

# Sekundarna rezistencija sojeva *Helicobacter pylori* na antibiotike u Kliničkom bolničkom centru Split od 2018. do 2020. godine

---

Ivančević, Ivan

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:365029>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-09**



Repository / Repozitorij:

[MEFST Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**IVAN IVANČEVIĆ**

**SEKUNDARNA REZISTENCIJA SOJEVA *HELICOBACTER  
PYLORI* NA ANTIBIOTIKE U KLINIČKOM BOLNIČKOM  
CENTRU SPLIT OD 2018. DO 2020. GODINE**

**Diplomski rad**

**Akadska godina:**

**2019./2020.**

**Mentor:**

**prof. dr. sc. Ante Tonkić, dr. med.**

**Split, rujan 2020.**

**SVEUČILIŠTE U SPLITU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**IVAN IVANČEVIĆ**

**SEKUNDARNA REZISTENCIJA SOJEVA *HELICOBACTER  
PYLORI* NA ANTIBIOTIKE U KLINIČKOM BOLNIČKOM  
CENTRU SPLIT OD 2018. DO 2020. GODINE**

**Diplomski rad**

**Akadska godina:**

**2019./2020.**

**Mentor:**

**prof. dr. sc. Ante Tonkić, dr. med.**

**Split, rujan 2020.**

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. <i>Helicobacter pylori</i> .....	2
1.1.1. <i>Helicobacter pylori</i> kroz povijest .....	3
1.1.2. Morfološke i mikrobiološke značajke bakterije <i>Helicobacter pylori</i> .....	4
1.1.3. Patogenost bakterije <i>Helicobacter pylori</i> .....	5
1.1.4. Geni odgovorni za virulenciju i patogenezu.....	6
1.1.5. Prilagodba <i>H. pylori</i> visokoj kiselosti želuca .....	7
1.2. Dijagnostičke metode za otkrivanje infekcija koje uzrokuje bakterija <i>Helicobacter pylori</i> ....	8
1.2.1. Neinvazivne dijagnostičke metode .....	9
1.2.2. Invazivne dijagnostičke metode .....	11
1.3. Liječenje infekcije koju izaziva bakterija <i>H. pylori</i> .....	12
1.3.1. Bolest rezistentna na antibiotike .....	14
2. CILJ ISTRAŽIVANJA .....	15
3. ISPITANICI I METODE.....	17
3.1. Ustroj istraživanja.....	18
3.2. Ispitanici i materijali .....	18
3.3. Rezultati osjetljivosti <i>H. pylori</i> na antibiotike.....	18
3.4. Organizacija studije .....	18
3.5. Mjesto studije .....	18
3.6. Metode prikupljanja i obrade podataka.....	18
4. REZULTATI.....	20
5. RASPRAVA .....	26
6. ZAKLJUČCI.....	30
7. POPIS CITIRANE LITERATURE.....	32
8. SAŽETAK .....	36
9. SUMMARY .....	38
10. ŽIVOTOPIS.....	40

## Popis kratica

$^{12}\text{C}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{14}\text{C}$ , izotopi ugljika koji se koriste u dijagnostičke svrhe

CLO test (*eng. Campylobacter-like organism*), test za detekciju mikroorganizama sličnih kampilobakteru

$\text{CO}_2$ , ugljikov dioksid

ELISA (*eng. enzyme-linked immunosorbent assay*), enzimski imunotest

FlaA, flagelin A

FlaB, flagelin B

HP, *H. pylori*, *Helicobacter pylori*

IgG (*eng. Immunoglobulin G*), imunoglobulin G

IgM (*eng. Immunoglobulin M*), imunoglobulin M

IPP, inhibitori protonske pumpe

LPS, lipopolisaharid

MALT limfom (*eng. mucosa-associated lymphoid tissue*), limfom, limfoidno tkivo u mukoznim membranama

NO, dušični oksid

NSAIL, nesteroidni antiinflamatorni lijekovi

PAI (*eng. pathogenity island*), otok patogenosti (genomski fragment od 40 kb prisutan u nekim vrstama *Helicobacter pylori*)

PAS (*eng. periodic acid Schiff*), pejdna kiselina plus Schiffov reagens

PCR (*eng. Polymerase chain reaction*), lančana reakcija polimeraze

pH, broj koji služi kao mjera kiselosti, odnosno lužnatosti vodenih otopina

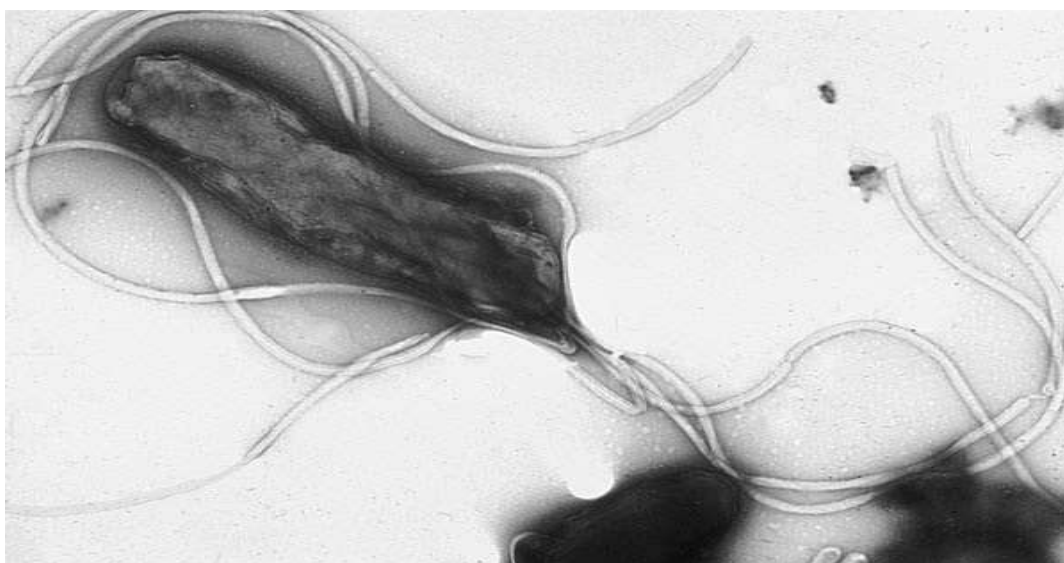
Real-time PCR, lančana reakcije polimeraze u "realnom" vremenu

VacA, vakuolizirajući citotoksin A

## **1. UVOD**

## 1.1. *Helicobacter pylori*

Godine 1983. patolog dr. Warren i mikrobiolog dr. Marshall pokrenuli su revoluciju u našem poimanju bolesti gornjega probavnog sustava (gastritis, ulkusna bolest želuca i duodenuma) uspješnom kultivacijom neidentificiranog zakrivljenog bacila u želucu i duodenumu kojeg su povezali s razvojem gastritisa i ulkusne bolesti (1). Do tada se smatralo kako je peptički ulkus posljedica prekomjernog lučenja kiseline i posljedičnog oštećenja želučane sluznice. Poznata je bila izreka „no acid, no ulcer“ (2). No, od tada se *Helicobacter pylori* našao u središtu bazičnih biokemijskih i kliničkih istraživanja, a njegov utjecaj na ljudsko zdravlje više se ne može osporiti. Dakle, ta mikroaerofilna gram-negativna bakterija prepoznata je kao glavni uzročnik kroničnoga gastritisa, peptičkog ulkusa, adenokarcinoma želuca i MALT-limfoma (3). *H. pylori* u želucu dovodi do oštećenja epitela proizvodnjom amonijaka, ali i vakuolizacijom epitelnih stanica. Vakuolizaciju izaziva citotoksin pod nazivom vakuolizirajući citotoksin A (VacA), tj. protein kojeg aktivira niski pH u želucu te endocitozom ulazi u epitelne stanice i potiče endosomsko-lizosomsku fuziju. Postoji više vrsta citotoksina, pa su tako agresivnije varijante povezane s peptičkim ulkusom, a blaže s gastritisom u ljudi koji nemaju simptome ili ulkusnu bolest. Drugi je važan patogeni čimbenik gen A pridružen citotoksinu (cagA) koji kodira CagA, jedan od prvih proteina povezanih s virulencijom *H. pylori*. CagA-protein povezuje se s težim oblikom gastritisa, povećanim rizikom od peptičkog ulkusa, atrofičnoga gastritisa i karcinoma želuca, napose u zapadnoj populaciji (4).



Slika 1. *Helicobacter pylori*

Do prijenosa bakterije *H. pylori* dolazi uglavnom u djetinjstvu fekalno-oralnim ili gastro-oralnim putem. U zemljama u razvoju >80% populacije zaraženo je do dobi od 20 godina, dok se u razvijenom svijetu proširenost infekcije povećava sukladno dobi. Dokazano je da je poboljšanje socioekonomskih uvjeta života zaslužno za manje stope zaraze u djetinjstvu (5). Prethodnim istraživanjima pokazano je da prosječna stopa infekcije u Hrvatskoj iznosi 60,4%, s većim brojem zaraženih u starijim dobnim skupinama. Tako je u trećem desetljeću života uzročnik dokazan u 51,6% ispitanika, dok je u šestom desetljeću zahvaćeno gotovo 70% ljudi. Veći postotak zaraženih nalazio se u južnom dijelu zemlje (71,3%), u usporedbi sa središnjom i sjevernom Hrvatskom (58,4%; 59,5%) (6).

U posljednjih 15-20 godina dosta pozornosti privlače tzv. ekstragastrične (izvanželučane) ili ekstraintestinalne (izvancrijevne) manifestacije infekcije bakterijom *H. pylori* koje variraju od sideropenične anemije i kronične urtikarije pa do teških neuroloških, imunskih i reumatoloških stanja. Već je odavno poznato da neki uzročnici zaraznih bolesti koji zahvaćaju određeni dio tijela mogu imati posljedice za čitav organizam. Tipičan je primjer tog fenomena beta-hemolitički streptokok grupe A, čest uzročnik akutnog ili kroničnog tonzilitisa koji može dovesti do reumatske vrućice, endokarditisa, glomerulonefritisa te neuroloških oštećenja (7).

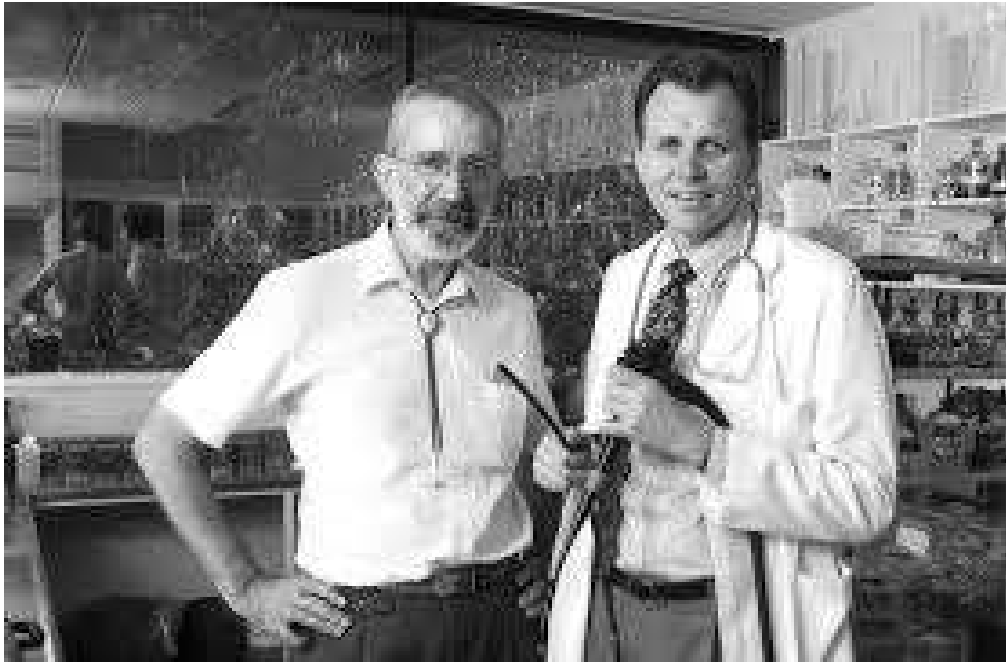
Zbog raširenosti infekcije, njene incidencije i značaja navedenih bolesti u ljudskoj populaciji nužan je ozbiljan dijagnostički i terapijski pristup.

### **1.1.1. *Helicobacter pylori* kroz povijest**

Godine 1899. poljski gastroenterolog Walery Jaworski bio je prvi koji je postavio hipotezu o mogućoj ulozi ovog mikroorganizma u patogenezi želučanih bolesti. Njegov je rad uvršten u „Priručnik želučanih bolesti“, ali je imao malo utjecaja, kako je napisan na poljskom (8).

Interes za razumijevanje uloge bakterija u želučanim bolestima pobuđen je 1970-ih, vizualizacijom bakterija u želucu ljudi s gastričnim ulkusom. Bakterije je 1979. primijetio i Robin Warren, koji je to dalje istraživao s Barryjem Marshallom od 1981. Nakon neuspjelih pokušaja kultiviranja bakterija iz želuca, konačno su uspjeli vizualizirati kolonije 1982., kad su nehotice ostavili svoje Petrijeve posude pa je inkubacija trajala pet dana, koliko su trajali Uskršnji blagdani. U svom izvornom radu, Warren i Marshall tvrdili su da je većina želučanih ulkusa i gastritisa uzrokovana bakterijskom infekcijom, a ne stresom ili začinjenom hranom, kao što se pretpostavljalo (9).





**Slika 2. Robin Warren i Barry Marshall**

Patolog Warren analizirao je dijelove probavnog sustava koji su pokazivali upalne promjene. U suradnji s mikrobiologom Marshallom dokazao je da izolat, "zakrivljeni" mikroorganizam "Campylobacter", uzrokuje većinu želučanih ulkusa. Uspjeli su uzgojiti kulturu tada poznatu kao *Campylobacter pyloridis*. Ubrzo su i znanstvenici u drugim krajevima svijeta potvrdili njihovo otkriće. Za svoj rad i otkriće Warren i Marshall su 2005. dobili Nobelovu nagradu za medicinu (3).

Prvi sastanak Europske grupe za istraživanje bolesti uzrokovanih bakterijom *H. pylori* održan je 1996. godine i tada su objavljene smjernice za dijagnostiku i eradikaciju *H. pylori*, a prvi sastanak hrvatskih liječnika na kojem se govorilo o istoj problematici održan je 1998. godine (3).

### **1.1.2. Morfološke i mikrobiološke značajke bakterije *Helicobacter pylori***

*Helicobacter pylori* je gram-negativna bakterija spiralnog oblika, dugačka oko 3  $\mu\text{m}$ , promjera oko 0,5  $\mu\text{m}$ . *H. pylori* se u tkivu može prikazati bojanjem po Gramu, po Giemsi, hematoksilin-eozinom, Warthin-Starryjevim srebrom, akridin narančastom bojom i pod faznim mikroskopom (10). Bakterija ima sposobnost stvoriti biofilm. *Helicobacter pylori* ima 4 do 6 bičeva na istom polu. Sve vrste želučanih i enterohepatičnih *Helicobacteria* su izrazito pokretne zahvaljujući bičevima. Karakteristični filamentni bičeva *Helicobacteria* građeni su od dva kopolimerizirana flagelina, FlaA i FlaB (11).

U kulturi se obično može naći u obliku štapića i koka, ali i u nepravilnim oblicima. Mikroaerofilna je pa joj je za rast potrebno 5–6 % kisika, 7–12 % ugljikovog dioksida i povećana vlažnost. Stvara enzime kao što su: ureaza, katalaza, hemolizin, proteaze, oksidaza i citotoksin (1). Kao i druge tipične gram-negativne bakterije, vanjska membrana *H. pylori* građena je od fosfolipida i lipopolisaharida (LPS). Lipopolisaharidni O antigen može biti fukoziliran i oponašati antigene Lewisove krvne grupe koji se nalaze u želučanom epitelu. Vanjska membrana također sadrži glukozide kolesterola koje nalazimo u nekoliko drugih bakterija. *Helicobacter pylori* je bakterija osjetljiva na isušivanje i dezinficijense, kao i na većinu antibiotika (eritromicin, azitromicin, amoksicilin) (9).

Sposoban je preživjeti i razmnožavati se unutar želučane sluznice. Većina *H. pylori* u ovoj sredini živi slobodno; međutim, manji broj ih adherira isključivo na stanice želučanog epitela i na mjestu vezivanja stvaraju postolja slična onima koja se vide kod enteropatogene *E. coli*. Ove bakterije pokazuju spiralni oblik gibanja poput svrdla što im omogućava migraciju unutar želučane sluznice. Svi patogeni sojevi imaju visoku koncentraciju ureaze, što im omogućava da stvore amonijeve ione koji ih štite od želučane kiseline. Kolonizacija s *H. pylori* može biti povezana s nakupljanjem povećanog broja upalnih stanica u lamini proprijii želučanog epitela. Stvaranje upalnih citokina smanjuje razinu somatostatina i uzrokuje povećanu razinu gastrina. Misli se da kronična upala koju uzrokuje *H. pylori* stvara u želučanoj sluznici aplastične promjene koje mogu dovesti do želučanog karcinoma (9).

### 1.1.3. Patogenost bakterije *Helicobacter pylori*

*H. pylori* optimalno raste pri pH 6,0–7,0 te bi bio uništen i ne bi mogao rasti pri pH unutar želučanog lumena. Želučana sluznica je relativno nepropusna za kiselinu i ima snažan puferski kapacitet. Na strani sluznice prema lumenu, pH je nizak (1,0–2,0); na strani epitela, pH je oko 7,4. *H. pylori* se nalazi duboko u mukoznom sloju blizu površine epitela gdje je vrijednost pH fiziološka. *H. pylori* također stvara proteazu koja modificira želučani mukus te još više smanjuje sposobnost kiseline da difundira kroz mukus. *H. pylori* stvara moćnu ureazu, koja proizvodi amonijak i daljnje puferiranje kiseline. *H. pylori* je jako pokretan, čak i u sluzi te sposoban da pronađe svoj put do površine epitela. *H. pylori* naliježe na želučani, a ne na intestinalni tip epitelnih stanica (17).

Ingestija *H. pylori* u dobrovoljaca je dovela do razvoja gastritisa i hipoklorhidrije. Postoji jaka povezanost između infekcije *H. pylori* i duodenalne ulceracije. Antimikrobna terapija uklanja *H. pylori* i poboljšava gastritis i duodenalnu ulkusnu bolest (9).

Mehanizmi kojima *H. pylori* izaziva upalu i oštećenje sluznice nisu u potpunosti

razjašnjeni, ali vjerojatno uključuju čimbenike i bakterije i domaćina. Bakterija invadira površinu epitelnih stanica do određenog stupnja. Toksini i lipopolisaharidi mogu oštetiti mukozne stanice, a amonijak koji nastaje djelovanjem ureaze može također izravno oštetiti stanice (17).

Histološki, gastritis se očituje akutnom i kroničnom upalom. Unutar epitela i lamina propria se vide infiltrati polimorfonuklearnih i mononuklearnih stanica. Unutar stanica su često izražene vakuole. Često dolazi do razaranja epitela, a može se pojaviti i glandularna atrofija. Stoga je *H. pylori* veliki čimbenik rizika za nastanak želučanog karcinoma (17).

Često obolijevaju osobe koje su međusobno u bliskom kontaktu, a bolest se uglavnom javlja u područjima u kojima žive stanovnici slabijeg socioekonomskog statusa, pa se pretpostavlja da se širenje može spriječiti osiguravanjem boljih higijenskih uvjeta. Budući da *Helicobacter pylori* jako dugo ostaje u sluznici to može dovesti čak i do razvoja specifičnog humoralnog i staničnog imuniteta (1, 17).

Kako se ova bakterija povezuje s bolestima gornjeg probavnog trakta, adenokarcinomom, ekстранodalnim P-staničnim limfomom marginalne zone (MALT limfom) i nizom ekstragastričnih i ekstraintestinalnih bolesti infekciju treba shvatiti vrlo ozbiljno (1). Virulentnost *Helicobacter pylori* leži u njezinoj brznoj pokretljivosti i obilnoj produkciji enzima. Zahvaljujući svojim bičevima lako i brzo prodire kroz sluz i smješta se na epitelnim stanicama. Infekcija može proći asimptomatski ili se manifestirati kao akutni gastritis (17).

U nekim slučajevima infekcija prolazi asimptomatski. Ipak, nakon dugotrajne upale bez obzira na to manifestirala se ona ili ne, na mjestima upalno promijenjene sluznice mogu nastati peptički ulkusi. Ako se njihovom liječenju pristupi ozbiljno te se krene s korištenjem antimikrobnih lijekova, ubrzo se javlja cijeljenje, a daljnje komplikacije su svedene na minimum. Time se također smanjuje šansa za nastanak adenokarcinoma želuca i MALT limfoma (3).

#### **1.1.4. Geni odgovorni za virulenciju i patogenezu**

Proučavanje genoma *H. pylori* usredotočeno je na pokušaje razumijevanja patogeneze, sposobnosti ovog organizma da uzrokuje bolest. Oko 29% lokusa ima oštećenje kolonizacije u slučajevima mutacije. Dva sekvencionirana soja imaju oko 40-kb dug otok patogenosti Cag (uobičajeni genski niz za koji se vjeruje da je odgovoran za patogene učinke) koji sadrži preko 40 gena. Ovaj otok patogenosti obično nedostaje kod vrste *H. pylori* izolirane u ljudi koji su kliconoše *H. pylori*, ali ostaju asimptomatski (13).

CagA gen kodira jedan od glavnih proteina odgovornih za virulenciju *H. pylori*.

Bakterijski sojevi s genom *cagA* imaju sposobnost da izazovu ulkus. *CagA* gen kodira relativno dug protein (1186 aminokiselina) (12). Otok patogenosti (PAI) *cag* ima oko 30 gena, od kojih dio nosi kod za sustav sekrecije tipa IV. Niski sadržaj GC-a *cag* PAI u odnosu na ostatak *Helicobacter*-ovog genoma sugerira da je otok stečen horizontalnim prijenosom iz druge vrste bakterija. Serinska proteaza HtrA također igra veliku ulogu u patogenezi *H. pylori*. HtrA protein omogućuje bakteriji da transmigrira kroz epitel stanica domaćina, a također je potreban za translokaciju *CagA* (13).

*VacA* gen kodira drugi glavni protein odgovoran za virulenciju *H. pylori*. Postoje četiri glavne podvrste *vacA*: s1/m1, s1/m2, s2/m1 i s2/m2 (14). Poznato je da podtipovi s1/m1 i s1/m2 povećavaju rizik od raka želuca. To je povezano sa sposobnošću toksigene *vacA* da potiče stvaranje intracelularnih rezervoara *H. pylori* remećenjem kalcijevog kanala TRPML1 (15).

#### 1.1.5. Prilagodba *H. pylori* visokoj kiselosti želuca

Kao što je gore spomenuto, *H. pylori* stvara velike količine ureaze za proizvodnju amonijaka kao jednu od svojih metoda prilagodbe za prevladavanje želučane kiselosti. Arginaza *Helicobacter pylori*, dvometalni enzim, binuklearna Mn<sup>2+</sup>-metaloenzim arginaza, ključna za patogenezu bakterije u ljudskom želucu, član obitelji ureohidrolaze, katalizira pretvorbu L-arginina u L-ornitin i ureu, gdje se ornitin dalje pretvara u poliamine koji su neophodni za različite važne metaboličke procese (16). U enzimskoj reakciji koja slijedi, a koju vrši ureaza, urea se pretvara u ugljični dioksid i amonijak. Tako oslobođeni amonijak koristi *H. pylori* za svoj opstanak, jer je *H. pylori* vrlo osjetljiv na kiselo okruženje (16).

To osigurava otpornost na kiselinu i stoga je važno za kolonizaciju bakterije u epitelnim stanicama želuca. Arginaza *H. pylori* također ima ulogu kod izbjegavanja imunološkog sustava domaćina, uglavnom raznim predloženim mehanizmima, arginaza se natječe sa sintazom domaćina koja može inducirati dušični oksid (NO) za uobičajeni supstrat L-arginin i tako smanjuje sintezu NO, važnu sastavnicu urođene imunosti i učinkovito antimikrobno sredstvo koje je u stanju izravno ubiti patogene (16).

Promjene u količini L-arginina i utjecaj na njegov metabolizam u poliamine značajno pridonose disregulaciji imunološkog odgovora domaćina na infekciju *H. pylori*.

Poznato je da aktivnost arginaze značajno doprinosi patofiziologiji infekcije *H. pylori*, pa ga to čini privlačnom metom lijekovima. Inhibicija aktivnosti arginaze može smanjiti lokalnu količinu uree za proizvodnju amonijaka pod djelovanjem ureaze, a time zaustaviti rast *H. pylori* (16).

## 1.2. Dijagnostičke metode za otkrivanje infekcija koje uzrokuje bakterija *Helicobacter pylori*

Bakterija *Helicobacter pylori* smatra se glavnim uzročnim faktorom kroničnog gastritisa tipa B te gastričnog i duodenalnog ulkusa. Postoje različiti dijagnostički testovi za dokazivanje infekcije *H. pylori*. Dije se na neinvazivne i invazivne, a za ispitivanje se koriste uzorci krvi, stolice i izdahnutog zraka (17).

Bolesnici s peptičkim ulkusom koji je izazvala bakterija *H. pylori* obično imaju klasične simptome dispepsije: žareću bol nekoliko sati iza obroka koja popušta nakon uzimanja hrane ili antacida. Podrigivanje, slaba probava i žgaravica također su česte tegobe. Osim blage osjetljivosti u srednjem epigastriju, fizikalni nalaz je obično uredan (17).

Testiranje na *H. pylori* preporučuje se samo bolesnicima koji imaju simptome. Prema dijagnostičkim smjernicama bolesnika <45 godina s dispeptičnim tegobama bez alarmantnih simptoma, nije potrebno izlagati invazivnim endoskopskim pretragama. Za otkrivanje *H. pylori* odabire se neka od neinvazivnih dijagnostičkih pretraga: urea izdisajni test, određivanje antigena *H. pylori* u stolici ili serološka kvantitativna laboratorijska analiza. Navedeni testovi izvode se rutinski (17).

Invazivna gastroenterološka obrada preporučuje se bolesnicima starijima od četrdeset pet godina te svima onima koji imaju ozbiljnije simptome poput znakova gastrointestinalnog krvarenja ili palpatornih rezistencija u trbuhu. Endoskopski pregled kojim se uzimaju bioptički uzorci osnova je invazivnih metoda. Bioptati se nakon toga mogu analizirati brzim testom ureaze, patohistološki i mikrobiološki (uzgajanjem kulture) ili PCR testiranjem (18, 19).

Danas su na tržištu dostupni ELISA testovi za mjerene razine IgG potutijela, nisu skupi i osjetljivi su, ali se u starijih osoba mogu pojaviti lažno negativni rezultati. Dostupni su i testovi za određivanje antigena u stolici, i ukoliko osoba ne uzima inhibitore protonske pumpe (IPP) i ako nema gastrointestinalnog krvarenja, također je osjetljiv i specifičan. U toku liječenja sva tri testa mogu postati negativna, pa se mogu koristiti za praćenje terapijskog odgovora. Izdisajni urea test je najpreciznija metoda za dokumentiranje izlječenja (17).

Dijagnoza se najčešće postavlja pomoću endoskopske biopsije (gastroskopije). Uzorak dobiven biopsijom treba prvo ispitati na ureazu (CLO test) koja ima visoku osjetljivost i specifičnost uz uvjet da osoba ne uzima bizmut, H<sub>2</sub>-blokatore ili inhibitore protonske pumpe. Biopsija je najisplativija dijagnostička metoda. Uzorke je također moguće kultivirati koristeći selektivna hranilišta i mikroareofilne uvjete. Ako bolesnik ne odgovara na terapiju potrebno je učiniti kulturu i antibiogram. *H. pylori* je moguće vizualizirati bojanjem srebrom, po Gramu ili

Giemsi, te imunofluorescencijom.

Tablica 1. prikazuje neinvazivne i invazivne dijagnostičke metode (17).

**Tablica 1. Dijagnostičke pretrage za otkrivanje bakterije *H. pylori* (17)**

TEST	OSJETLJIVOST/ SPECIFIČNOST, %	KOMENTARI
<b>INVAZIVNI (ENDOSKOPIJA/POTREBA ZA BIOPSIJOM)</b>		
Brzi ureazni test	80–95/95–100	Jednostavan, lažno negativni nalaz uz nedavno uzimanje IPP-a, antibiotika ili preparata bizmuta
Histologija	80–90/>95	Zahtijeva pregled bioptata od strane patologa uz odgovarajuće bojanje
Kultura	—/—	Dugotrajno, skupo, ovisi o iskustvu; omogućuje određivanje osjetljivosti <i>H. pylori</i> na antibiotike
<b>NEINVAZIVNI</b>		
Serologija	>80/>90	Jeftina, pristupačna; nije adekvatna za inicijalno testiranje/praćenje
Urea izdisajni test	>90/>90	Jednostavan, brz; adekvatan za inicijalnu obradu/praćenje; lažno negativan nakon nedavnog uzimanja terapije (vidi brzi ureazni test); izloženost manjim dozama zračenja s <sup>14</sup> C testom
Antigen u stolici	>90/>90	Jeftin, prikladan; nema indikaciju za eradikaciju, ali obećava
<i>Kratice:</i> IPP = inhibitori protonske pumpe.		

## 1.2.1. Neinvazivne dijagnostičke metode

### 1.2.1.1. Urea izdisajni test

Urea izdisajni test dokazuje prisutnost enzima ureaze koji u velikim količinama stvara bakterija *Helicobacter pylori* u želucu i dvanaesniku čovjeka. Ureaza se nalazi u citoplazmi stanice *Helicobacter pylori*, a ima zadaću opskrbiti stanicu spojevima amonijaka i dušika nužnih za sintezu aminokiselina. Drugim riječima, enzim ureaza cijepa ureu na amonijak i ugljikov dioksid, kako bi se povećao pH u želucu i duodenumu (17).

Sam test izvodi se tako da bolesnik guta ureu obilježenu s <sup>13</sup>C i <sup>14</sup>C, i zatim se u narednim satima u izdahnutom zraku određuje količina <sup>13</sup>C i <sup>14</sup>C. Test zahtijeva skupocjenu opremu ali to opravdava visoka specifičnost i osjetljivost (20).

<sup>13</sup>C je prirodni i neradioaktivni izotop, dok je <sup>14</sup>C radioaktivan. Ako je *H. pylori* prisutna u želucu, ureaza će prouzrokovati razgradnju uree na amonijev ion i bikarbonat. Amonijev ion resorbira se u krvotok i izlučuje mokraćom, a oslobođeni <sup>13/14</sup>CO<sub>2</sub> nastao razgradnjom bikarbonata bit će prisutan u izdahnutom zraku (20).

Barem dva tjedna prije izvođenja testa bolesnici trebaju prestati uzimati antisekretorne lijekova (inhibitori protonske pumpe, blokatori histaminskih receptora, preparati bizmuta) ili antibiotike.

Nakon što bolesnik izdahne prvi uzorak zraka popije sok obogaćen vitaminom C u kojem se nalazi oko 75 mg uree označene izotopom ugljika ( $^{13}\text{C}$  ili  $^{14}\text{C}$ ). Vitamin C koristi se jer limunska kiselina izaziva relaksaciju fundusa želuca i ima povoljan učinak na bolesnike s gastritisom (17, 20).

Rezultat  $^{13}\text{C}$ -urejnog izdisajnog testa predstavlja razliku omjera  $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ , a za mjerenje se koriste metode infracrvene spektroskopije ili masene spektrofotometrije. Ako se koristi izotop  $^{14}\text{C}$ , princip samog mjerenja nešto je drukčiji. Iskazuje se udio radioaktivnog izotopa  $^{14}\text{C}$  nastao razgradnjom uree obilježene s  $^{14}\text{C}$  u odnosu na primjenjenu dozu (17, 20).

#### **1.2.1.2. Testovi za dokazivanje antigena *Helicobacter pylori* u stolici**

Testovi za dokazivanje antigena *Helicobacter pylori* u stolici često otkrivaju infekciju bakterijom *H. pylori*. Dvije su vrste ovih neinvazivnih testova, a to su imunokromatografski “probirni” testovi za kvalitativnu detekciju i ELISA testovi (enzimski imunotest). Imunokromatografski testovi su jednostavni i pouzdani. Sadrže monoklonska antitijela na *Helicobacter pylori*. Na testnoj trakici nanesa su antitijela na dva različita mjesta: adsorbirana na testnu trakicu u obliku linije i predstavljaju pozitivnu kontrolu te konjugirana s koloidnim česticama tako da bi se mogla stvoriti još jedna linija (pozitivan rezultat testa) (21).

#### **1.2.1.3. Serološka kvantitativna laboratorijska analiza**

Serološka kvantitativna laboratorijska analiza na infekciju bakterijom *Helicobacter pylori* izvodi se rijetko. Premda je metoda vrlo jednostavna i neinvazivna ne preporučuje se rutinski jer rezultati testa mogu biti nepouzdana za praćenje uspješnosti terapije zbog dugotrajne pozitivnosti iako je osjetljivost testa >90%, a specifičnost 76% do 96% (3, 22). Antitijela protiv *H. pylori* dokazuju se imunoenzimskim testovima. Komercijalni imunoenzimski testovi temelje se na detekciji IgG antitijela na *Helicobacter pylori* u serumu venske krvi. IgG antitijela na *H. pylori* mogu biti pozitivna i mjesecima nakon izliječenja infekcije, a dokaz su kontakta bolesnika s bakterijom. IgM antitijela su dokaz trenutačne infekcije. Ovi su testovi skupi i većini zdravstvenih ustanova nedostupni. Stoga, serološka dijagnostika služi za prvo dokazivanje *Helicobacter pylori* i to samo ako bolesnik već nije bio podvrgnut eradikaciji (23).

## **1.2.2. Invazivne dijagnostičke metode**

### **1.2.2.1. Brzi ureaza test**

Brzi ureaza test počiva na istom principu kao i urea izdisajni test. Budući da bakterija *H.pylori* luči veliku količinu enzima ureaze koja razgrađuje ureu na ugljikov dioksid i amonijak, princip je sličan urea izdisajnom testu. Razlika je u tome što se umjesto izdahnutog zraka ovdje analizira biopat želučane sluznice dobiven gastroskopijom. Biopat se stavlja u otopinu uree i specifičnu boju. Ako se u biopatu nalazi bakterija *H. pylori* promijeni se pH, odnosno boja. Promjena pH je indikator tj. potvrda pozitivnosti testa. Ako je nemoguće provesti patohistološku analizu, izvodi se ovaj jednostavni test (17, 18, 19, 21).

### **1.2.2.2. Patohistološki test**

Patohistološki test je najbolji test za dokazivanje gastične infekcije bakterijom *H. pylori*. Velika mu je prednost što otkriva izgled stanica želučane sluznice, odnosno stupanj upalnog procesa. Biopati sluznice želuca se nakon standardne obrade tkiva u histokinetu, osim bojanjem hemalaun-eozinom, boje posebnim tehnikama - bojanjem po Giemsi i PAS (engl. *periodic acid Schiff*)-alcijan plavilom. Osim velike dijagnostičke vrijednosti, test je važan i za eradikaciju bakterije. Bojanje po Giemsi pokazuje stupanj kolonizacije sluznice, dok se PAS-alcijan plavilom dobije prikaz intestinalne metaplazije (25).

Ako je bolesnik duže vrijeme bio zaražen, a provedena je terapija bila bezuspješna što se tiče eradikacije bakterije *H. pylori*, tada se ponovno vrši biopsija želučane sluznice, ali se ovaj put biopati šalju u mikrobiološki laboratorij zbog kultivacije uzorka. U biopatum želučane sluznice dobivenima gastroskopijom dokazuje se *H. pylori* direktnim ureaza testom i kultivacijom. Kada dođe do porasta kulture, napravi se antibiogram i odabire antibiotik na koji je bakterija osjetljiva te se započinje s ciljanom terapijom. Rezultat pretrage (test ureaze, identifikacija i antibiogram) čeka se tri do četiri dana (17, 18, 19, 25).

### **1.2.2.3. Lančana reakcija polimeraze**

Lančana reakcija polimeraze (PCR) je osnovna molekularna metoda. Nova varijanta lančane reakcije polimeraze je real-time PCR (PCR u "realnom" vremenu). Ova se metoda sve više koristi za detekciju i tipizaciju bakterije *Helicobacter pylori*. Neka su istraživanja pokazala kako je u djece s niskom koncentracijom bakterija u biopatu želučane sluznice "Real Time" PCR kvantifikacija (qPCR) po preciznosti daleko ispred prije navedenih invazivnih dijagnostičkih metoda (9, 26, 27).



### 1.3. Liječenje infekcije koju izaziva bakterija *H. pylori*

Ciljevi liječenja su ublažavanje boli, cijeljenje ulkusa, prevencija komplikacija, prevencija relapsa bolesti. Terapijske opcije su farmakoterapija i kirurško liječenje. U slučaju gastričnog ulkusa treba isključiti malignitet (endoskopski pratiti cijeljenje ulceracije). Dijetetske mjere su nepotrebne uz suvremene lijekove. Valja eliminirati uzimanje NSAID-a te zabraniti pušenje jer to može spriječiti zacjeljivanje. Eradikacijom *H. pylori* značajno se smanjuje postotak recidiva ulkusa pa je indicirana za sve gastrične i duodenalne ulkuse vezane za *H. pylori*. Sastavni dio terapijskog protokola predstavlja i supresija lučenja želučane kiseline. Reinfekcija se javlja u <1% slučajeva unutar godinu dana (17).

Thomas Borody razvio je "trostruku terapiju" na bazi bizmuta koja se sastojala od bizmuta i dva antibiotika (patentirana 1985. godine). Ovo je postao prvi doista uspješan tretman za *H. pylori* sa stopom iskorjenjivanja >90% (28).

U standardne lijekove za eradikaciju infekcije *H. pylori* spadaju blokatori H<sub>2</sub>-receptora, antacidi, sukralfat, IPP, bizmut. Navedeni lijekovi zacjeljuju 80–90% duodenalnih i 60% gastričnih ulkusa unutar 6 tjedana. Cijeljenje je brže s omeprazolom (17).

Različiti terapijski protokoli koji su sastavljeni od antibiotika i inhibitora protonske pumpe primjenjuju se za iskorjenjivanje bakterije *H. pylori*. Tzv. trojna terapija koju čine klaritromicin, amoksicilin i inhibitor protonske pumpe daje se 14 do 21 dan, te se smatra prvom linijom liječenja. Različiti terapijski protokoli primjenjuju se za liječenje infekcije *H. pylori*, no nijedan se nije pokazao idealnim. Dvotjedna trojna terapija koja uključuje inhibitore protonske pumpe (lansoprazol ili omeprazol), peroralni amksicilin i klaritromicin dovodi do izlječenja u 90% slučajeva. Bolesnicima alergičnim na penicilin umjesto amksicilina može se dati peroralni metronidazol. Inhibitori protonske pumpe mogu se kombinirati s bizmutom i druga dva antibiotika (amksicilin, klaritromicin, levofloksacin, metronidazol, tetraciklini). U slučajevima relapsa, trojna terapija koja se sastoji od peroralnog levofloksacina u kombinaciji s amksicilinom i IPP-a, pokazala se boljom od četvorne kombinacije koju čine bizmut, tetraciklin, metronidazol i IPP (17).

Budući da postoje različiti terapijski protokoli za liječenje infekcije bakterijom *H. pylori*, radi preglednosti prikazani su tablično (Tablica 2.) (17).

**Tablica 2. Terapijski protokoli predloženi za eradikaciju infekcije bakterijom *H. pylori* (17)**

PROTOKOL	LIJEK	DOZIRANJE	TRAJANJE LIJEČENJA	ODOBRENJE FDA
<b>Trostruki s klaritromicinom</b>	IPP (standardna ili dvostruka doza)	2× dnevno	14	da
	klaritromicin (500 mg)			
	amoksisicilin (1 g) ili metronidazol (500 mg 3× dnevno)			
<b>Četverostruki s bizmutom</b>	IPP (standardna doza)	2× dnevno	10 do 14	ne
	bizmutov subcitrat (120–300 mg) ili subsalicilat (300 mg)	4× dnevno		
	tetraciklin (500 mg)	4× dnevno		
	metronidazol (250–500 mg)	4× dnevno (250) 3× do 4× dnevno (500)		
<b>Konkomitantni</b>	IPP (standardna doza)	2× dnevno	10 do 14	ne
	klaritromicin (500 mg)			
	amoksisicilin (1 g)			
	nitroimidazol (500 mg)			
<b>Sekvencijski</b>	IPP (standardna doza)	2× dnevno	5 do 7	ne
	IPP, klaritromicin (500 mg) + nitroimidazol (500 mg)	2× dnevno	5 do 7	
<b>Hibridni</b>	IPP (standardna doza) + amoksisicilin (1 g)	2× dnevno	7	ne
	IPP, amoksisicilin, klaritromicin (500 mg), nitroimidazol (500 mg)	2× dnevno	7	
<b>Trostruki s levofloksacinom</b>	IPP (standardna ili dvostruka doza) + amoksisicilin (1 g)	2× dnevno	5 do 7	ne
	levofloksacin (500 mg)	1× dnevno		
	amoksisicilin (1 g)	2× dnevno		
<b>Sekvencijski s levofloksacinom</b>	IPP (standardna ili dvostruka doza) + amoksisicilin (1 g)	2× dnevno	5 do 7 dana	ne
	IPP, amoksisicilin, levofloksacin (500 mg 1×/dan), nitroimidazol (500 mg)	2× dnevno	5 do 7	
<b>LOAD</b>	levofloksacin (250 mg)	1× dnevno	7 do 10	ne
	IPP (dvostruka doza)	1× dnevno		
	nitazoksamid (500 mg)	2× dnevno		
	doksiciklin (100 mg)	1× dnevno		

**Izvor:** Preuzeto i prilagođeno uz dopuštenje Wolters Kluwer Health, Inc.: Cheiy WD i sur.: ACG Clinical Guideline: Treatment of *Helicobacter pylori* Infection. Am J Gastroenterol 112:212, 2017.

### 1.3.1. Bolest rezistentna na antibiotike

Sve je veći broj osoba s *H. pylori* otpornim na antibiotike. To u početku dovodi do neuspjelog liječenja i zahtijeva dodatnu kuru antibiotske terapije ili alternativnu strategiju, kao što je četvorostruka terapija, koja dodaje bizmutni koloid, npr. bizmutov subalicilat ili subcitrati. Za liječenje sojeva *H. pylori* otpornih na klaritromicin predložen je levofloksacin (18, 29).

Gutanje bakterija mliječne kiseline djeluje supresivno na infekciju *H. pylori* i u životinja i u ljudi, pa se bolesnicima koji uzimaju jogurt koji sadrži *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* poboljšava postotak iskorjenjivanja *H. pylori*. Simbiotske bakterije koje stvaraju butirati, a koje se obično nalaze u crijevima, ponekad se koriste kao probiotici za lakše suzbijanje infekcija *H. pylori* kao dodatak antibiotskoj terapiji. Sam butirati je antimikrobni lijek koji uništava staničnu ovojnici *H. pylori* inducirajući regulatornu T staničnu ekspresiju (konkretno FOXP3) i sintezu antimikrobnog peptida zvanog LL-37, koji nastaje njegovim djelovanjem kao inhibitora histon deacetilaze (18, 29).

Tvar sulforafan, koja se pojavljuje u brokuli i karfiolu, predložena je za liječenje. Parodontalna terapija ili skidanje naslaga zubnog kamenca je također predloženo kao dodatno liječenje (18, 29).

## **2. CILJ ISTRAŽIVANJA**

**Cilj** ovog istraživanja je utvrditi prevalenciju sekundarne antimikrobne rezistencije *H. pylori* u KBC Split od 2018. do 2020. godine prema spolu i dobnim skupinama.

**Sekundarni ciljevi** su ispitati razlike u rezistenciji između antibiotika, te utvrditi postoje li čimbenici kod pacijenata koji bi mogli povećavati ili smanjivati vjerojatnost rezistencije

**Hipoteza** predviđa rastuću učestalost sekundarne rezistencije *H. pylori* na klaritromicin.

### **3. ISPITANICI I METODE**

### 3.1. Ustroj istraživanja

Retrospektivno smo prikupili rezultate kultura *H. pylori* dobivene želučanim biopsijama u KBC Split u periodu od 2018. do 2020. godine. Antimikrobna osjetljivost na pet lijekova testirana je gradijentnom difuzijom.

### 3.2. Ispitanici i materijali

**Kriteriji uključenja:** U ovo retrospektivno kliničko istraživanje (studijski period 2018. - 2020.) uključeno je 58 pacijenata (41 žena i 17 muškaraca) s dokazanom infekcijom *H. pylori*:

1. muškarci i žene u dobi od 7 do 81 godine
2. neuspjeh najmanje dva standardna terapijska režima za infekciju *Helicobacter pylori* nakon čega su pacijenti u KBC Split upućeni na kulturu *H. pylori*
3. bolesnici su bili temeljito upoznati sa prirodom ove studije uz pismeni pristanak

**Kriteriji isključenja:** Iz ovog istraživanja isključivani su bolesnici koji boluju od:

1. koji prethodno nisu uzimali eradikacijsku terapiju zbog infekcije *H. pylori*
2. koji su alergični na penicilin

### 3.3. Rezultati osjetljivosti *H. pylori* na antibiotike

U pacijenata s dokazanom *H. pylori* infekcijom (pozitivni ureaza brzi test, kultivacija bioptata želučane sluznice) koji su zadovoljavali kriterije uključivanja u ovu studiju određena je osjetljivost *H. pylori* na sljedeće antibiotike: amoksicilin, levofloksacin, klaritromicin, tetraciklin i metronidazol.

### 3.4. Organizacija studije

Obzirom na vremensku orijentaciju ova studija je retrospektivno istraživanje.

### 3.5. Mjesto studije

Istraživanje je provedeno u Zavodu za gastroenterologiju KBC Split.

### 3.6. Metode prikupljanja i obrade podataka

Podatci su prikupljeni na Zavodu za gastroenterologiju Klinike za unutarnje bolesti KBC-a Split i Mefst-a, Kliničkom zavodu za mikrobiologiju i parazitologiju KBC-a Split i Mefst-a. Razlike u udjelima su formalno testirane omnibus  $\chi^2$  testom ili binomijalnim testom.

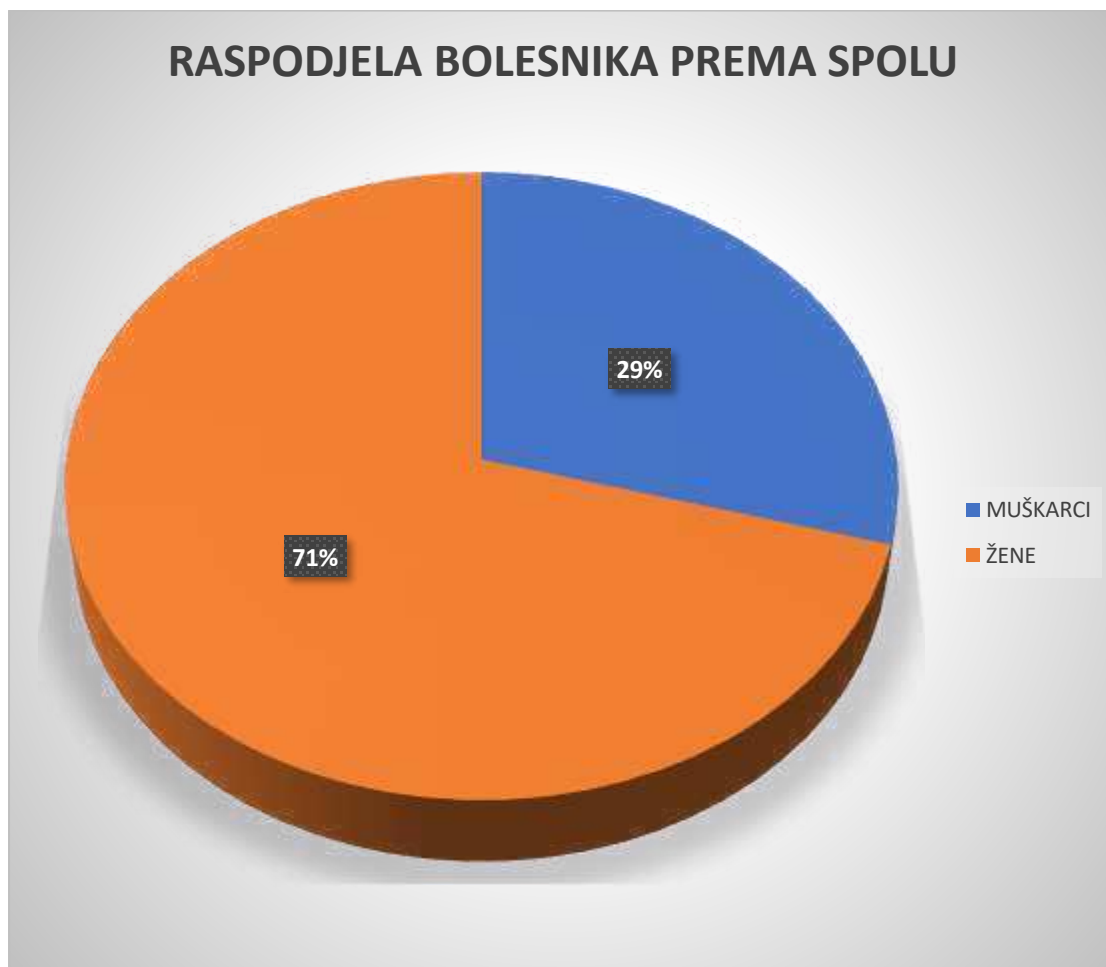
Logističkom regresijom su se pokušali odrediti čimbenici koji bi povećavali ili smanjivali vjerojatnost rezistencije na pojedini antibiotik. Prag statističke značajnosti je bilo  $p < 0.05$ . Za statističku obradu podataka korišten je statistički paket GraphPad Prism 8.4.3 (GraphPad Software, LaJolla, California, SAD).



## **4. REZULTATI**

U ovo retrospektivno kliničko istraživanje (studijski period 2018.–2020.) uključeno je 58 pacijenata (41 žena i 17 muškaraca) s dokazanom infekcijom *H. pylori*. Zastupljenost žena se pokazala većom od očekivane (71% vs.50%,  $p=0,0022$ ).

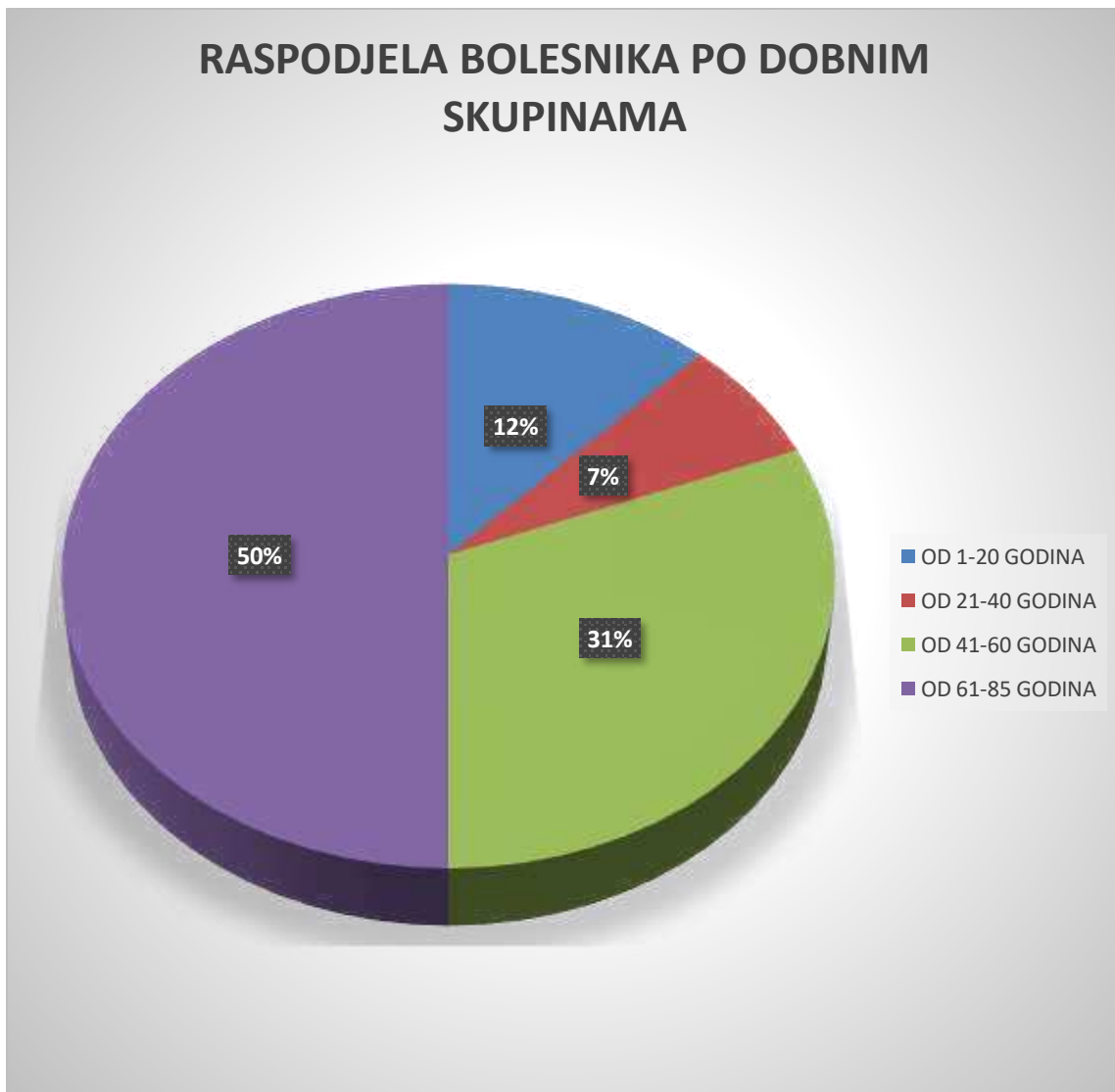
Slika 3. prikazuje raspodjelu pacijenata prema spolu.



**Slika 3. Raspodjela pacijenata prema spolu**

Pacijenti uključeni u ovo retrospektivno kliničko istraživanje (studijski period 2018.–2020.), osim po spolu, razvrstani su i po dobnim skupinama. Određene su četiri dobne skupine: od 1 do 20 godina, od 21 do 40 godina, od 41 do 60 godina i od 61 do 85 godina. Dobna skupina od 61 do 58 godina je natprosječno zastupljena u odnosu na ostale, dok su dobne skupine od 1 do 20 te od 21 do 40 ispodprosječno zastupljene ( $\chi^2=26,83$ ,  $df=3$ ,  $p<0,0001$ )

Slika 4. prikazuje raspodjelu pacijenata prema dobnim skupinama.



**Slika 4. Raspodjela pacijenata prema dobnim skupinama**

Svim je pacijentima nakon biopsije odmah urađen direktni ureaza test. Pacijenti su također razvrstani po rezultatu direktnog ureaza testa na one s pozitivnim direktnim ureaza testom i na one s negativnim direktnim ureaza testom.

Slika 5. prikazuje raspodjelu pacijenata s obzirom na rezultat direktnog ureaza testa (pozitivan ili negativan).



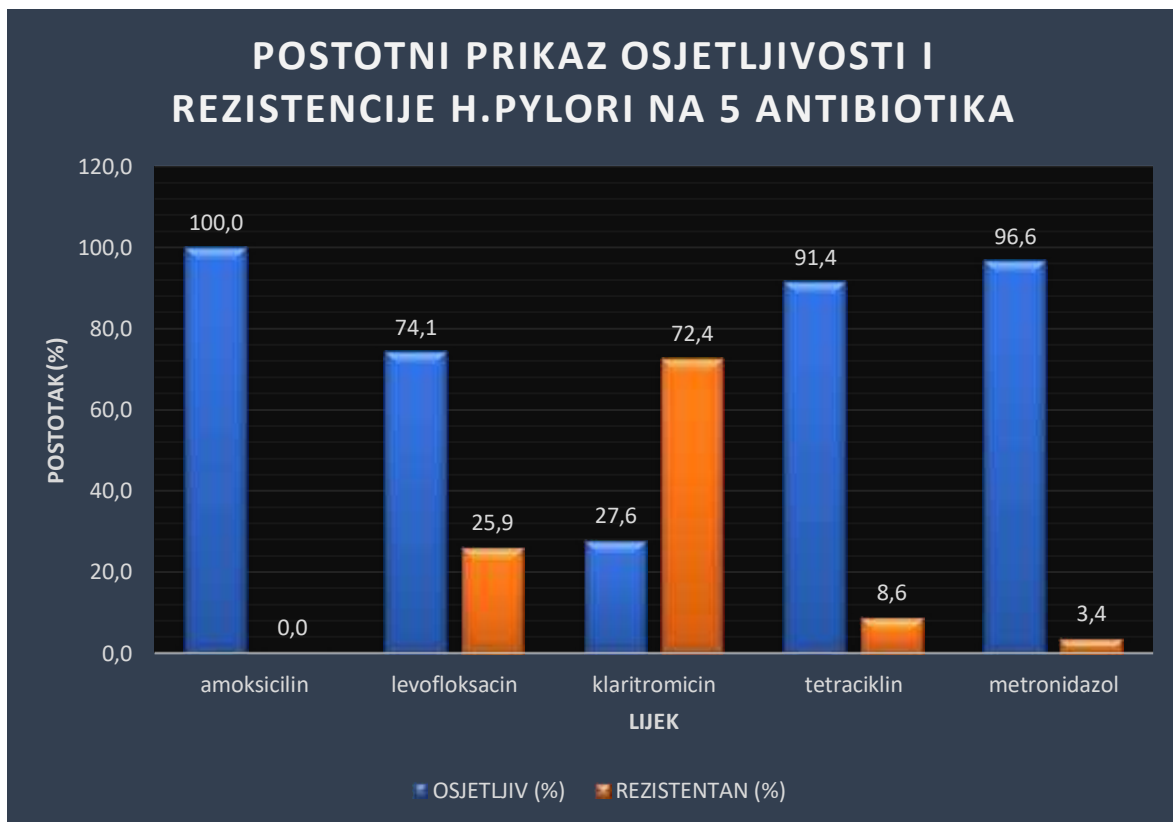
**Slika 5. Raspodjela pacijenata s obzirom na rezultat direktnog ureaza testa (pozitivan ili negativan).**

Biopati 58 bolesnika, 41 žene i 17 muškaraca, upućeni su na kulturu na *H. pylori*. Analizirana je osjetljivost i rezistencija pet antibiotika. *H. pylori* je bila senzitivna na amoksisilin kod 58 (100%) bioptata, na levofloksacin kod 43 (74,13%) bioptata, na klaritromicin kod 16 (27,58%) bioptata, na tetraciklin kod 53 (91,37%) bioptata i na metronidazol kod 56 (96,55%) bioptata.

Rezistencija bakterije *H. pylori* na amoksisilin nije utvrđena, rezistencija na levofloksacin utvrđena je kod 15 (25,86%) bioptata, na klaritromicin kod 42 (72,41%) bioptata, na tetraciklin kod 5 (8,62%) bioptata i na metronidazol kod 2 (3,44%) bioptata.

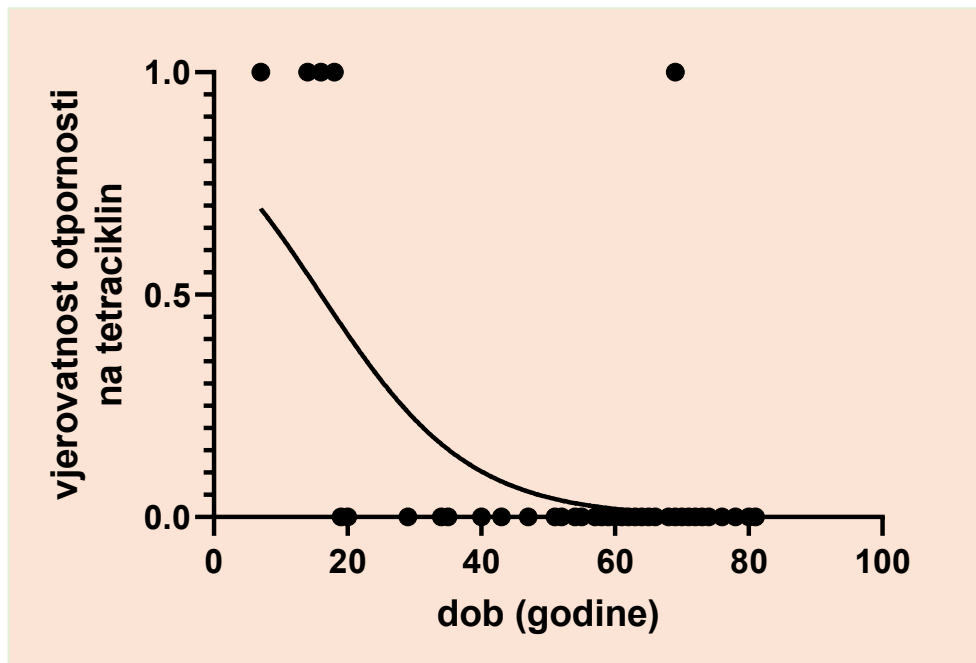
Navedene razlike između antibiotika u senzitivnosti i rezistentnosti su dosegle razinu statističke značajnosti ( $\chi^2=120.2$ ,  $df=4$ ,  $p<0,0001$ ).

Slika 6. prikazuje osjetljivost i rezistenciju bakterije *H. pylori* na pet antibiotika.



Slika 6. Postotni prikaz osjetljivosti i rezistencije na pet antibiotika

Nadalje, primjenom logističke regresije se pokušalo utvrditi jesu li dob ili spol povezani sa rezistencijom na pojedini antibiotik. Jedini statistički značajni nalaz je bila povezanost starije dobi i smanjene vjerojatnosti za rezistenciju na tetraciklin (OR=0,91; 95%CI (0,84 do 0,96), p=0,0013) (Slika 7).



Slika 7. Grafikon prikaza ovisnosti dobi i rezistencije na tetraciklin OR=0,91; 95%CI (0,84 do 0,96), p=0,0013).

## **5. RASPRAVA**

U ovom istraživanju smo pokazali kako se otpornost *H. pylori* razlikuje s obzirom na pojedinu vrstu antibiotika, dok zapravo nismo imali ni jedan zabilježeni slučaj otpornosti na amokscilin, stopa otpornosti na klaritromicin je bila 72%. Također, se pokazalo da s povećanjem dobi za jednu godinu rezistentnost na tetraciklin pada za 9% u prosjeku.

Infekcije bakterijom *H. pylori* danas se ubrajaju u najčešće infekcije. Veliki postotak stanovništva je inficiran, a osobit je problem što pacijenti u početku simptomima ne pridaju pažnju. Samo manji postotak inficiranih ljudi obrati pažnju na rane simptome i javi se liječniku. Eradikacija je često neuspješna, a tegobe nakon nekog vremena recidiviraju (5).

Na uspješnost eradikacijske terapije može utjecati otpornost bakterije *H. pylori* na primjenjeni antibiotik. Otpornost *H. pylori* može biti primarna (bakterija je rezistentna na antibiotik i prije primjene terapije). Otpornost se kreće između 10% i 90%, češća je u žena nego u muškaraca i češća je u zemljama u razvoju nego u razvijenim zemljama. Sekundarna ili stečena otpornost razvija se za vrijeme liječenja određenim antibiotikom i to češće ako se antibiotik daje kao monoterapija. Rezultati novijih studija pobuđuju sve veći interes za određene kombinacije lijekova. Osobito treba istaknuti kombinacije s preparatima bizmuta, jer smanjuju razvoj sekundarne otpornosti na antibiotike (17).

Dok je primarna rezistencija *H. pylori* na antibiotike posljedica nedovoljno visoke koncentracije antibiotika na mjestu gdje bakterija obitava, visoke kiselosti (niske pH vrijednosti) u želucu i slabije difuzije u sluznicu, dotle je glavni razlog sekundarne rezistencije *H. pylori* na antibiotike povećani postotak primarne rezistencije *H. pylori* na klaritromicin, kao i porast rezistencije na druge antibiotike koji se koriste u terapijskim protokolima za eradikaciju *H. pylori* (29).

Ispitali smo sekundarnu rezistenciju bakterije *H. pylori* na pet najčešće korištenih antibiotika. Bolesnike smo također analizirali s obzirom na dob, spol i rezultat direktnog ureaza testa u trogodišnjem razdoblju (od 2018. do 2020. godine).

Iz podataka je vidljivo da na amoksicilin nema rezistencije pa je amoksicilin opravdano sastavni dio svih eradikacijskih terapijskih protokola. S druge strane, najslabija karika je klaritromicin jer je rezistencija na njega najveća, a u našem istraživanju iznosi čak 72,4%. U usporedbi sa sličnim istraživanjem provedenim 1998. godine primijećena je dvostruko veća rezistencija na klaritromicin, što se pripisuje promjenama u genomu bakterije *H. pylori*, te dugom razdoblju od početka infekcije pa do počinjanja eradikacijskog liječenja.

Drugi po redu antibiotik s najvećim postotkom rezistencije je levofloksacin (25,9%), što potvrđuje opažanja kako se rezistencija na kinolone razvija jako brzo (17). Dakle, kada je riječ o rezistenciji na kinolone, neka izvješća pokazuju brzi porast broja rezistentnih sojeva *H. pylori*



u posljednjih 10 godina pa bi postotak rezistencije mogao vrlo brzo premašiti onaj na klaritromicin.

Metronidazol je antibiotik na koji je bakterija *H. pylori* razvila najmanji postotak rezistencije od ispitivanih antibiotika na koje se razvila rezistencija. Rezistencija na metronidazol u zadnjih 10 godina je gotovo stalna, tj. dosta visoka (35%).

Što se tiče spola, sekundarna rezistencija *H. pylori* na antibiotike češće se javlja u žena (41/58 žena, tj. 71%), nego u muškaraca (17/58, tj. 29%).

Raspodjela bolesnika po dobnim skupinama pokazala je kako je sekundarna rezistencija na *H. pylori* najveća u najstarijoj dobnj skupini, a najmanja u najmlađoj dobnj skupini. Štoviše, smanjivala se sukladno dobnim skupinama silaznim redoslijedom. Značajno je napomenuti kako je na najstariju dobnu skupinu otpadalo 50% od svih slučajeva sekundarne rezistencije *H. pylori* na antibiotike.

Što se tiče rezultata direktnog ureaza testa u trogodišnjem razdoblju od 2018. do 2020. godine bilo je za 14% više negativnih rezultata direktnog ureaza testa (57% negativnih i 43% pozitivnih).

Problem rezistencije u RH objašnjava se porastom primarne rezistencije *H. pylori* na klaritromicin, što je i glavni razlog neuspješnog liječenja (9% u 1998. godini, a 17,6% u 2009. godini). U sjevernoj Hrvatskoj primarna rezistencija na klaritromicin je porasla od 7% 1999. godine na 25,6% 2011. godine. Porast primarne rezistencije zabilježen je i u južnim područjima Hrvatske (22%). Bez antibiograma klaritromicin ne bi trebalo primijenjivati u trojnoj terapiji. Porast rezistencije na klaritromicin i sužen izbor antibiotika (od antibiotika za eradikacijsku terapiju infekcije *H. pylori* na našem tržištu registrirani su amoksisicilin, klaritromicin, metronidazol, tetraciklini i levofloksacin) smanjili su djelotvornost načela "*Test and treat*" (31).

Cijeli svijet muči problem povećane otpornosti bakterija na antibiotike, koja poprima razmjere pandemije. Razlozi su brojni lako dostupni lijekovi i sve veći broj indikacija za antibiotike uz neracionalno propisivanje antibiotika.

Bolesti gastrointestinalnog sustava čine veliki postotak od ukupnog pobola svjetske populacije, od čega znatan dio otpada na entitete povezane s infekcijom bakterijom *H. pylori*. Budući da se prva linija liječenja infekcije *H. pylori* provodi bez antibiograma, povećana je mogućnost rezistencije bakterije na propisane antibiotike i neuspješnost terapije.

Brojni znanstveni radovi o povećanju rezistencije na antibiotsko liječenje infekcije *H. pylori* pokazuju povećani postotak rezistencije na prvu terapijsku liniju, kombinirano liječenje amoksisicilinom, klaritromicinom i metronidazolom, skupa s inhibitorom protonske pumpe. Od navedenih antibiotika, najviše slučajeva rezistencije otpada na klaritromicin, pa se u Hrvatskoj

i većini europskih zemalja izbjegava njegova primjena jer je broj rezistentnih slučajeva >20%. Osim toga, zabrinjava i sve veća rezistencija na levofloksacin, lijek iz druge terapijske linije.

Borba s povećanom rezistencijom *H. pylori* na antibiotike uključuje nekoliko strategija. Prvo, optimalan izbor antibiotika. Treba ispitati osjetljivost bakterije na antibiotike koji su sastavnice standardnih terapijskih protokola. Granična vrijednost je postotak od 20% rezistentnih sojeva na klaritromicin od ukupnog broja testiranih bolesnika. Ako rezultat ispitivanja rezistencije prelazi 20%, klaritromicin ne bi trebalo propisivati. Izolirani soj *H. pylori* treba podvrgnuti testu osjetljivosti na antibiotike. Pretjerano propisivanje antibiotika uvelike pridonosi virulenciji *H. pylori* i razvoju rezistencije. Zato je racionalno propisivanje antibiotika ključno za smanjenje postotka rezistentnih sojeva.

Uz već iznesene rezultate naše istraživanje ima i ograničenosti prvenstveno u vidu što su podatci iz jednog centra i što je relativno malen uzorak.

Kao rezultat ovog istraživanja jasno se nameće potreba za učinkovitom terapijom prve linije eradikacije *H. pylori* koja bi trebala biti prvenstveno zasnovana na rezultatima regionalnog monitoriranja osjetljivosti *H. pylori* na najčešće korištene antibiotike. Sukladno navedenom nameće se potreba za personaliziranom terapijom eradikacije *H. pylori* koja bi bila nesumnjivo značajno učinkovitija od empirijske terapije.

## **6. ZAKLJUČCI**

Značajno veće stope sekundarne rezistencije utvrđene su u prethodno liječenih bolesnika, što naglašava potrebu da se suzdrži od empirijskog liječenja strategijom "testirati i liječiti". U svih prethodno liječenih bolesnika treba razmotriti personaliziranu terapiju eradikacije *H. pylori* zasnovanu na prethodnom testiranju sojeva *H. pylori*.

Ovo istraživanje je utvrdilo:

1. Incidencija sekundarne rezistencije sojeva *H. pylori* na antibiotike u KBC Split u periodu od 2018. do 2020. godine na amoksisilin nije utvrđena, rezistencija na levofloksacin utvrđena je kod 15 (25,9%) bioptata, na klaritromicin kod 42 (72,4%) bioptata, na tetraciklin kod 5 (8,6%) bioptata i na metronidazol kod 2 (3,4%) bioptata.
2. Sekundarna antimikrobna rezistencija *H. pylori* u KBC Split od 2018 do 2020. godine bila je bitno veća u žena nego u muškaraca. Omjer je iznosio 71% prema 21%.
3. Stopa rezistencije je najmanja za amoksisilin , a najveća za klaritromicin.

## **7. POPIS CITIRANE LITERATURE**

1. Kalenić S, Mlinarić Missoni E. Medicinska bakteriologija i mikologija. Zagreb: Merkur A.B.D; 2001.
2. Unge P. *Helicobacter pylori* treatment in the past and in the 21st century. U: Marshall B, ur. *Helicobacter Pioneers: Firsthand Accounts from the Scientists Who Discovered Helicobacters*. Victoria: Blackwell Science Asia; 2002. str. 203–13.
3. Katičić M, Duvnjak M, Filipec Kanižaj T, Krznarić T, Marušić M, Mihaljević S i sur. Hrvatski postupnik za dijagnostiku i terapiju infekcije *Helicobacterom pylori*. *Liječ Vjesn.* 2014;136:1–17.
4. Hatakeyama M, Higashi H. *Helicobacter pylori* CagA: a new paradigm for bacterial carcinogenesis. *Cancer Sci.* 2005;96:835–43.
5. Pounder RE, Ng D. The prevalence of *Helicobacter pylori* infection in different countries. *Aliment Pharmacol Ther.* 1995;9:33–9.
6. Babuš V, Presečki V, Katičić M, Balića M, Zorić I, Kronja L i sur. Distribution of *Helicobacter pylori* infection in the adult population of Croatia. *Liječ Vjesn.* 1997;119:139–42.
7. Polyzos SA, Kountouras J, Zavos C, Deretzi G. The association between *Helicobacter pylori* infection and insulin resistance: a systematic review. *Helicobacter.* 2011;16:79–88.
8. Konturek JW. Discovery by Jaworski of *Helicobacter pylori* and its pathogenetic role in peptic ulcer, gastritis and gastric cancer. *J Physiol Pharmacol.* 2003;54:23–41.
9. Kusters Johannes G, Van Vliet Arnoud HM, Kuipers Ernst J. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clin Microbiol Rev.* 2006;19:449–90.
10. Chan WY, Hui PK, Leung KM, Chow J, Kwok F, Ng CS. Coccoid forms of *Helicobacter pylori* in the human stomach. *Am J Clin Pathol.* 1994;102:503–7.
11. Rust M, Schweinitzer T, Josenhans C. *Helicobacter* Flagella, Motility and Chemotaxis. U: Yamaoka Y, ur. *Helicobacter pylori: Molecular Genetics and Cellular Biology*. Norfolk: Caister Academic Press; 2008. str. 61–87.
12. Uchiyama I, Albritton J, Fukuyo M, Kojima KK, Yahara K, Kobayashi. A Novel Approach to *Helicobacter pylori* Pan-Genome Analysis for Identification of Genomic Islands. *PLoS One.* 2016;11:e0159419.
13. Tomb JF, White O, Kerlavage AR, Clayton RA, Sutton GG, Fleischmann RD i sur. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature.* 1997;388:539–47.

14. Miehle S, Yu J, Schuppler M, Frings C, Kirsch C, Negraszus N i sur. *Helicobacter pylori* vacA, iceA, and cagA status and pattern of gastritis in patients with malignant and benign gastroduodenal disease. *Am J Gastroenterol*. 2001;96:1008–13.
15. Capurro MI, Greenfield LK, Prashar A, Xia S, Abdullah M, Wong H i sur. VacA generates a protective intracellular reservoir for *Helicobacter pylori* that is eliminated by activation of the lysosomal calcium channel TRPML1. *Nat Microbiol*. 2019;4:1411–23.
16. George G, Kombrabail M, Raninga N, Sau AK. Arginase of Helicobacter Gastric Pathogens Uses a Unique Set of Non-catalytic Residues for Catalysis. *Biophys J*. 2017;112:1120–34.
17. Del Valle J. Peptic Ulcer Disease and Related Disorders. U: Jameson J, Fauci A, Kasper D, Hauser S, Longo D, Loscalzo J, ur. *Harrison's principle of internal medicine* 20. izdanje. New York: McGraw-Hill; 2018. str. 2220–43.
18. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain CA, Atherton J, Axon ATR, Bazzoli F i sur. Management of *Helicobacter pylori* infection – the Maastricht IV/Florence consensus report. *Gut*. 2012;61:646-64.
19. Tonkic A, Tonkic M, Lehours P, Megraud F. Epidemiology and diagnosis of *Helicobacter infection*. *Helicobacter*. 2012;17:1–8.
20. Stenström B, Mendis A, Marshall B. *Helicobacter pylori*-the latest in diagnosis and treatment. *Aust Fam Physician*. 2008;37:608–12.
21. Garza-González E, Perez-Perez GI, Maldonado-Garza HJ, Bosques Padilla FJ. A review of *Helicobacter pylori* diagnosis, treatment, and methods to detect eradication, *World J Gastroenterol*. 2014;20:1438–49.
22. Santacroce L. *Helicobacter Pylori* Infection. [Internet] [citirano: 24. kolovoza 2020. godine] Dostupno na: <https://emedicine.medscape.com/article/176938-overview>
23. She RC, Wilson AR, Litwin CM. Evaluation of *Helicobacter pylori* Immunoglobulin G (IgG), IgA, and IgM Serologic Testing Compared to Stool Antigen Testing. *Clin Vaccine Immunol*. 2009;16:1253–55.
24. Goddard AF, Logan RPH. Diagnostic methods for *Helicobacter pylori* detection and eradication, *Br J Clin Pharmacol*. 2003;56:273–83.
25. Rimbara E, Sasatsu M, Graham DY. PCR Detection of *Helicobacter pylori* in Clinical Samples. *Methods Mol Biol*. 2013;943:279–87.
26. Mentis A, Lehours P, Mégraud F. Epidemiology and Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*. 2015;20:1-7.

27. Borody, Thomas J. Method for treatment of gastro intestinal disorders. USA; US5196205A, 1988.
28. Saad RJ, Schoenfeld P, Hyungjin K, Chey WD. Levofloxacin-based triple therapy versus bismuth-based quadruple therapy for persistent *Helicobacter pylori* infection: a meta analysis. Am J of Gastroenterol. 2006;101:488–96.
29. Ljubicic N. Terapijske mogućnosti u liječenju *H. pylori* infekcije u Republici Hrvatskoj. [Internet] [citirano: 20. kolovoza 2020. godine] Dostupno na: <http://www.plivamed.net/pretraga?plivamed%5Bsearch%5D=hibridna+terapija>



## **8. SAŽETAK**

**Cilj istraživanja:** Primarni cilj ovog istraživanja je bio utvrditi prevalenciju sekundarne antimikrobne rezistencije bakterije *H. pylori* u KBC Split od 2018. do 2020. godine.

Sekundarni ciljevi ovog istraživanja su utvrditi prevalenciju sekundarne antimikrobne rezistencije *H. pylori* u KBC Split od 2018. do 2020. godine prema spolu i dobnim skupinama.

**Ispitanici i metode:** U ovo retrospektivno kliničko istraživanje (studijski period 2018. – 2020.) uključeno je 58 pacijenata (41 žena i 17 muškaraca) s dokazanom infekcijom *H. pylori* u kojih je utvrđena sekundarna antimikrobna rezistencija.

**Rezultati:** Prevalencija sekundarne antimikrobne rezistencije *H. pylori* u KBC Split od 2018 do 2020. godine na pojedine antibiotike poklapa se s brojnim istraživanjima koja su provedena u Europi i Hrvatskoj, tj. najveća rezistencija zabilježena je na klaritromicin i levofloksacin. Sekundarna antimikrobna rezistencija *H. pylori* u KBC Split od 2018 do 2020. godine bila je bitno veća u žena nego u muškaraca ( $p=0,0022$ ). Omjer je iznosio 71% prema 21%. Najveća učestalost sekundarne antimikrobne rezistencije *H. pylori* s obzirom na dob zabilježena je u dobnj skupini od 60 do 85 godina, a iznosila je 50% ( $p<0,0001$ ). Najmanja rezistencija je zabilježena na amoksicilin, a najveća na klaritromicin ( $p<0,0001$ ). Starenje se pokazalo kao zaštitni čimbenik kad je riječ o rezistenciji na tetraciklin ( $p=0,0013$ ).

**Zaključak:** Istraživanje o sekundarnoj rezistenciji bakterije *H. pylori* na uobičajene antibiotike u KBC Split u trogodišnjem razdoblju (2018. do 2020.) potvrđuje opravdanost strategije liječenja utemeljenog na rezultatima kultura jer nakon prethodnih neuspješnih (empirijskih) antimikrobnih terapija, samo ciljana antimikrobna terapija dovodi do eradikacije bakterije *H. pylori*.

## **9. SUMMARY**

**Diploma thesis title:** The primary goal of this study was to determine the prevalence of secondary antimicrobial resistance of bacteria *H. pylori* in KBC Split from 2018 to 2020. The secondary goals of this study were to determine the prevalence of secondary antimicrobial resistance of *H. pylori* in KBC Split from 2018 to 2020 by sex and age groups.

**Materials and methods:** This retrospective clinical study (study period 2018–2020) included 58 patients (41 women and 17 men) with proven *H. pylori* infection in whom secondary antimicrobial resistance was established.

**Results:** The prevalence of secondary antimicrobial resistance of *H. pylori* in KBC Split from 2018 to 2020 to certain antibiotics coincides with numerous studies conducted in Europe and Croatia, i.e. the highest resistance was recorded to clarithromycin and levofloxacin. Secondary antimicrobial resistance of *H. pylori* in KBC Split from 2018 to 2020 was significantly higher in women than in men ( $p=0,0022$ ). The ratio was 71% to 21%. The highest frequency of secondary antimicrobial resistance of *H. pylori* with respect to age was recorded in the age group of 60 to 85 years, and was 50% ( $p<0,0001$ ). Highest antimicrobial resistance was noted with claritromycin, whereas no resistance was noted for amoxiciline ( $p<0,0001$ ). Older age seems to be a protective factor when it comes to resistance on tetracycline ( $p=0,0013$ ).

**Conclusion:** Research on the secondary resistance of *H. pylori* to common antibiotics in KBC Split in the three-year period (2018 to 2020) confirms the justification of the treatment strategy based on culture results because after previous failed antimicrobial (empirical) therapies, only targeted antimicrobial therapy leads to eradication of *H. pylori*.

## **10. ŽIVOTOPIS**

## **OSOBNI PODATCI**

IME I PREZIME: Ivan Ivančević

DATUM I MJESTO ROĐENJA: 22. veljače 1995., Split

DRŽAVLJANSTVO: Hrvatsko

ADRESA STANOVANJA: Kralja Zvonimira 42, 21 000 Split

TELEFON: +385 099 7000 304

E-ADRESA: [illusiveman1@gmail.com](mailto:illusiveman1@gmail.com)

## **OBRAZOVANJE**

2001. – 2009. Osnovna škola „Pojišan“, Split

2009. - 2013. Gimnazija „Marko Marulić“, Split

2013. - 2020. Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu, smjer doktor medicine

## **ZNANJA I VJEŠTINE**

Vozač B kategorije

Aktivno znanje jezika: engleski i talijanski

Pasivno znanje jezika: latinski

Posjeduje organizacijske, administrativne i socijalne vještine