinoma odporni samo na metronidazol ali samo na klaritromicin. Kombinirana odpornost proti metronidazolu in klaritromicinu je bila prisotna pri 4,1 % primarnih izolatov. To po drugi strani pomeni, da je bil delež izolatov, ki so bili odporni proti najmanj enemu izmed ključnih antibiotikov, 32 %.

Za primerjavo smo izračunali odpornost 372 sevov bakterije *H. pylori*, ki smo jih v istem obdobju osamili v našem laboratoriju in za katere smo ob pregledu spremne dokumentacije nedvoumno ugotovili, da gre za seve po enkratnem ali večkratnem neuspelem poskusu eradikacijskega zdravlje-

nja. Tudi ti sevi so bili popolno občutljivi na amoksisilin in tetraciklin, odpornost na metronidazol, klaritromicin in ciprofloksacin pa je bila bistveno višja od tiste pri primarnih izolatih in je znašala 86,5 %, 90,8 % in 13,7 %. To z drugimi besedami pomeni, da je po enkratni ali večkratnem neuspelem eradikacijskem zdravljenju večina izolatov odpornih na oba ključna antibiotika in da je sekundarna odpornost bakterije *H. pylori* proti fluorokinolonom občutna.

Razpravljanje

Zdravljenje okužbe z bakterijo *H. pylori* je v zadnjih letih vse manj učinkovito. Glavni razlog za to je porast odpornosti bakterije proti ključnima antibiotikoma, ki se uporabljata v različnih shemah za eradikacijsko zdravljenje, to sta: klaritromicin in metronidazol.^{1,7} Zadnja priporočila evropskega združenja za raziskave bakterije *Helicobacter pylori* "Maastricht III" ugotavljajo potrebo po rednem spremljanju odpornosti te bakterije proti antibiotikom in postavljajo mejo odpornosti, ko je zaradi neučinkovitosti potrebno razmišljati o drugačnih shemah začetnega zdravljenja za klaritromicin 15–20 % in metronidazol 40 %.³ V Sloveniji nimamo tradicije rednega letnega spremljanja odpornosti bakterije *H. pylori* proti antibiotikom. Leta 1996 pri izolatih nezdravljenih bolnikov v Sloveniji nismo zaznali odpornosti proti metronidazolu, odpornost proti klaritromicinu pa je bila nizka.⁸ V podatkih multicentrične evropske študije 18 centrov o primarni odpornosti helikobaktra iz leta 1998 ugotavljamo povprečno stopnjo odpornosti za

Tabela 2: Profili odpornosti med primarnimi izolati

Profil odpornosti	Odporni antibiotik	Št. Izolatov	% Izolatov	95% C.I.
S	0	66	68.0	58.8 – 77.2
R	1 ali 2	31	32.0	22.8 – 41.2
Met R	1	14	14.4	7.4 – 21.4
Kla R	1	13	13.4	6.6 – 20.2
Met R / Kla R	2	4	4.2	0.3 – 8.1

R odporen, *S* občutljiv, *Met* metronidazol, *Kla* klaritromicin

metronidazol 33 % in za klaritromicin 9,9 %. Odpornost je bila v povprečju nižja v severno evropskih državah in višja na jugu Evrope.⁹ Kasnejši podatki o primarni odpornosti kažejo podobne trende in stopnje odpornosti, kot jih je kazala omenjena multicentrična študija, vendar njihova primerjava zaradi različnih metodologij ni v celoti možna.²

Z našo študijo smo želeli narediti zametke rednega in sistematičnega spremljanja odpornosti bakterije *H. pylori* v Sloveniji. Ugotovili smo stopnjo odpornosti proti metronidazolu 18,6 % in proti klaritromicinu 17,5 %. Če rezultate primerjamo s tistimi iz leta 1996, opazamo visok porast odpornosti te bakterije proti obema antibiotikoma. Takšen porast si lahko razlagamo na več načinov. Bodisi sta bili skupini neprimerljivi in je porast zgolj navidezen. Verjetnejša pa je razlaga, da porast odpornosti sovпада z vse večjo uporabo makrolidnih antibiotikov in metronidazola v tem obdobju. Poraba makrolidov v Sloveniji se je med letoma 1995 in 1999 zvišala z 2,20 DDD/1000 prebivalcev/dan (DDD definirani dnevni odmerek) na 3,82 DDD/1000 prebivalcev/dan. V kasnejših letih smo uspeli porabo makrolidov nekoliko zamejiti. V letu 2006 je poraba omenjene skupine antibiotikov padla na 2,30 DDD/1000 prebivalcev/dan. Odpornost bakterije *H. pylori* proti makrolidom je navzkrižna, zato lahko tudi uporaba katerega koli makrolidnega antibiotika v preteklosti prispeva k nastanku odpornosti

te bakterije.² Podatki o sočasni porabi metronidazola v Sloveniji nam niso znani.¹⁰

Rezultati profilov odpornosti kažejo, da je v naši skupini kombinirana primarna odpornost proti metronidazolu in klaritromicinu majhna in znaša 4,1 %, kar je primerljivo s podatki za vzhodno Evropo pred približno desetimi leti, kjer so se vrednosti gibale med 4–6 %. To pomeni, da je bilo sevov, ki so bili odporni vsaj na enega izmed dveh antibiotikov, veliko – 32 %. Zavedati se moramo, da je za uspešno eradikacijsko zdravljenje kritična predvsem ta dvojna odpornost. Vemo namreč, da je zdravljenje bistveno uspešnejše, kadar uporabljamo najmanj dva aktivna antibiotika. Tako bi ob hipotetični uporabi sheme klaritromicin + metronidazol + ZPČ pri slabi tretjini bolnikov uporabili nezadostno antibiotično zdravljenje. Pri 27,8 % bolnikih to pomeni uporabo monoterapije, pri 4,1 % bolnikov pa uporabo dveh neučinkovitih antibiotikov.

V pričujoči študiji so nas presenetili predvsem podatki o sekundarni odpornosti bakterije *H. pylori*, izolirane v istem obdobju na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo, za katere smo imeli nedvoumne podatke, da gre za seve po enkratnem ali večkratnem neuspešnem eradikacijskem zdravljenju. Sekundarni odpornosti za metronidazol in klaritromicin znašata 86,5 % in 90,8 %. Tako visoke stopnje sicer opisujejo v posameznih študijah, a so prej redkost kot pravilo.^{2,8} Sekundarna odpornost je od-

Tabela 3: Osnovni demografski podatki

	Primarna odpornost	Sekundarna odpornost
Število bolnikov	97	372
Moški (M)	39 (40 %)	96 (35 %)
Ženske (Ž)	58 (60 %)	276 (65 %)
Starost	52 let (11 – 78)	53 let (5 – 82)

visna tako od količine antibiotikov kot tudi od kombinacije antibiotikov v uporabljenih shemah zdravljenja. V našem primeru tako visoko stopnjo sekundarne odpornosti lahko razložimo z vključitvenim biasom. Lahko so v naši skupini izolatov prevladovali izolati po večkratnem neuspešnem zdravljenju. Testiranje odpornosti je po trenutnih priporočilih v Sloveniji priporočeno šele po večkratnem neuspešnem zdravljenju.⁶ Zato je povsem logično, da so v naši skupini prevladovali ti izolati. Dopuščamo pa možnost, da je nekaj odstotkov odpornosti doprinesel začetni izbor antibiotikov. Kadar namreč uporabimo nezadostno začetno antibiotično zdravljenje, je poleg stranskih učinkov zdravil edini resni učinek zdravljenja samo nastanek odpornosti proti do takrat še učinkovitemu antibiotiku v shemi. Tako lahko kaj kmalu ostanemo brez učinkovitega antibiotika, s katerim bi v pravi kombinaciji lahko ozdravili bakterijo. Slednje še posebej velja za hipotetični primer začetnega zdravljenja s klaritromicinom, metronidazolom in ZPČ.

Omejitev naše študije je majhno število sevov, zaradi česar je interval zaupanja odpornosti velik. V študiji smo več sevov osamili pri ženskah, pri čemer je znano, da je odpornost proti metronidazolu pri ženskah večja kot pri moških zaradi uporabe metronidazola pri nekaterih ginekoloških boleznih.⁹ Prav tako je lahko problematična zasnova študije, ki omogoča določen vključitveni bias. Končno pa gre za unicentrično študijo samo enega od gastroenteroloških centrov, ki se ukvarja tudi z zdravljenjem okužb z bakterijo *H. pylori*. Metodološko bi bila boljša multicentrična študija z uravnoteženo razporeditvijo izolatov po celotni Slo-

veniji. Vsekakor bi tako pridobljene podatke lažje enačili z odpornostjo na nacionalni ravni.

Zaključek

Najverjetneje smo pri izkoreninjenju bakterije *H. pylori* prišli do točke, ko bo potrebno ponovno premisliti o obstoječih priporočilih zdravljenja. Glede na vse večjo stopnjo odpornosti in dejstvo, da novih antibiotikov za zdravljenje okužbe s to bakterijo ni na vidiku (prej obratno!), menimo, da je prav spremljanje odpornosti bakterije in učinkovitosti zdravljenja ena izmed tistih točk, ki jim moramo v prihodnosti nameniti večjo pozornost in več sredstev.

Literatura

- Graham DY, Graham DY, Shiotani A, Shiotani A. New concepts of resistance in the treatment of *Helicobacter pylori* infections. *Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology* 2008; 5: 321.
- Vakil N, Megraud F. Eradication therapy for *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 2007; 133: 985-1001.
- Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain C, Bazzoli F, El-Omar E, Graham D, et al. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report. *Gut* 2007; 56: 772-81.
- Gerrits MM, van Vliet AH, Kuipers EJ, Kuipers JG. *Helicobacter pylori* and antimicrobial resistance: molecular mechanisms and clinical implications. *The Lancet Infectious Diseases* 2006; 6: 699-709.
- Gubina M, Tepeš B, Vidmar G, Ihan A, Logar J, Wraber B, et al. Prevalenca protiteles proti bakteriji *Helicobacter pylori* v Sloveniji v letu 2005. *Zdrav Vestn* 2006; 75: 1-5.

6. Tepes B, Gubina M. Razlogi za neuspeh antimitikrobnega zdravljenja okužbe z bakterijo *Helicobacter pylori* in naše terapevtske možnosti. *Zdrav Vestn* 2004; 73: 503-6.
7. Vakil N. H. pylori treatment: New Wine in Old Bottles? *Am J Gastroenterology* 2009; 104: 26-30.
8. Boyanova L, Mentis A, Gubina M, Rozynek E, Gosciniak G, Kalenic S, et al. The status of antimicrobial resistance of *Helicobacter pylori* in eastern Europe. *Clin Microbiol Infect* 2002; 8: 388-96.
9. Glupczynski Y, Mégraud F, Lopez-Brea M, Andersen LP. European multicentre survey of in vitro antimicrobial resistance in *Helicobacter pylori*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001; 20: 820-3.
10. Peklar J, Furst J, Samaluk V. Obvladovanje porabe protimikrobnih zdravil. *Recept Bilten o zdravilih iz obveznega zdravstvenega zavarovanja* 2007; 5: 2.